

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

血中糖タンパク質の由来臓器同定方法の確立

研究代表者 赤間 智也¹⁾

研究分担者 阿部 学²⁾

¹⁾ 関西医科大学医学部薬理学講座 ²⁾ 新潟大学脳研究所モデル動物開発分野

研究要旨

我々は特定臓器からどのような糖タンパク質が血中に移行しているかを網羅的に同定する方法の確立を試みる。具体的には Ggta1 遺伝子欠損マウスの特定臓器のみに Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性による糖鎖構造 Gal α 1-3Gal を持つ血中糖タンパク質を検出することで、特定臓器が産生する糖タンパク質を網羅的に同定する。本実験では中枢神経特異的 Nestin プロモータ依存的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの掛け合わせで作製した Ggta1(-/-)/Rosa26(+/-Ggta1-mTmG)/ Nestin-Cre マウスの血漿中に抗 Gal α 1-3Gal 抗体陽性のタンパク質が存在することを確認した。また Ggta1 遺伝子欠損マウスに Ggta1 を発現しているグリオーマを脳に移植すると、移植後 1 週間以降から血中に Gal α 1-3Gal 構造を持つ糖タンパク質が検出され、その量はグリオーマの増殖と共に増加していたことから、グリオーマ由来で血中に流出する糖タンパク質が存在し、それが検出可能であることが示された。これらのことから特定臓器から産生された糖タンパク質を血中で検出するという本システムが計画通りに進行するものと考えられた。

A. 研究目的

我々は脳などの特定臓器からどのような糖タンパク質（およびエクソソームのような糖鎖修飾された細胞外小胞）が血中に移行しているかを網羅的に同定するべく、遺伝子改変マウスを用いた方法論を確立する。血中のどの糖タンパク質が脳由来であるかを知る方法が確立できれば、特定の糖タンパク質の糖鎖構造変化を検出することで血液検査による神経疾患や脳腫瘍などの早期診断方法を構築できることが期待される。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

糖転移酵素である Ggta1 の遺伝子欠損マウスの脳に Ggta1 を発現させ、その遺伝子産物の活性により合成される糖鎖構造 Gal α 1-3Gal (α Gal 構造) を持つ血中糖タンパク質を検出することで、脳が産生する糖タンパク質を網羅的に同定する。 α Gal 構造は GSB4 レクチンあるいは抗 α Gal 抗体

により検出されるが、Ggta1 遺伝子欠損マウスの組織はこのレクチンや抗体に対して陰性であることが既に報告されている。本研究では Ggta1 遺伝子欠損マウスはゲノム編集技術を用いて作製する（脳研究所にて作製済み）。脳特異的に Ggta1 を発現させる方法として、細胞系譜解析に用いられる Rosa-mT/mG ミニジーンに P2A 配列を介して Ggta1 を連結させたミニジーンを作製し、これをマウスの Rosa26 座位にノックインすることで、Cre リコンビナーゼを発現している臓器でのみ Ggta1 が発現するような遺伝子改変マウスを作製する（脳研究所にて作製済み）。Cre ドライバーマウスとしては Nestin-Cre マウスを用いることを予定している（Nestin-Cre は入手済み）。これらのマウスを掛け合わせて Ggta1(-/-)/Rosa26(+/-Ggta1-mTmG)/Nestin-Cre マウスを作製し、その血液から GSB4 レクチンあるいは抗 α Gal 抗体陽性の糖タンパク質を単離してそのタン

パク質を質量分析器により同定する。この解析にて検出された分泌タンパク質はその脳での発現を RT-PCR や免疫染色及びウェスタンブロッティングなどで確認する。また、脳腫瘍から血中に流出する糖タンパク質を同定する目的で、Ggtal 遺伝子欠損マウスの脳に α Gal 陽性のマウスグリオーマを移植し、移植前後における血漿中の α Gal 陽性の糖タンパク質を検出し、それを質量分析器により同定する。本研究に関する動物実験計画は関西医科大学動物実験委員会にて審査の上、承認されている。

C. 研究結果

これまでの解析により脳研究所にて作製された Ggtal 遺伝子変異マウス (Ggtal (-/-)) は抗 α Gal 抗体に反応する糖タンパク質を持たないことが確認されている。また Ggtal を発現させるためのミニジーンを Rosa26 座位に挿入した遺伝子改変マウスも脳研究所にて作製された。これらのマウスを交配させ、Ggtal (-/-) / Rosa26 (+/mTmG-Ggtal) マウスを作製した。このマウスは通常は Gal α 1-3Gal の末端糖鎖構造を持たないが、Cre リコンビナーゼを発現させることにより、その発現臓器にて Gal α 1-3Gal の末端糖鎖構造を持つ糖タンパク質が合成されることを確認した。そこで中枢神経系で Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre トランスジーンを持つマウスを掛け合わせて Ggtal (-/-) / Rosa26 (+/mTmG-Ggtal) / Nestin-Cre Tg マウスを作製し、このマウスから血漿を調製して抗 α Gal 抗体にてウェスタンブロットを行ったところ、いくつかのバンドが検出され Nestin-Cre トランスジーンにより Ggtal が発現し、その酵素活性によって α Gal 構造が糖タンパク質の末端糖鎖構造として合成されたことがわかった。さらにこの血漿から抗 α Gal 抗体に結合する画分を得て抗 α Gal 抗体にてウェスタンブロットを行なったところ、 α Gal 構造を有する糖タンパク質が濃縮されていることが確認された。

また Ggtal (-/-) マウスの脳に Ggtal を発現しているグリオーマ細胞を移植し、 α Gal 構造を指標として腫瘍細胞から血中に流出する糖タンパク質が検出されるかどうか実験を行った。グリオーマを移植したマウスは移植前に 2 回と移植後 1 週ごとに 4 週間血漿を採取した。この血漿中の α Gal 陽性糖タンパク質を抗 α Gal 抗体を用いて免

疫沈降を行い、得られた画分を抗 α Gal 抗体にてウェスタンブロットで解析したところ、移植前の血漿サンプルにはみられず移植後の血漿サンプルに経時的に強くなるシグナルが確認された。このことはグリオーマ細胞から血中に流出する糖タンパク質が存在し、その量はグリオーマが増殖するにつれて流出量も多くなることを示している。今後はこの画分について質量分析機によるプロテオミクス解析を行い、分泌タンパク質の同定を行う予定である。

D. 考察

Nestin-Cre トランスジーンを持つ Ggtal (-/-) / Rosa26 (+/mTmG-Ggtal) マウスの血中に α Gal 構造を持つ糖タンパク質が検出されたことから Cre リコンビナーゼ依存的に Ggtal が発現し、その Ggtal 発現細胞で作られた糖タンパク質上に α Gal の末端糖鎖構造が作られているものと考えられる。Nestin プロモーターは中枢神経にて優先的に発現しているが、発生の過程で中枢神経以外の組織でも発現することが知られているため、血漿サンプルに検出された α Gal を有するタンパク質が全て中枢神経由来であるとは言えない。一方で、Ggtal (-/-) マウスに Ggtal (+) グリオーマを移植する実験では、Ggtal はグリオーマ細胞にしか発現していないので血中で α Gal を持つ糖タンパク質が検出された場合はそのタンパク質はグリオーマ細胞由来であると断定できる。組織特異的プロモーターを利用した Cre リコンビナーゼ発現系では複数の組織特異的プロモーターを使って共通に検出される糖タンパク質を見つけるか、検出した分泌タンパク質が実際にその組織で発現しているかを確認する必要があるものと考えられる。

グリオーマ移植実験により脳に移植されたグリオーマから血中に流れ込んでくる糖タンパク質が存在することが明らかとなった。移植後 1 週目から弱く検出され、週を追うごとに強くなることから、グリオーマの増殖に比例して流出量が多くなっているのではないかと考えられた。一方で検出される糖タンパク質のパターンには特に変化がなかったことと、培養グリオーマが培養液中に放出する α Gal 陽性糖タンパク質とはパターンが異なっていたことから、グリオーマが産生する全ての α Gal 陽性糖タンパク質が血中に移行して

いるのではなく、特定の糖タンパク質のみが何らかの経路を介して血中に移行していることが示唆された。

また、今回の研究ではウェスタンブロットにて血中糖タンパク質のみの検出を行ったが、あらかじめ可溶性タンパク質とエクソソームとを分離してから免疫沈降することで Ggta1 が発現している細胞由来のエクソソームも検出することが可能である。しかし糖脂質上の α Gal 構造は Ggta1 だけでなく別の糖転移酵素遺伝子である A3galt2 の寄与も少なくないとする報告もあり、Ggta1 遺伝子欠損だけで血中エクソソーム上の糖脂質の α Gal 構造が無くなっているかどうかは不明である。このことから A3galt2 の遺伝子欠損マウスの作製も脳研究所にて進めており、必要であれば二重変異マウスの作製も検討する。

E. 結論

Ggta1(-/-)/Rosa26(+/-mTmG-Ggta1)/Nestin-Cre Tg マウスの血漿サンプルから Ggta1 発現細胞由来の Gal α 1-3Gal 修飾糖タンパク質を検出することに成功した。またグリオーマ移植実験によりグリオーマが産生する糖タンパク質のうちの一部が糖タンパク質のみが血中に移行していることが確認された。今後、質量分析器による解析でどのようなタンパク質が細胞特異的に血中タンパク質を産生しているか調べる予定である。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし