

論文の内容の要旨

論文題目 マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL)の
新規スプライシングバリエントの同定と精巢における発現解析

氏 名 森 川 明 子

[序]

高等動物細胞に発現するレクチン（糖鎖認識蛋白質）には、異なる起源の遺伝子から進化した多様なものがあり：(1) 細胞の相互認識と細胞交通の制御；(2) 細胞内外における糖鎖含有分子の移動、処理とクオリティーコントロール；(3) これらに伴う細胞内外の情報取舍などを主な機能とすると考えられる。糖鎖に対して多様な特異性を有するが多様な糖鎖のすべてに個々に対応するレクチンがあるわけではない。C 型レクチンの一つである MGL に関しては一遺伝子から生じる一種類の産物が主に (1) の機能を持つという仮定の下に検討が加えられてきた。その後、マウスにおいては従来知られていた MGL (MGL1) に相同性の高い MGL2 が発見され、糖認識特異性を異にすることが示された。ヒトにおいては mRNA のレベルでスプライシングバリエントの存在が明らかにされていたが、これらを発現する細胞種に違いがあるわけではなく、蛋白質産物の検出はされていなかった。そこで私はマウスを対象に MGL のバリエントの機能的な多様性と分布の特性の解明を目指した。具体的には、*Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製を試み、*Mgl* 遺伝子の新規スプライシングバリエントの同定を行った。mRNA レベルと蛋白レベルでのスプライシングバリエント特異的な検出の系の確立を試み、精巢における発現解析を行った。

[方法と結果]

1. *Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製

Mgl2 遺伝子産物が担っている機能を明らかにする事を目的とし、ジーンターゲティング法を用いて *Mgl2* 遺伝子の開始コドン进行削除することにより *Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。PCR スクリーニングが可能な Targeting vector ver.1 とサザンブロットでのスクリーニングのみ可能な Targeting vector ver.2 を作製した (Fig.1A)。発生細胞化学教室との共同研究により、ES 細胞株 E14 を用いて、ES 組換え体の取得を行った。ver.2 を用いた、エレクトロポレーションにより 4 個の組換え体 ES 細胞クローンを取得した。現在、8 匹のキメラマウスが得られており、それらの掛け合わせによる生殖系伝達の検定中である。

2. 新規 MGL スプライシングバリエントの同定と分布の解析

2.1. 新規 MGL スプライシングバリエントの同定

MGL1 と MGL2 の多様なプライマーを用いた RT-PCR 産物のスプライシングパターンからエキソン 8 が含まれている可能性が高いことを予測し、エキソン 8 を起点とした 3'-RACE と 5'-RACE 法と RT-PCR 法を用いてスプライシングバリエントの同定を行った。MGL1 と MGL2 において、転写開始点がエキソン 6 と 7 の間のイントロンに存在するバリエントを検出した。MGL1 のバリエントを MGL1v3、MGL2 のバリエントを MGL2v5 と命名した。すでに報告のある膜貫通型蛋白の MGL と異なり、細胞内と膜貫通ドメインを欠いており、ネックドメインの途中から始まり CRD を持つ構造であることが予測された。また、MGL2 では、さらに CRD 領域に挿入のあるタイプのバリエント MGL2v6 を検出した。

2.2. スプライシングバリエント特異的な検出系の確立：mRNA 検出とバリエントの組織分布

バリエント特異的な領域にプライマーを設計し、RT-PCR 法によるスプライシングバリエントの臓器分布を解析した。EST データベースに登録されていた MGL スプライシングバリエントと考えられた MGL2v2 は、MGL1 と MGL2 と同様に広い組織分布を示した。一方、精巢で検出された新規のスプライシングバリエントでは、MGL1v3 は限られた組織（大脳、小脳、心臓、小腸 [遠位]、盲腸、大腸、卵巣、精巢、脾臓、リンパ節、皮膚）に発現が見られたのに対し、MGL2v5 は胸腺以外のほとんどの組織で発現が確認された。MGL2v6 由来と考えられるサイズのバンドは MGL2v5 よりも少ない組織（大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、精巢、脾臓、リンパ節）で検出された。

2.3. スプライシングバリエント特異的な検出系の確立：蛋白質検出系の確立

MGL1 と 2 それぞれのバリエント特異的な領域の 4 箇所からペプチド配列を 5 種類を選出し Fmoc 法により合成し、免疫原としポリクローナル抗体の作製を行った。動物細胞発現系により MGL1v3、MGL2v5 と MGL2v6 の動物細胞と大腸菌の発現ベクター (pCMV-Tag4c と

pET-21a (+) を作製し、既存の発現ベクターも含めて動物発現系と大腸菌発現系でのスプライシングバリエーションのタンパク質の発現を試みた。動物細胞発現系として COS-1MGL 一過性トランスフェクタント細胞の作製を試みたところ、MGL1, MGL2, MGL2v2 でのみタンパク質の発現が確認出来た。一方、大腸菌発現系では、リコンビナント MGL(MGL1v3, MGL2v5, MGL2v6)が発現する事が確認出来た。COS-1MGL 一過性トランスフェクタント細胞可溶化物とリコンビナント MGL を発現する大腸菌の可溶化物を用いて、抗リコンビナント MGL1 ポリクローナル抗体と抗ペプチド抗体の MGL バリエーションへの結合性についてウエスタンブロット法にて検討した。バリエーション特異的な領域の 4 箇所（箇所）のペプチド配列について作製したポリクローナル抗体全てにおいて、検出が可能であることが確認出来た。

