

審査の結果の要旨

氏名 築地 信

マクロファージ関連細胞に発現するCタイプレクチンMGL1及びMGL2と題する本論文は、マクロファージ細胞表面のに発現するカルシウム依存型レクチンの一つであるMGL (macrophage galactose-type C-type lectin)とその遺伝子について述べている。三つの章から成り、第1章では、*Mgl1* 遺伝子の転写制御に関与する転写因子の同定と、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスの作製について、第2章では、肝臓へホーミングする樹状細胞にMGLが発現するという新たな発見について、第3章では、MGL1とは異なる糖結合特異性を有する新規レクチンMGL2の同定と性質の解析が主題である。マウス及びヒトのMGLはこれまでに当教室で精製cDNAクローニング、特異的なモノクローナル抗体の作成などが行なわれ、エンドサイトーシス受容体としての機能とホーミング受容体としての機能が示されていた。また免疫組織学的解析より、MGL陽性細胞は、正常マウス組織の結合組織に限局すること、炎症感作時に真皮から所属リンパ節に移動すること、腫瘍組織に集積することなどが明らかになっていた。学位申請者はこの分子の免疫生物学的な機能を明らかにすることを目標に、マウスを材料にゲノム遺伝子のクローニングと遺伝子欠損マウスの作成を目指して研究を行なった。その過程で、極めて相同性の高い第二のMGL遺伝子の存在明らかにし、そのcDNAクローニングを行なってレクチンとしての特性を解明した。従来から知られていたものをMGL1、新規に発見したものをMGL2と命名した。具体的には学位論文は以下の内容を含んでいる。

第1章では、MGL1のゲノムクローニング、上流配列解析、染色体マッピング、及び遺伝子破壊マウスの作成について述べられている。

129/SvJマウス由来ゲノムライブラリーより、MGL1 cDNAをプローブとしたブランクハイブリダイズ法と、PCR法を用いて、ポジティブクローンが得られた。このゲノムクローンの塩基配列を解読し、エクソン・イントロン構造が決定された結果、*Mgl1* 遺伝子は、全長4065残基からなり10個のエクソンから構成されてる事が判明した。interbackcross法による遺伝的マッピングの結果、11番クロモソーム上に位置が決定された。

ルシフェラーゼ遺伝子上流に*Mgl1* 遺伝子上流配列を連結したベクターが、MGLを恒常的に発現している細胞であるマクロファージ様細胞株RAW264.7に導入され、ルシフェラーゼ活性により遺伝子発現レベルが定量された。さらに、ベクター変異体が作製され転写制御領域が決定され、ゲルシフトアッセイによって結合する転写因子の同定が行われた。その結果、骨髄球の分化に重要な因子であるPU.1と、単球からマクロファージへの分化に必須なNF- κ Bが*Mgl1* 遺伝子の転写制御因子として同定された。

Mgl1 遺伝子欠損マウスの作製を目標に、ターゲティングベクターが2種類作製され、ES

細胞株 RW-4 に導入された。相同組み換え遺伝子を含む細胞が PCR 法およびサザンブロット法により同定され、胚盤胞に導入され、キメラマウスが作製された。しかし、変異遺伝子の生殖系伝達は起こらなかった。

第 2 章では、血中を循環している樹状細胞が肝臓へホーミングし、肝臓のリンパ節において抗原提示を行なう際に、樹状細胞に発現している MGL を介する肝臓のクッパー細胞への接着が重要である可能性が示された。獨協大学医学部解剖学松野教授らとの共同研究によるラットを用いたこの部分の研究では、肝臓を構成する細胞や樹状細胞の遺伝子発現解析から、MGL を発現している細胞が樹状細胞であることが明らかにされた。

第 3 章では、MGL2 cDNA のクローニング及びリコンビナント蛋白質として発現したレクチン分子の性質を明らかにする研究が行なわれた結果が述べられている。マウス MGL1 とヒト MGL の配列に相同性を有する新規配列を EST データベースより検索し、その結果得られた配列断片をもとにプライマーが作製され RAW264.7 細胞株から作製した cDNA を用いて、RACE 法にてこの遺伝子の全長がクローニングされた。MGL2 と命名されたこの遺伝子は MGL1 と高い相同性を有していた。ゲノム遺伝子構造の解析の結果、*Mgl2* 遺伝子は、エクソン・イントロン構造が MGL1 と良く似た全長 7136 残基からなる *Mgl1* とは異なる遺伝子としてコードされていた。マウス BAC ライブラリーのデータベースに、*Mgl1* 遺伝子と *Mgl2* 遺伝子とともにコードする BAC クローンが同定され、11 番染色体に類似遺伝子である *Asgr1*、*Asgr2* とクラスターを形成していることも明らかになった。

これらの遺伝子の細胞外ドメインからなるリコンビナント蛋白質の糖結合特異性を ELISA にて解析した結果、MGL1 は Le^x構造に、MGL2 は単糖の GalNAc に親和性を有することが判明した。一方、既に作成されていた MGL1 に結合するモノクローナル抗体 (mAb LOM-4.7、LOM-8.2、LOM-8.7、LOM-11、LOM-14) の反応性が ELISA によって検討された結果、LOM-14 は MGL1 及び MGL2 に結合することが明らかになった。チオグリコレート誘導腹腔滲出細胞を材料に、これらのモノクローナル抗体によって MGL1 及び MGL2 を発現する細胞の違いが解析された。mAb LOM-8.7 の結合性が高い細胞の画分と低い細胞の画分が得られたが、mRNA を回収して MGL1 および MGL2 の遺伝子の発現レベルについて RT-PCR 法にて比較すると、どちらの細胞にも MGL1 及び MGL2 の遺伝子が検出され、少なくとも mRNA に関しては MGL1 と MGL2 は同一細胞で共発現していることが明らかにされた。また、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスの皮膚など複数の組織の凍結切片では、細胞に対する mAb LOM-8.7 の反応性は見られないが、mAb LOM-14 は結合性を示した。これらの結果から、MGL2 の発現は MGL1 の発現レベルによって影響を受けないと考えられた。これらの研究成果から、これまでは全く予想されていなかった、二種類の糖鎖認識特異性の異なるしかし構造や発現と言う意味では極めて類似した C 型レクチンが、マクロファージ及びその類縁細胞に発現していることが明らかにされた。遺伝子の 5' 上流配列を見る限り MGL1 と MGL2 の発現制御が全く同じであるとは考えにくく、また糖鎖認識特異性の違いは内在性リガンドが異なる事を強く示唆した。

以上の研究成果は、マクロファージ及びその類縁細胞に発現する糖鎖認識分子の免疫学的な役割を理解する上で極めて大きな貢献をし、今後の研究の重要な基盤となると予想される。よって、本研究を行った築地信は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。