

遺伝子欠損マウスを用いたリンパ節における糖鎖の機能解析

濱野 彩音 (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】

糖鎖修飾は翻訳後修飾の一つであり、膜タンパク質および分泌タンパク質の多くは、粗面小胞体やゴルジ体に存在する糖転移酵素によって糖が1つずつ付加される。糖鎖はタンパク質の安定性の向上や品質管理、細胞間相互作用などに関与している。

リンパ節では、リンパ球がHEV (High Endothelial Venule: 高内皮細静脈) から組織内部に入り、樹状細胞からの抗原提示を受けて活性化される (参考文献1)。HEVの構造維持には、HEVを取り囲む細網線維芽細胞に発現するポドプラニンと、血小板に発現するCLEC-2 (C-type lectin like receptor-2: C型レクチン様受容体) の相互作用によるVE-カドヘリンの発現誘導が必要である (図1)。先行研究では、ポドプラニンまたはCLEC-2 KOマウスのリンパ節において、高内皮細胞の接着性の低下による重度の出血が報告されている (参考文献2)。また、ヒトポドプラニンとCLEC-2の結合にはポドプラニンに修飾される糖鎖の一種であるDisialyl-T構造が関わりとされている (参考文献3)。Disialyl-T構造は、T抗原にシアル酸が2個付加された構造であり、その生合成にはシアル酸転移酵素STX、Y (Sialyltransferase X、Y)が必要である。そこで、リンパ節におけるDisialyl-T構造の生体内機能を調べるため、STX、Yを両方欠損したマウスの表現型解析を行った。

T構造を認識するレクチンである *Maackia amurensis* lectin II (MALII) と反応後、蛍光標識二次抗体と反応させた。

【結果】

WT、XKO、YKOマウスのリンパ節と比較して、DKOマウスのリンパ節は多くが赤色であり (図2)、またHE染色ではDKOマウスでのみHEV外で赤血球が観察された。

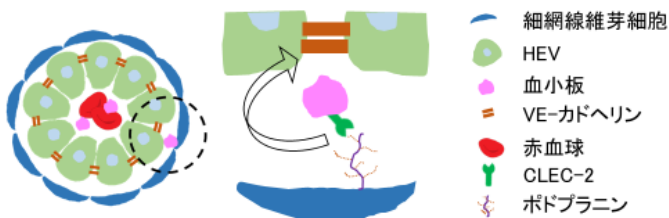


図1 HEVの構造維持の仕組み

【材料・方法】

(1) マウス

シアル酸転移酵素遺伝子STX、Yを両方欠損したマウス (以下DKOマウス)、STXのみを欠損したマウス (XKOマウス)、STYのみを欠損したマウス (YKOマウス) を作製し、表現型解析には10~12週齢のオス個体を用いた。コントロールとして野生型マウス (WTマウス) を用いた。

(2) 組織学的解析・免疫組織化学染色

鼠経・腋窩・腸間膜リンパ節はホルムアルデヒドで固定後、パラフィンブロックを作製し、マイクロームで3µmに薄切した組織切片をHE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色した。また、薄切切片に抗原賦活化とブロッキングを行った後、一次抗体またはレクチンと反応させ、その後二次抗体と反応させた。検鏡および写真撮影は、BIOREVO BZ-X800 (Keyence) を使用した。

(3) ウェスタンブロッティング (WB)

リンパ節はLysis bufferで溶解し、総タンパク量を揃えてSDS-PAGEで展開し、メンブレンへ転写した。その後、抗β-アクチン抗体、抗ポドプラニン抗体、抗VE-カドヘリン抗体、Disialyl-

WT XKO YKO DKO

鼠経リンパ節



腋窩リンパ節



腸間膜リンパ節



図2 各KOマウスのリンパ節の様子

次に、シアル酸転移酵素欠損における糖鎖構造の変化を確認するため、MALIIを用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、DKOマウスではDisialyl-T構造の傍皮質における減少が確認された。Disialyl-T構造の減少はWBでも確認された (図3)。一方でポドプラニンの発現量に差は見られなかった (図3)。また、HEV構造維持にVE-カドヘリンの発現が必須であるため、免疫組織化学染色によってその発現量を解析したところ、XKOマウスと比較して、DKOマウスではHEVにおいてVE-カドヘリン量のわずかな減少が観察された。以上のことから、STX、Yの両酵素の欠損により、HEV構造が部分的に崩壊し、リンパ節での出血が引き起こされたことが示唆された。

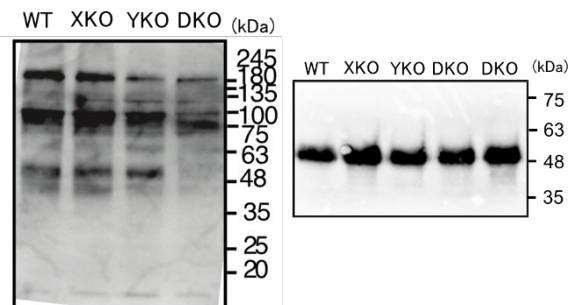


図3 腸間膜リンパ節を用いたWBの結果 (左: MALII、右: ポドプラニン)

【考察・今後の展望】

DKOマウスでもDisialyl-T構造の存在が確認されたことから、Disialyl-T構造の合成には他のシアル酸転移酵素がSTX、Yと協働して関与している可能性が考えられた。今後はそれらの遺伝子も欠損したマウスの表現型を解析し、どのシアル酸転移酵素が生体内でDisialyl-T構造の生合成経路に必須か検討する予定である。

【参考文献】

- (1) 片貝智哉, 生化学, 2013, 84(3):183-8
- (2) BH Herzog et al., Nature, 2013, 502(7469):105-9
- (3) M Nagae et al., Cell Structure, 2014, 82(7):1512-8