

糖鎖合成関連分子 *Cosmc* ノックアウトマウスを用いた新規ムチン型糖鎖機能の探索

鈴木 陸 (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】

糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、生体内の多くの膜貫通・分泌タンパク質は糖鎖修飾を受けている。多様な構造が知られている糖鎖の中でもタンパク質のセリンまたはスレオニン (Ser/Thr) 残基に酸素原子を介して糖鎖が結合している構造を *O*-型糖鎖と呼び、その糖鎖の一つ目の単糖が *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。

ムチン型糖鎖の生合成は複数の糖転移酵素の連続した反応によって行われる。ムチン型糖鎖の基本的な構造である Core 1 構造は Ser/Thr 残基に結合した GalNAc にガラクトース (Gal) が結合した構造である。この Gal の付加反応は糖転移酵素である Core 1 合成酵素 (C1galt1) によって行われる。C1galt1 は Core 1 構造合成を触媒する唯一の酵素であり、その機能には C1galt1 特異的分子シャペロン (core 1 synthase specific molecular chaperone, *Cosmc*) が必須である。そのため、C1galt1 または *Cosmc* のどちらか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 欠損マウスと *Cosmc* 欠損マウスは同様の表現型を示し、胎性致死となることが報告されている。このことはムチン型糖鎖が生体の機能に重要な役割を持っていることを示している。しかし、ムチン型糖鎖の生体レベルでの機能については、ほとんどわかっていない。

C1galt1 または *Cosmc* を欠損したマウスは胎性致死になってしまうことがムチン型糖鎖の機能解析を困難にしている要因の一つである。そのため、本研究では CAG プロモーター制御下のタモキシフェン誘導型 Cre ドライバーマウスを使用することで生後時期特異的に全身で *Cosmc* を欠損させたマウス (KO マウス) を作製し、ムチン型糖鎖の新規機能の探索を試みた。

【材料・方法】

・マウス

タモキシフェン誘導型 *Cosmc* 欠損マウス (オス: CAG-Cre^{ERT2}::*Cosmc*^{loxY}; メス: CAG-Cre^{ERT2}::*Cosmc*^{lox/lox}; KO マウス) は、Cre リコンビナーゼを誘導するため 6 週齢のマウスにタモキシフェン (75 mg/kg) を 5 日間連続で腹腔内注射し、注射 5 日目を誘導 0 日目とした。また、Cre(-) のマウスに同様の処理を行いコントロールとした。

・体重、臓器重量と血算

タモキシフェン誘導 10 日目のマウスを解剖し、各種臓器及び末梢血を採取した。各種臓器は重量を測定後、ホルマリン固定し組織学的解析のためにパラフィンブロックを作製した。末梢血は血算の測定に用いた。

・血漿臨床化学検査

脾臓の炎症を評価するため血漿中のアミラーゼ活性を測定した。また、腎機能を評価するため血漿中のクレアチニン濃度を測定した。

・ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色

パラフィンブロックを薄切し HE 染色による組織形態を観察した。

・レクチン染色

Cosmc の欠損による糖鎖抗原の変化を解析するため、糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンを用いて組織染色を行った。レクチンは Core 1 構造の前駆構造である GalNAc-Ser/Thr を認識する HPA レクチンを使用した。

【結果】

・体重、臓器重量と血算

KO マウスでは体重が減少した。臓器重量では、コントロールに比べ胸腺、脾臓、脂肪組織が減少し、腎臓では増加が観察された。血算では血小板数がコントロールの 10 分の 1 程度まで減少した。また、白血球数、赤血球数の減少も確認された。

・血漿解析

KO マウスの血漿中アミラーゼ活性はコントロールの 2 倍ほどに増加しており KO マウスが膵炎を起こしていることが示唆された。また、血漿中クレアチニン濃度は KO マウスで増加しており腎臓のろ過機能が低下していることが示唆された。

・HE 染色

脾臓では脾外分泌細胞の萎縮が認められた。また、白色脂肪組織で脂肪滴が小さくなっていることが確認された。腎臓では蛋白円柱が認められた。

・レクチン染色

脾臓、腎臓、脂肪組織を用いてレクチン染色を行った。いずれの組織においても KO マウスではコントロールに比べ HPA のシグナルが強かった。*Cosmc* の欠損により、糖鎖構造が変化したことが確認された。

【考察と今後の予定】

以上の結果よりムチン型糖鎖が胸腺、脾臓、脂肪組織、腎臓の機能に重要な役割を持っていることが示唆された。また、血小板減少については巨核球の終末分化に起因することがすでに報告されているが白血球、赤血球数減少については報告がない。しかし、上記のように様々な表現型が観察されているため、どの表現型が *Cosmc* の欠損を直接反映したものであるか判断するのは難しい。今後も本研究に用いたマウスを使用し表現型を探索していく。また、脂肪組織特異的ノックアウトマウス、脾臓特異的ノックアウトマウスを現在作製中でありこれらの組織において *Cosmc* 欠損の直接的な影響を評価していく予定である。

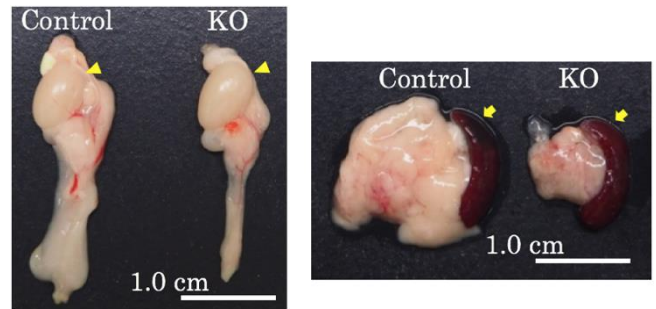


図1, タモキシフェン誘導 10 日目における脂肪組織(左)と脾臓(右)。左: 精巢(矢頭)に付着している白色脂肪組織。右: 脾臓(矢印)に付着している脾臓。