

審査の結果の要旨

氏 名 Oo-puthinan, Sarawut

本研究は、マクロファージの表面に発現することによって発見された C 型レクチンで、単糖としてはガラクトースと N-アセチルガラクトサミンに特異的性を有する MGL の糖鎖認識特異性の分子基盤を明らかにした結果を述べたものである。マウスには相同性が高く遺伝子座が隣接する mMGL1 及び 2 があるが、それら二者の糖鎖認識特異性の違いに特に注目している。mMGL1 と 2 はユニークなカルシウム依存型レクチンで、II 型の膜貫通型糖蛋白質でありカルボキシル末端側に一つの糖鎖認識ドメイン (CRD) を持つ。少なくとも mMGL1 は、糖鎖を含む抗原の取込みと提示、遅延型過敏症の感作時に重要な細胞交通の制御、抗原によって惹起された組織リモデリングの、ウイルス感染などにおいて重要な役割を持つことがノックアウトマウスの解析などから明らかになっている。mMGL1 と 2 の 2 つの遺伝子の細胞外ドメイン (ECD) に相当する蛋白質に対する糖鎖の結合性の比較研究から、これらのレクチンは糖鎖認識特異性が異なることが明らかとなった。すなわち、mMGL1 は Lewis-X 構造 (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc) の糖鎖に高い親和性があるのに対して、mMGL2 は β -GalNAc または α -GalNAc を含むムチン様構造に親和性が高かった。これが内在性リガンドの違いなどをもたらすとすると、mMGL1 と mMGL2 の発現の違いは細胞機能に大きな影響を与える可能性があり、特異性の分子基盤の解明は重要と考えた。また、mMGL1 がフコースを含む Le^x に高い親和性を有することはガラクト - ス型 C 型レクチンとしては通常ありえないと考えられていたことも、重要な疑問点であった。さらに、リコンビナント型の mMGL1 及び 2 の ECD は明らかに異なる糖鎖に認識特異性を示したのに対して、CHO 細胞に発現させた全長の mMGL1 と 2 は Le^x を多数含むポリマーである Le^x-bio-PAA だけでなく β -GalNAc または α -GalNAc を多数含むポリマー (β -GalNAc または α -GalNAc-bio-PAA) に同程度の親和性を示した。このように遺伝子全長を動物細胞に発現させた時に見られる特異性の変化を説明できる一つの仮説は、mMGL1 と 2 がオリゴマー構造を形成しそれによって特異性が変わったと考えることであった。

本論文は基本的には二つの部分から成り、第一章では MGL1 及び 2 の糖鎖認識特異性の違いの構造的な基盤を構築することを目指し、第二章ではオリゴマーを形成した MGL の糖鎖認識特異性が変化するかどうかを解明することを目指した。第一章はさらに二つの部分から成り、前半では特定のアミノ酸に変異を導入して特異性を解析する分子生物学的なアプローチを用い、後半では NMR を用いたアプローチを述べている。第二章においても用いた方法は分子生物学的なものであり、MGL1 及び 2 がオリゴマーを形成するように改変し、糖鎖に対する特異性が

どのような影響を受けるかを解析した。

第一章「mMGL1によるLe^x認識及びmMGL2によるGalNAc認識の分子機構」の前半は「部位特定変異導入後のmMGL1とmMGL2による結合実験」と題され、mMGL1とmMGL2のCRDの部位特定変異導入の結果が示されている。ここでは、変異導入をアミノ酸の異なるものの相互変換という形で行い、糖認識特異性の違いを決めているアミノ酸の同定がを目指された。リコンビナントmMGL1、mMGL2、及びそれらの改変体は、可溶性のCRDとして大腸菌にて調整され、ガラクトースセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製された。固相化したLe^x-Bio-PPAとβ-GalNAc-Bio-PPAへのこれらの蛋白質の結合が表面プラズモン共鳴 (SPR) システムによって測定された。mMGL1のCRDの61、89、111、125番目の位置のバリン、アラニン、スレオニン、及びフェニルアラニンを、MGL2の対応する位置にあるアミノ酸に置換するとLe^x-Bio-PPAの結合性が低下し、これらのアミノ酸残基がMGL1のCRDのLe^xに対する特異性を決定していることが明かとなった。同様に、mMGL2のCRDへの変異導入から、61、89、125番目の位置のロイシン、アルギニン及びチロシンがβ-GalNAcとの優先的な結合に重要であることが明かとなった。一方、mMGL2の限られたアミノ酸残基を置き換えるだけ、すなわちR89A、S111T、及びR89A/S111T、でLe^xに対する結合性を再構築でき、70%以上の結合性の上昇がみられた。mMGL1から、β-GalNAcへの結合性が再構築できた変異体はA89Rのみであった。従って、mMGL1のCRDにおけるアラニン89とスレオニン111及び、mMGL2のCRDにおけるアルギニン89は、それぞれの糖鎖認識特異性に極めて重要であることが確認できたと言える。MGL2のCRDとGalNAcの相互作用を分子モデリングによってロイシン61、アルギニン89、ヒスチジン109のGalNAcとの直接の相互作用、及びチロシン125の間接的な関与が示された。