3. 精巣における MGL1 及び 2 さらにそれらのスプライシングバリエーションの発現解析

MGL1v3, MGL2v5, 及び MGL2v6 の何れにも比較的強い発現のみられた精巣を対象に、さらに解析を行った。

3.1. 抗 MGL モノクローナル抗体による発現解析

MGL1 特異的なモノクローナル抗体 LOM-8.7 と MGL2 特異的なモノクローナル抗体 URA-1 による組織染色により、精巣と精巣上体での MGL 陽性細胞の分布を調べた。LOM-8.7 と URA-1 による精巣と精巣上体の組織染色の結果、精巣のマクロファージ、精細管内の精子形成細胞、精巣上体の間質のマクロファージと管腔内の精子の塊に抗体の結合が観察された。そこで、生殖細胞に発現するバリエーションの発現ステージを成体マウスと思春期のマウスを用いて検討した。LOM-8.7 による組織染色の結果ではステップ 7 以降の精細胞で染色像が観察されたのに対し、URA-1 ではステップ 7 からステップ 9 の精細胞で染色像が観察され、ステップ 9 の後半より染色像が観察されなくなった。しかし、LOM-8.7 と URA-1 の両方で精細管内腔へ放出される直前の精子の鞭毛断面で染色が観察され、精巣上体の精子でも染色像が観察された。思春期のマウスを用いた結果、精細管内では、生後 29 日目以降のマウスで MGL 陽性細胞が観察されたことから、円形の精細胞よりも前のステップの精細胞では、MGL が発現しないことが確認出来た。

3.2. 抗 MGL2v5&2v6 N 末端ペプチド抗体による発現解析

連続しないステップの精細胞が URA-1 により染色されたことから、MGL2 のバリエーションがいずれかのステップに発現している可能性があると考え、抗 MGL2v5&2v6 N 末端ペプチド抗体による組織染色を行った。精巣において、精細管内の精子形成細胞の精母細胞が anti-MGL2v5&2v6 N 末端ペプチド抗体により染色された。この抗体は減数分裂前期の一次精母細胞の合糸期（zygotene）に核内出現してきたに細い糸状の構造に結合した厚糸期（pachytene）では、染色分体と平行して走る構造物を染色していることから、抗体の結合部位はシナプトネマ構造に局在することが示唆された。複糸期（diplotene）で、待ち針状の

染色像となり移動期 (diakinesis) では粒状に局在した。減数分裂中期の染色体の赤道面への配列像が観察される細胞では、粒状の抗体結合部位は染色体から離れ細胞質全体に拡散し、二次精母細胞では短いヒモ状の染色像が観察された。核に局在する事から、精巢の核抽出物を用いた抗 MGL2 C 末端ペプチド抗体によるウエスタンブロットを行ったところ、MGL2v5 と MGL2v6 に相当する分子量にバンドが検出された。

3.3. 精子形成細胞における MGL バリエントの発現解析

一次精母細胞厚糸期 (pachytene) と精細胞 (spermatid) の cDNA ライブラリーを用いた PCR の結果、MGL1v3 が一次精母細胞厚糸期と精細胞 (spermatid) に、MGL2v6 が一次精母細胞厚糸期の精子形成細胞に mRNA レベルでの発現が確認された。抗 MGL2v5&2v6 N 末端ペプチド抗体による組織染色での染色像は MGL2v6 の分布を示していると考えられた。また、MGL1 の発現は見られなかったことから全長 MGL1 特異的な抗体 LOM-8.7 により染色された精細胞の染色は MGL1v3 によるものであると示唆された。

[まとめ]

本研究において私は、*Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製を試み、組み換え ES 細胞を得た。*Mgl* 遺伝子のスプライシングバリエント MGL1v3、MGL2v5 と MGL2v6 を同定し、これらの検出法を確立した。抗 MGL モノクローナル抗体による染色の結果、精子形成細胞と精子の鞭毛に染色部位を確認した。抗 MGL2v5&2v6 N 末端ペプチド抗体による精巢の組織染色を行った結果、これらのバリエントがシナプトネマ構造に局在することを明らかにした。精子形成細胞の一次精母細胞厚糸期 (pachytene) の cDNA ライブラリーに MGL2v6 が検出されたことから、シナプトネマ構造に局在した染色像は MGL2v6 の分布を示していると考えられた。

本研究により、本来はマクロファージとその類縁細胞に主に発現していると考えられていた MGL 及び、そのスプライシングバリエントが精子形成細胞においてユニークな分布を示すことが明らかとなった。減数分裂装置におけるレクチンの存在を示した最初の報告であり、減数分裂における糖鎖認識の重要性を提案できると考えている。