

審査の結果の要旨

氏 名 森川 明子

「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ーションの同定と精巣における発現解析」と題する本研究は、真核生物、特に高等動物の細胞に発現する糖鎖認識分子（レクチン）の中で、カルシウムイオンに依存しないいわゆる C 型レクチン構造と機能の多様性に関する研究である。生体分子としての糖鎖の特徴はその構造が多様であることである。しかし糖鎖の機能が、糖鎖認識分子であるレクチンに依存しているとすると、限られた数の遺伝子の産物であるレクチンに対応する以上の種類の糖鎖が存在する生物学的な意味が問われることになる。この疑問に対する答えは一つではないが、mRNA のスプライシングによって多様な遺伝子産物が作られるという可能性は大きい。スプライシングバリエーション及び相同性の高い複数の遺伝子（マウス MGL の場合 MGL 1 と MGL 2 ）の産物によるヘテロオリゴマーの形成によって、高度の多様性が確保できると考えられる。しかし、従来レクチン遺伝子のスプライシングバリエーションが実際に蛋白質として発現ししかも異なる機能を持つという可能性に関して、確固たる証明がなかった。学位申請者はマクロファージの及び樹状細胞に発現する主要な 2 型膜貫通型の C 型レクチンであるマクロファージガラクトース型 C 型レクチン（MGL）のバリエーションの機能的な多様性と分布の特性の解明を目指し、ユニークな発見をした。すなわち、マウスにおいて、精巣の精原細胞における MGL スプライシングバリエーション蛋白質の発現を初めて示し、その細胞内分布に際立った特徴があることを示した。本論文では、この発見の内容とそこに至る経緯が述べられている。本論文は三つの章からなり、*Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製、新規 MGL スプライシングバリエーションの同定と分布の解析、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がそれぞれのタイトルである。

第一章 *Mgl2* の遺伝子欠損マウスの作製では、マウス MGL における第二の遺伝子である *Mgl2* 遺伝子の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削除することにより *Mgl2* 遺伝子欠損マウスの作製に関する研究が述べられている。PCR スクリーニングが可能な Targeting vector とサザンブロットでのスクリーニングのみ可能な Targeting vector を作製した。組換え体 ES 細胞クローンを取得し、キメラマウスが得られたことが述べられている。

第二章、新規 MGL スプライシングバリエントの同定と分布の解析では、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新しいスプライシングバリエントの検出に成功したことがまず述べられている。膜貫通型蛋白である MGL と異なり、細胞内と膜貫通ドメインを欠いてネックドメインの途中から始まり CRD を持つ構造である MGL1 のバリエント MGL1v3、MGL2 のバリエント MGL2v5 及び MGL2v6 である。MGL2v6 は CRD 領域に挿入があった。mRNA レベルでは、MGL2v2 と MGL2v5 は広い組織分布を示した。一方、MGL1v3 は大脳、小脳、心臓、小腸 [遠位]、盲腸、大腸、卵巣、精巣、脾臓、リンパ節、皮膚に発現が見られたのに対し、MGL2v6 由来と考えられるサイズのバンドは大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、精巣、脾臓、リンパ節で検出された。バリエント特異的な領域の 4 箇所からペプチド配列 5 種類を合成し、免疫原としてポリクローナル抗体の作製を行った。動物発現系と大腸菌発現系でのスプライシングバリエントのタンパク質を発現させ、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が MGL バリエントに結合することをウエスタンブロット法にて証明した。

第三章、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ントの発現解析、では、MGL1v3、MGL2v5、及び MGL2v6 の何れに関しても比較的強い発現のみられた精巣を対象に、主に免疫組織化学的な方法でこれらの mRNA の発現状態と蛋白質産物の分布の解析を行った結果が述べられている。まず、MGL1 特異的なモノクローナル抗体である LOM-8.7 と MGL2 特異的なモノクローナル抗体である URA-1 による組織染色により、精細胞成熟のステップについてそれぞれのレクチンの発現が検討された。LOM-8.7 染色像が後期の全ステップに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、その後消失した。MGL2v5 及び 2v6 を特異的に認識するポリクローナル抗体による組織染色を行ったところ、精巣において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細い糸状の構造に結合した。厚糸期 (pachytene) では、染色分体と並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。抗体結合部位が核に局在する事から、精巣の核抽出物を材料に別の部位を認識する抗 MGL2 ポリクローナル抗体によるウエスタンブロッティングを行ったところ、MGL2v5 と MGL2v6 に相当する分子量にバンドが検出された。さらに、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 分析の結果、MGL2v6 が一次精母細胞厚糸期に発現が確認された。従って、MGL2v5 及び 2v6 を特異的に認識するポリクローナル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ことが強く示唆された。

本研究において学位申請者は、マクロファージガラクトース型 C 型レクチンの遺伝子及び遺伝子産物の多型とその生物学的な意義を理解するための基礎に関して、極めて正統的なアプローチを行い、重要な知見を得た。すなわち、レクチン遺伝子のスプライシングバリエントが実際に蛋白質として発現していることを初めて示した。さらに、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レクチン及び、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を明らかにした。染色体におけるレクチンの存在を示した最初の報告であり、減数分裂過程への糖鎖認識の重要性を示唆するブレークスルーとして、細胞生物学及び糖鎖生物学の領域において価値の高い研究成果である。よって、本研究を行なった森川明子は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。