これに続いてフロントルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) によって多種類のオリゴ糖に対する mMGL1、mMGL2 及びそれらの改変体の結合特異性の解析が行われた。mMGL1、2、及びそれらの改変体を固相化しこれらのカラムからの蛍光標識オリゴ糖の溶出時間の遅れから相対的な親和性が決定された。Le^x と GalNAc (この場合はグロボシド) に対する相対的な結合性は、変異を導入したレクチンが Le^x GalNAc、又は Gal に関係ない糖鎖に対する結合性を持つことはないことが判明した。

第一章の後半は「mMGL1CRDのLe^xに対する結合部位のNMRによる同定」と題され、NMRを用いMGL1とガラクトースモノマー及びLe^xとの相互作用をNMRを用いて、解析した結果が述べられている。NMRを用いて、交差飽和法および化学シフト摂動法により、原子レベルにおいて、mMGL1のLe^xおよびメチルガラクトース結合部位の同定を行った。Le^xのガラクトース残基は、ガラクトースモノマーを認識する残基と同じ残基であるグルタミン92、アスパラギン酸94、トリプトファン96、アスパラギン117、アスパラギン酸118と相互作用が示された。一方フコースは、ガラクトース結合部位に近接するアラニン89、アスパラギン酸94、

スレオニン 111, トリプトファン 116, アスパラギン 117, アスパラギン酸 118 により構成される領域と相互作用を形成することが示された。フコースまたはマンノース結合型のレクチンにおいては、Le^xのフコース残基がレクチンのカルシウム結合部位に結合することが示されている。これに対して、mMGL1 において Le^xのガラクトース残基がカルシウム結合部位に結合することが示されたことは、これがこのレクチンのユニークな特性であることを明白に示している。NMR 解析の結果は、アラニン 89 とスレオニン 111 が Le^xに対する特異性の発現に関与することが示されている部位特異的変異実験の結果と一致する。さらに、フェニルアラニン 97, グリシン 98, グリシン 104 において、Le^x結合に伴う化学シフト変化が観測されたが、交差飽和の影響は観測されなかったことから、Le^x 結合に伴い、mMGL のグリシンリッチループ領域に構造変化が誘起されることが初めて示された。これらの発見は、C 型レクチンの糖鎖認識機構を構造生物学的荷明らかにする極めて重要な業績である。

第二章では、「mMGL1 及び 2 のホモ / ヘテロオリゴマー形成と Le^x 及び β -GalNAc との相互作用」と題され、mMGL1 及び 2 がホモまたはヘテロオリゴマーを形成する可能性とその際に糖鎖認識特異性が変化する可能性について検証した結果が述べられている。mMGL1 又は 2 の cDNA を CHO 細胞にトランスフェクトし、蛋白質を化学的に架橋してから免疫沈降した。電気泳動の結果からホモダイマー及びホモテトラマーの存在が明かとなった。ジスルフィドで共有結合しているオリゴマーを作製するために、mMGL1 と 2 の ECD のアミノ末端に 4 アミノ酸 (システイン-グルタミン酸-システイン-リジン) CECK を遺伝子レベルで連結した。これらの遺伝子を大腸菌に発現させ、mMGL1 と 2 単独または共存下でリフォールドさせた。この方法で人工的に SS 結合を作らせたレクチンについて SDS-PAGE にて解析した結果テトラマーが最も多いことが分かった。同じ方法で作製された mMGL1 と 2 のヘテロオリゴマーとして、ダイマー、トリマー、テトラマーが検出された。SPR 法で Le^x-bio-PAA 及び β -GalNAc-bio-PAA との親和性を測定したところ、CECK 配列を付加した mMGL1 及び 2 の ECD はいずれも Le^x と β -GalNAc の両方に対する親和性が増大したことが判明した。非共有結合によるオリゴマーや CRD のリコンビナント体ではこのような大きな増大は見られなかった。mMGL1 と 2 の糖鎖認識特異性が CECK の付加によるオリゴマー形成によって変化し、Le^x と β -GalNAc を見分ける能力を低下させたと考えられた。

以上のように、本研究はマクロファージに発現して多様かつ免疫学的に重要な機能を持つ mMGL1 と mMGL2 の CRD による Le^x と GalNAc の認識における構造的な基盤を分子生物学的な手法及び構造生物学的な手法で明らかにした。また、細胞に発現した mMGL1 と 2 がホモ及びヘテロオリゴマーを形成すること、その結果糖鎖認識特異性が変化することを明らかにした。以上の結果は、C 型レクチンの糖鎖認識分子の生物学における重要性、マクロファージ及びその類縁細胞の細胞機能の免疫学における重要性に鑑みて、糖鎖生物学及び免疫学の発展に資するところが絶大である。よって本研究を遂行した Sarawut Oo-puthinan は博士 (薬学)

の学位を得るに相応しいと判断した。