

氏 名	お 尾 ざき 崎 けい 恵 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 531 号
学位授与の日付	平 成 7 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	腹 腔 マ ク ロ フ ァ ー ジ レ ク チ ン の 構 造 と 機 能 に 関 す る 分 子 生 物 学 的 研 究

論文調査委員 (主 査) 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 伊 藤 信 行 教 授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

動物レクチンは、糖タンパク質糖鎖の認識による糖特異的なエンドサイトーシス、細胞間認識、生体防御などに関与している。エンドサイトーシスにかかわる動物レクチンとしては、1974年 G. Ashwell により肝実質細胞の類洞面に局在し血液中のアシアロ糖タンパク質（脱シアル化された糖タンパク質）を肝細胞へ取り込むレセプターとしてガラクトースに特異的なレクチン（asialoglycoprotein receptor）が単離されている。

著者の所属した研究室では、ラットの腹腔のマクロファージにも肝レクチンに類似するアシアロ糖タンパク質レセプター（macrophage asialoglycoprotein binding protein, M-ASGP-BP）が存在することを見出し、このマクロファージレクチンをコードしていると推定される cDNA のクローニングに成功している。また、その塩基配列より推定した全アミノ酸配列は、ラット肝レクチン（rat hepatic lectin, RHL）の主要成分である RHL-1 と高い相同性をもつことが示されている。肝レクチン RHL は RHL-1 と少数成分 RHL-2/3 からなるヘテロオリゴマーとしての複雑な分子構造をとることが判明しており、糖特異的なエンドサイトーシスレセプターとしての機能についても未だ不明な点も多い。

ところが、マクロファージレクチンは肝レクチンによく似た構造をもちながらも、よりシンプルな分子構造を持っていると考えられ、エンドサイトーシスレセプターの実験モデルとしても有用であると思われる。そこで、単離した cDNA を用い COS 細胞で発現させることにより、マクロファージレクチンの構造とアシアロ糖タンパク質レセプターとしての機能との関連性を検討し、以下の知見を得た。

第 1 章 マクロファージレクチンのアシアロ糖タンパク質レセプターとしての機能発現

著者はまず単離したマクロファージレクチンをコードしていると考えられる cDNA を SV40 プロモーターをもつ発現ベクター pdKCR に組み込み、COS-1 細胞に導入したところ、COS-1 細胞は Ca^{2+} 依存的、糖特異的にアシアロオロソムコイドを細胞内へ取り込む活性を示した。すなわち、RHL-1 類似の単一サブユニットの導入によりアシアロ糖タンパク質レセプターの機能発現が可能であることが判明した。これは肝レクチンがエンドサイトーシス型レセプターとして機能するためには 2 種類のサブユニットを必

要とするのと大きく異なっていた。また、COS-1細胞表面にはマクロファージ表面（細胞あたり約1,000個）の100倍以上のレクチンが高発現し、ほぼ肝細胞表面レベルのレクチンシグナルが得られ、組み換えM-ASGP-BPについて様々な解析をおこなうことが可能になった。

第2章 マクロファージレクチンのエンドサイトーシスにおける細胞内移行シグナルの解析

COS-1細胞発現系を用いて糖特異的エンドサイトーシスにおけるレセプターの構造と機能の関連を分子レベルで明らかにするために、レセプターの細胞内移行シグナルに着眼した。最近LDLレセプターなどのエンドサイトーシスレセプターにおいて細胞内移行シグナルとして細胞質領域のチロシン残基の重要性が見出されている。M-ASGP-BPにもN末細胞質領域に1個のチロシン残基(Tyr-5)が存在しており、その重要性について検討した。著者はまずこのTyr-5がリン酸化されていることを明らかにした。次にTyr-5をアラニン、フェニルアラニンに置換したものとTyr-5を欠失させた変異cDNAを作製し、そのエンドサイトーシス活性を比較したところ、欠失体およびアラニン置換体ではエンドサイトーシス活性が顕著に減少しており、その効率が低下していた。

また、チロシンをフェニルアラニンに置換したものは野生体の約80%程度の効率を示した。以上より細胞質領域Tyr-5はレセプターの細胞内移行シグナルとして重要であり、またその働きはある程度フェニルアラニンによって代用できることが明らかとなった。

第3章 マクロファージレクチンの糖鎖結合特異性の解析（肝レクチンとの比較）

マクロファージレクチンは肝レクチンの主要成分RHL-1と高いホモロジーを有するが24アミノ酸からなる挿入配列をもち、そのサブユニット構造も異なっている。両レクチンは共にガラクトース、N-アセチルガラクトサミンに対し特異的ではあるが、その糖鎖結合様式には差異があると考えられたので特異性について検討した。COS-1細胞表面の組み換えマクロファージレクチンおよびヒト肝腫瘍細胞HepG2細胞表面の肝レクチンについて、アシアロオロソムコイドの結合に対する各種阻害物による阻害実験をおこなった。阻害物としてネオ糖タンパク質、価数の異なる合成および天然糖鎖リガンドを用いて調べた結果、マクロファージレクチンも肝レクチンと同様に多価リガンドに強い親和性を持つクラスター効果を示したが、マクロファージレクチンはガラクトースに、肝レクチンはN-アセチルガラクトサミンにより特異的であった。また、両者の認識する糖の空間配置についても相違点がみられ、マクロファージレクチンは肝レクチンに比べより柔軟な糖鎖認識様式をもつことが明らかとなった。

以上の研究は、ラット腹腔マクロファージに見出されたガラクトース特異的なレクチンの構造と機能の関係を明らかにすることにより、生体防御の中心をなす貪食細胞マクロファージの機能と動物レクチンとの関連に新しい重要な知見を加えたものである。

論文審査の結果の要旨

近年、様々な動物レクチンが生体内における糖鎖情報の媒体として多様な働きを持つことが明らかにされて来ている。著者は、最近ラット腹腔マクロファージに見出された動物レクチンであるアシアロ糖タン

パク質受容体の cDNA を COS 細胞に発現させることによりマクロファージレクチンの構造と機能に関する研究を行い以下のような新しい知見を得た。

著者はまず、単離したマクロファージレクチンをコードしていると考えられる cDNA を SV40 プロモーターを持つ発現ベクター pdKCR に組み込み COS-1 細胞にトランスフェクションした。得られた組み換え COS-1 細胞はカルシウム依存的、糖鎖特異的にアシアロオロソムコイドを細胞表面に結合し、さらに細胞内に取り込む活性を示した。すなわち単一のサブユニットの導入によりエンドサイトーシス受容体機能の発現が可能であることが分かった。また、COS-1 細胞表面には細胞当たり約 1000 個と腹腔マクロファージの 100 倍以上のレクチンが高発現しており、本システムはマクロファージレクチンの機能解析に適当な実験系であることが示された。著者はそこでまず、最近、LDL 受容体などのエンドサイトーシス受容体において細胞内移行シグナルとして細胞質領域の Tyr 残基の重要性が見出されている点に注目し、本受容体の細胞内移行シグナルの解析を行った。マクロファージレクチンの N-末端細胞質領域に 1 個のチロシン残基 (Tyr-5) が存在している。そこでこの Tyr-5 を Ala, Phe に置換したものおよび Tyr-5 を欠失させた変異 cDNA を作成し、これらを COS-1 細胞にトランスフェクションした。変異体受容体を発現した細胞は野生型を発現した細胞とほぼ同程度のアシアロオロソムコイドを結合したが、そのエンドサイトーシス活性は顕著に減少を示し、インターナリゼーション効率の低下が見られた。すなわち、エンドサイトーシス活性における Tyr-5 の重要性が明らかにされた。また、Tyr を Phe の置換したものでは野生型の約 80% 程度の効率を示し、Tyr の働きはある程度 Phe による代用されることが明らかとなった。次に、著者はマクロファージレクチンの糖鎖結合特異性の解析を、従来よく研究されている肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体と比較しながら検討した。その結果、両レクチンはこれまでガラクトース特異的レクチンとして一群にまとめられていたが、実はマクロファージレクチンはガラクトースに、一方、肝レクチンは N-アセチルガラクトサミンに特異的であることが明らかになった。また、種々のネオ糖タンパク質、合成および天然の糖鎖リガンドを用いて調べたところ、両者の認識する糖の空間配置についても相違点がみられ、マクロファージレクチンは肝レクチンに比べより柔軟な糖鎖認識様式を持つことが明らかとなった。

以上本研究は、新しいマクロファージレクチンの構造と機能を解明することにより生体内における糖鎖の役割を知るうえで重要な知見を得たものである。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成 7 年 5 月 2 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。