

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 α Gal糖鎖抗原を合成する糖転移酵素Ggta1のノックアウトマウスと過剰発現マウスを交配することで妊娠中に母マウスから仔マウスに、また仔マウス組織から母マウスに移行する血中糖タンパク質の網羅的解析系の確立を試みた。まずGgta1過剰発現母マウスとGgta1ノックアウト父マウスの交配で生まれたGgta1ノックアウト新生仔マウスの血液に対して抗 α Gal抗体による免疫沈降を行い、この画分中にある α Gal陽性糖タンパク質をウェスタンブロットにて確認したところ複数のバンドを得たことから、母マウスから仔マウスに移行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。またGgta1ノックアウト母マウスとGgta1過剰発現父マウスを交配し、Ggta1過剰発現仔マウスを妊娠した母マウスから血液を採取し上記と同様の方法で調べたところ、やはり α Gal陽性糖タンパク質が複数検出された。これらの結果は妊娠中の母親と胎児の間で特定の血中糖タンパク質が相互に移行していることを示すものであり、本方法を用いて移行タンパク質を網羅的に同定できると考えられた。

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特定臓器に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、特定臓器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）。一方で、 α Gal修飾糖タンパク質を高生産するマウスを入手するため、Ggta1 cDNAの上流にCAGプロモーターを連結し、このミニジーンをRosa26座位にノックインした遺伝子改変マウスも作製した（脳研究所との共同研究にて作製済み）。これらのマウスを交配することにより α Gal合成不全の母マウスに α Gal高産生の胎仔を妊娠、あるいは

α Gal 高産生の母マウスに α Gal 合成不全の新生仔を妊娠させ、それぞれの α Gal 合成不全のマウス個体から血液を採取して α Gal 陽性糖タンパク質を検出することにより母親-胎仔間を移行する糖タンパク質の同定を行う。血中の α Gal 陽性糖タンパク質の同定は GSB4 レクチンあるいは抗 α Gal 抗体を用いて α Gal 陽性糖タンパク質を単離し、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個体での発現を RT-PCR や免疫染色及びウェスタンブロットングなどで確認する。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 Ggta1 遺伝子変異マウス (Ggta1(-/-)、以下 Ggta1 KO と記す)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 Ggta1 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 (Ggta1(-/-)/Rosa26(+)/Ggta1-mG) マウス、以下 Ggta1 OE (overexpression の意)と記す)も脳研究所との共同研究にて作製した。Ggta1 KO マウスは全身で Gal α 1-3Gal の末端糖鎖構造を持たず、逆に Ggta1 OE マウスは全身にて Gal α 1-3Gal の末端糖鎖構造を持つ糖タンパク質を野生型マウス以上に合成していることを確認した。

そこで Ggta1 OE 母マウスと Ggta1 KO 父マウスの交配で生まれた Ggta1 KO 新生仔マウスから血液を採取し、その中の IgG を Protein G によるプルダウンで単離し抗 α Gal 抗体を用いたウェスタンブロットにて検出したところ陽性シグナルを得たことから、母マウスから仔マウスへの糖タンパク質の移行を本方法で検出できるものと考えられた。次に同じ交配で得た仔マウスの血液に対して抗 α Gal 抗体による免疫沈降を行い、この画分中にある α Gal 陽性糖タンパク質をウェスタンブロットにて確認したところ複数のバンドを得たことから、IgG 以外にも母マウスから仔マウスに移行する糖タンパク質が存在することが示された。また Ggta1 KO 母マウスと Ggta1 OE 父マウスを交配し、Ggta1 OE 仔マウスを妊娠した母マウスから血液を採取し上記と同様の方法で調べたところ、やはり α Gal 陽性糖タンパク質が複数

検出され、胎仔組織から母親に移行する血中タンパク質の存在も確認された。

この免疫沈降により得られたタンパク質画分をトリプシン処理し、得られたペプチドを質量分析器により解析して画分に含まれる糖タンパク質を同定した。Ggta1 OE 胎仔組織から Ggta1 KO 母マウスに移行する糖タンパク質の多くはプロテクチンと同定され、また Ggta1 OE 母マウスから Ggta1 KO 新生仔マウスに移行する糖タンパク質の多くはアポリポプロテイン群と同定された。プロラクチンは胎盤から母体に分泌される糖タンパク質であることが知られており、また妊娠中の胎仔に脂質やコレステロールを供給するため LDL-コレステロールが母体から胎仔に移行していることが知られている。これらの結果は本方法にて母体-胎仔組織間を移行する糖タンパク質が検出・同定できることを証明している。

D. 考察

Ggta1 KO マウスと Ggta1 OE マウスの掛け合わせを行うことで血中の母体由来の糖タンパク質と胎仔由来の糖タンパク質を区別することが可能となり、また抗体を用いて α Gal 糖鎖が付加されている血中タンパク質を単離・同定することで母親-胎仔組織間を移行する血中糖タンパク質を特定することができた。同定された糖タンパク質は母親-胎仔組織間を移行することが既に知られているものが多かったことから、本研究方法が予想通りに機能していることを示している。

母体と新生仔の間には胎盤が存在し、母体からの血液が直接新生仔に流入することはない。しかしながら新生仔の脆弱な免疫機能を補うため、母体からの IgG が胎盤を通過して新生仔に移行していることはよく知られている。また新生仔の発生に必要な脂質やコレステロールが LDL-コレステロールとして母体から供給され新生児に移行していることも知られている。逆に、胎児由来の組織である胎盤から合成され母体に移行するタンパク質もいくつか知られており、プロラクチンはその一つである。今回の研究で母-胎仔組織を移行する血中タンパク質として上記の糖タンパク質が検出されているが、これらの既知の母-胎仔組織移行タンパク質以外にどのようなタンパク質が検出されるのか非常に興味深い。しかし新生仔から得られる血液量は非常に限られており、そ

これから免疫沈降で回収されるタンパク質を全て同定するには免疫沈降のバックグラウンドを下げ、かつ質量分析機の感度を上げる必要がある。サンプル調製の過程等を改良しつつ研究を進めていく予定である。

また、今回の研究では血中糖タンパク質全体として検出を行ったが、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Ggtal1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Ggtal1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、Ggtal1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

Ggtal1 KO マウスと Ggtal1 OE マウスを用いることで α Gal 糖鎖の有無により血中タンパク質の由来を区別することに成功した。これらのマウスを交配させ、妊娠中の母-胎仔組織を移行する血中タンパク質を単離・同定した。この研究を継続して未知の母-胎仔組織移行タンパク質を同定する予定である。また、同じ実験システムを使って脳などの特定臓器から血中に移行する糖タンパク質の同定を進め、特定臓器の疾患に対するバイオマーカーの開発に繋げていきたい。

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

1. 第 43 回日本糖質学会年会（口頭発表）
2. 第 97 回日本生化学会大会（口頭・ポスター発表）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし