

## マクロファージにおけるムチン型糖鎖の生理機能解析

涌井 宏優 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

## 【背景・目的】

生体内では、多くの膜貫通・分泌タンパク質が糖鎖修飾を受け、糖タンパク質となる。糖鎖は多種多様な糖転移酵素によって合成され、多様な構造を呈する。タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に付加された糖鎖を O 型糖鎖と呼び、そのうち 1 つ目の単糖が N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であるものをムチン型糖鎖と呼ぶ。ムチン型糖鎖修飾は数ある糖鎖修飾の中でも頻度が高いもので、代表的なものには体外へ分泌される粘液の主成分である、ムチンなどが挙げられる。

ムチン型糖鎖は合成の過程で「コア (core)」構造を経由する。コア構造には core 1 から core 4 があり、core 1 構造はセリン/スレオニン (Ser/Thr) 残基に結合した GalNAc に、ガラクトース (Gal) が付加された、Gal-GalNAc-Ser/Thr 構造のことを指す。この Gal 付加反応は糖転移酵素である core 1 ガラクトース転移酵素 (C1galt1) によって触媒される。また、C1galt1 が機能するためにはその特異的シャペロンである core 1 synthase specific molecular chaperone (Cosmc) が必要である。そのため、C1galt1 または Cosmc を欠損するとムチン型糖鎖は正常に合成されなくなる。C1galt1 を全身で欠損させたマウスは胎生致死を示すことが報告されている。また、Cosmc の欠損でも C1galt1 の欠損と同じ表現型が見られる。これらのことから、ムチン型糖鎖はマウスの正常な発生に必要であることが分かる。しかし、ムチン型糖鎖が生体内で具体的にどのような機能を果たしているのかは解明されていない。

マクロファージには、ムチン型糖鎖修飾を多く受ける Tim-4 が発現している。I 型膜貫通タンパク質である Tim-4 は、アポトーシス細胞の "eat me" シグナルであるホスファチジルセリンの受容体である。Tim-4 はムチンドメインを持っており、多くのムチン型糖鎖が付加されると予測されている。そこで、本研究ではムチン型糖鎖の、Tim-4 の機能との関わりに着目し、マクロファージ特異的な Cosmc コンディショナルノックアウトマウスを解析した。

## 【材料・方法】

## ・マウス

マクロファージ特異的 Cosmc 欠損マウス (オス: *LysMCre::Cosmc<sup>flav</sup>*、メス: *LysMCre::Cosmc<sup>flav/flav</sup>*、C57BL/6J 系統) を用いた。コントロールには、野生型 (WT) として同腹仔の Cre の個体を使用した。実験には 8~12 週齢の個体を使用した。

## ・定量的 RT-PCR

Cosmc 欠損マウスから腹腔常在マクロファージを回収し、Cosmc 遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR により検証した。

## ・レクチンブロット

Cosmc 欠損マクロファージはムチン型糖鎖を正常に合成できなくなっていると考えられる。そこで、core 1 合成の前駆体構造である Tn 抗原 (GalNAc-Ser/Thr) を認識するレクチンである

Helix pomatia agglutinin (HPA) を用いてレクチンブロットを行い、糖タンパク質上のムチン型糖鎖の変化を調べた。

## ・食食アッセイ

Tim-4 欠損腹腔常在マクロファージは、アポトーシス細胞を食食する能力が低下することが報告されている。Cosmc 欠損マクロファージでは Tim-4 タンパク質上のムチン型糖鎖が欠損すると考えられるので、このマクロファージの食食能を *in vivo* で測り、Tim-4 タンパク質上のムチン型糖鎖の重要性を調べた。C57BL/6J マウスから取り出した胸腺細胞をデキサメタゾンでアポトーシス誘導し、野生型と Cosmc 欠損マウスの腹腔内に注入した。それぞれの腹腔常在マクロファージによる食食率はフローサイトメーターで測定した。

## ・マクロファージ細胞表面における Tim-4 の発現

Cosmc 欠損マウスの腹腔常在マクロファージを採取し、Tim-4 の発現量をフローサイトメーターで測定した。

## 【結果】

## ・定量的 RT-PCR

マクロファージ特異的 Cosmc 欠損マウスの腹腔常在マクロファージでは、Cosmc の遺伝子発現が 9 割程度減少していた。一方、C1galt1 の発現は mRNA レベルでは変化が見られなかった。

## ・レクチンブロット

腹腔常在マクロファージから抽出したタンパク質でレクチンブロットを行った。WT マクロファージのタンパク質には Tn 抗原がほとんど見られなかったのに対して、Cosmc 欠損マクロファージのタンパク質は Tn 抗原陽性であった。このことから、Cosmc 欠損マクロファージは core 1 構造を作れず、ムチン型糖鎖は不完全な状態にあることが確認された。

## ・食食アッセイ

Cosmc 欠損腹腔常在マクロファージの食食能は、WT のものに比べ有意に減少した。

## ・マクロファージ細胞表面における Tim-4 の発現

Tim-4 陽性腹腔常在マクロファージの、Tim-4 の MFI (mean fluorescent intensity) は、WT マウスに比べ Cosmc 欠損マウスで有意に減少していた。一方、mRNA レベルでは Tim-4 の発現量に変化は見られなかった。

## 【考察】

以上の結果から、Cosmc 欠損腹腔常在マクロファージでは Tim-4 上にムチン型糖鎖が正常に合成されなくなり、その結果 Tim-4 タンパク質の細胞表面での発現量が低下したと考えられる。アポトーシス細胞の食食能が Tim-4 欠損マウスと同程度減少したことから、Tim-4 の機能にムチン型糖鎖が必要であることが示唆された。

今後はウエスタンブロッティングにより Tim-4 の分解や細胞内局在の変化を調べる。さらに、Tim-4 以外の分子が今回確認された表現型に関わっている可能性についても検討していく。