

学 位 論 文 題 名

Cellular and molecular studies on lectins
of the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum.

(細胞性粘菌 Dictyostelium discoideum のレクチン
に関する細胞生物学的、分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

細胞性粘菌 Dictyostelium discoideum は、下等な真核生物である。この生物の発生過程は簡単であるが、走化性、細胞運動、シグナル伝達、形態形成、細胞分化など発生学上の種々の問題を含んでおり、発生生物学の良いモデル実験生物である。粘菌の胞子は適当な条件下で発芽し、単細胞の粘菌アメーバとなる。粘菌アメーバはバクテリアを摂食して増殖するが、餌がなくなると発生を開始する。発生開始後数時間で、一群の細胞（センター細胞）が cAMP のパルスを放出し、それに対する走化性により、約 10 万の細胞が集合し多細胞集合体となる。やがて突起が形成され、それを中心に細長く伸びた移動体となる。この移動体の前部約 1/4 は予定柄細胞（子実体の柄に分化）が、後部の 3/4 は予定胞子細胞（胞子に分化）が占めている。移動体は光を受けたり乾燥すると移動をやめ、カルミネーション期を経て柄と胞子からなる子実体を作る。この発生の全過程は約 24 時間で完了する。

Rosen ら（1970年）は細胞性粘菌にガラクトース結合性レクチンが存在することを報告した。レクチンは二価性の糖結合性タンパク質の総称であり、マメ科植物の種子から赤血球凝集素として発見されたが、後に動物やバクテリアからも見いだされ、生物にひろく存在することがわかった。その機能については肝臓によるアシアロ糖タンパク質の吸収分解（アシアロ糖タンパク質受容体）、生体防御（センチニクバエレクチン）など、一部の動物レクチンで明らかになった。しかし、植物レクチンをはじめ多くのレクチンについては、その糖結合性や一次構造が明らかになったものもあるが、

生物学的機能について明らかになったものは少ない。

本研究は、粘菌の発生過程におけるレクチンの生物学的役割を明らかにする目的で行われた。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* のレクチン discoidin は discoidin I (d I; 分子量 28000)、discoidin II (d II; 分子量 26000) の二種からなり、それぞれ四量体を形成している。当初 d I は細胞集合期に合成されることから細胞接着に関与するといわれていた。しかしその一次構造が明らかになり、動物組織における細胞外マトリックスタンパク質に含まれる細胞結合ドメイン (Gly-Arg-Gly-Asp 配列) が見いだされたことから、現在では集合期における細胞と基質間の接着に少なくとも関与すると考えられている。また、d I はその糖結合ドメインにより、粘菌が消化できないバクテリア由来の多糖と細胞質で結合し、次いで多ラメラ体 (食胞の一種) にパッケージされる。その後 exocytosis によって細胞外に出され、基質面に広がるものと思われる。発生後期の d I の機能については Gly-Arg-Gly-Asp 配列を持つ合成ペプチドが形態形成を阻害することから、d I が後期発生にも重要であると考えられている。d II の研究は進んでおらず、これまで一次構造は未決定であった。従来の研究では、d II は移動体の予定胞子細胞の小胞中に分布し、胞子外皮を形成するムコ多糖の予定胞子抗原と特異的に結合する事から、胞子外皮の形成に関わると考えられるが直接的な証明はない。粘菌の発生過程における discoidin の役割の解明には、免疫組織学的、分子生物学的方法など、多角的なアプローチが必須である。本研究では ①解析に必要な discoidin に対するモノクローナル抗体産生クローンの分離と結合特異性の解析、②免疫組織学的方法による発生過程での discoidin の分布、③ d I の四量体、単量体の細胞内分布の研究、④ d II cDNA の一次構造の解析の 4 つの課題について実験を行った。

粘菌細胞より Sepharose-4B カラム、N-galactosamine アフィニティカラムを用いて d I、d II を精製し、マウスに免疫した。脾臓免疫を含む 3 回の細胞融合で、抗 discoidin 抗体産性株を 15 株得た。そのうち 6 株の抗体 (DC1, DC2, DC4, DC5, DC6, dII-1) を選び、ELISA, イムノブロット法、ドットブロット法により結合性を検討した。その結果、DC1, DC5, DC6 抗体は未変性 d I に、DC4 抗体は変性 d I に、dII-1 抗体は変性 d II に特異的に結合し、他の粘菌タンパク質には結合せず、結合特異性の高い抗体の分離に成功した。次に抗体間の結合競合実験を行ってエピトープの

異同を解析した。その結果、DC1 と DC4 は部分的に競合しエピトープの一部を共有していることが示唆された。また DC4 抗体は dII-1 抗体と競合することから、d II への交叉反応が示された。その他の抗体は独自のエピトープを認識すると考えられた。

次に、これらの抗体を用いて、蛍光抗体法により発生過程における discoidin の分布を調べた。粘菌細胞をスライドガラスの上で発生させ、in situ でメタノール固定し、ホルマリン固定のまま抗体で処理した。その結果、d I は集合期の細胞より顕著にみられ、集合体、移動体では組織内部ではなく表面に多量に分布していた。カルミネーション期では予定柄領域の細胞において新たな発現があることがわかった。また、未分化な細胞群 (Anterior-like cells) にも強い発現がみられた。d II は移動体ではみられず、カルミネーション期の予定胞子細胞で発現が顕著にみられた。従って、d I、d II はそれぞれ予定柄細胞、予定胞子細胞に主に局在するレクチンであり、発生後期においてもそれぞれの機能をはたしていることが強く示唆された。

発生前期における d I の機能に関連して、d I の細胞内分布についても調べた。四量体認識抗体 (DC1) は多ラメラ体を染色したのに対して、単量体認識抗体 (DC2) は細胞質を染色した。免疫電顕法による結果も同様であった。このことは多ラメラ体には四量体のみが局在し、単量体は細胞質に留まることを示唆しており、四量体が特異的に多ラメラ体にパッケージングされると考えられる。

d II の一次構造を明らかにするために cDNA のクローニングを行った。粘菌の発現 cDNA ライブラリーを dII-1 抗体を用いてスクリーニングし、250万クローンから1つの陽性クローンを得た。インサートの塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定したところ、ペプチドシーケンサーで決定した d II のペプチド断片の配列と一致した。さらにその cDNA をプローブとして非翻訳領域を含む 1.2kb の D2 クローンを分離・解析した。d II は 257 個のアミノ酸からなり、分子量は 28574 であった。この分子量は d I (分子量 28391) とほぼ一致している。また、その配列中には d I の細胞結合ドメイン (Gly-Arg-Gly-Asp 配列) と共通の配列があることから、d II においてもこの配列を介した生物活性が存在する可能性が高い。糖結合部位についても d I、d II 間で高いホモロジーがみられた。現在、d II のゲノム DNA の構造解析を行っている。また、アンチセンス法により d II の発現を抑制し、胞子形成におけるレクチンの役割を調べていきたい。

学位論文審査の要旨

主査	教授	落合	廣
副査	教授	谷藤	茂行
副査	教授	石川	鑛
副査	教授	吉田	静夫

学位論文題名

Cellular and molecular studies on lectins of the cellular slime mold,
Dictyostelium discoideum

(細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*のレクチンに関する細胞生物学的、分子生物学的研究)

糖に結合し、赤血球を凝集するタンパク質であるレクチンは19世紀後半にStillmarkにより発見されていらい活発に研究され、最近では年に2000以上の論文が出される。

しかし、植物レクチンの生物学的機能は現在でも不明のままである。体制の簡単な細胞性粘菌の利点を生かして最終的に生物学的機能を明らかにするべく、本論文では解析のプロープとしての単クローン性抗体の分離、それらの抗体の性質の解明、発生過程における時間的・空間的なレクチンの局在を解析している。また、これまで未決定の粘菌レクチン、ディスコイジンⅠⅠ(dIIと略称)のcDNAの一次構造を明らかにし、ディスコイジンⅠⅠはアミノ酸配列でディスコイジンⅠ(dIと略称)と50%のホモロジーがあり、Arg-Gly-Asp配列からなる細胞結合部位の存在を明らかにしている。当該研究は、ディスコイジンⅠとⅠⅠが粘菌の発生過程においてダイナミックに変動し、また両者の構造的な類似性にもかかわらず2つのレクチンが生体内で対称的に分布することを明らかにし、レクチンの生物学的機能解明の方向を明確した。内容はおよそ4部からなり、以下本研究の特色と新たに発見した点を中心に述べる。

1) まずディスコイジン解析のプロープとして、モノクローナル抗体の分離を行っている。最終的にディスコイジンⅠとⅠⅠにたいする抗体、またディスコイジンの単量体、四量体に対

するそれぞれ特異的な抗体産生クローンを分離した。従来粘菌のディスコイジンの研究ではポリクローナル抗体が用いられており、この場合ディスコイジン I と II では、アミノ酸配列上で 50 % のホモロジーがあるため、対称的な抗原で吸収しない限り I または II に特異的な道具として使う事が出来なかった。このモノクローナル抗体の導入で容易にディスコイジン I と II を別個に追跡することが可能になった。

2) そこで、これらの抗体を用いて粘菌の発生過程におけるディスコイジン I と II の時間的・空間的な分布の変化を調べている。この解析において当該論文は、生物体をスライド上に固定化する事により、ディスコイジンのダイナミックな局在を丹念に追跡している。

Barondes らのグループは生物体サンプルを抗体で処理する場合、遊離の生物体を懸濁状態とし、液の交換時には低速の遠心で沈殿させている。このような方法では脆弱なサンプルが部分的に壊れるのは避けがたく、蛍光染色の経時的な変化の追跡が困難であった。当該論文では、生物個体をスライド上に固定した状態で、スライドを移動させることにより処理液を交換している、従って遠心の必要はなく生物個体はインタクトに保持されている。このような方法をもちいて解析した結果、dI は集合期の細胞より顕著にみられ、集合体・移動体では組織内部でなく表面に多量に分布していた。また子実体形成期では予定柄領域の細胞において新たな発現があることが分かった。dII については移動体では見られず、子実体形成期の予定胞子細胞に顕著に見られたが、この時、電子顕微鏡オートラジオグラフィによる解析では dII は細胞外の胞子のコート中に存在した後、胞子が成熟すると外壁の中間層に分布した。

3) また先に述べたように、ディスコイジン I の単量体、四量体それぞれに特異的な抗体が分離されている。この抗体を用いて、細胞内の分布を調べたところ、単量体は細胞質に、四量体は食胞の一種である多ラメラ体に局在する事を発見した。この事は、少なくとも発生初期において活性型である四量体は多ラメラ体においてその機能を発現する事を示唆している。

4) これまで未決定の dII の cDNA の塩基配列を明らかにした。この解析により、dII のアミノ酸配列は dI と 50 % のホモロジーを持ち、dI に見られる細胞結合部位を持つことを明らかにした。

以上の研究成果はレクチン研究の大家である Barondes 一派の長年の研究に種種の新しい知見を付け加えたものであり、今後レクチンの生物学的機能を明らかにする基礎を築いたものと考えられる。研究発表にたいする質疑応答も活発に行われ、十分満足すべきものであり、審査員一同は申請者が学位(理学)を受ける資格を有するものと認めた。