

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300152

研究課題名(和文) ムチン型糖鎖合成酵素遺伝子改変マウスによる巨核球分化機構の解明

研究課題名(英文) Loss of hematopoietic mucin-type O-glycan causes thrombocytopenia in mice

研究代表者

工藤 崇 (Kudo, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20288062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ムチン型糖鎖の機能は、その糖鎖構造解析や糖鎖合成が困難であるため不明な点が多い。成獣マウスの造血におけるムチン型糖鎖の機能を明らかにするためにムチン型糖鎖のコア1構造を合成する糖転移酵素C1galtとMx1-Creドライバーマウスとのコンディショナルノックアウトマウスの表現型解析をおこなった。このマウスは、重度な血小板減少症を発症し、巨大血小板の出現、出血時間の延長、骨髄中の巨核球の最終分化を示す胞体突起形成能が著しく低下した。これよりムチン型糖鎖は、最終巨核球分化と血小板産生に必要であり、ムチン型糖鎖を欠損したGPIb<sup>+</sup>の細胞内での減少は、タンパク質分解の増加によって生じたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mucin function has been difficult to characterize because its structure and synthesis are complex. To address the biological role of mucin-type O-glycans in hematopoietic cells, we conditionally ablated C1galt, which is essential for synthesis of mucin-type O-glycans. Inducible, Mx1-cre-mediated C1galt conditional knockout (Mx1-C1) mice exhibited severe thrombocytopenia, giant platelets, and prolonged bleeding times. There were few proplatelets in cultured Mx1-C1 primary megakaryocytes. Moreover, the expression of hypoglycosylated GPIb<sup>+</sup> protein in Mx1-C1 megakaryocytes and platelets was greatly reduced despite the fact that expression of gplb<sup>+</sup> transcript was unchanged. Our observations indicate that O-glycan is required for terminal megakaryocyte differentiation and platelet production and that the decrease in GPIb<sup>+</sup> in cells lacking O-glycan may be caused by increased proteolysis.

研究分野：生化学

キーワード：動物 糖鎖 発生・分化 血小板

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトにより、いくつかの動物種の全塩基配列が判明したが、それだけでその遺伝子の本来の機能が理解できる訳ではない。遺伝子によって発現されるタンパク質の性質は、分子レベルで解析するだけでは不十分であり、細胞、組織、個体レベルにおいての機能解析が必要である。さらに翻訳後修飾である糖鎖合成に必須な糖転移酵素には、多くイソ酵素が存在し、試験管内での解析結果が、生体内において反映されているかどうかは明らかではない。個々の遺伝子の各組織、細胞レベルでの機能および相互作用の解明、疾患との関連性については、まだまだ未解明な点が非常に多く残されているのが現状である。個体レベルでの遺伝子の機能の全体像を解明するためには、遺伝子改変マウスは最も有効なツールであり、疾患モデルマウスとして樹立できた場合、疾患原因究明、薬理検定や診断への利用、治療法開発の基盤を確立することが可能となる。

糖転移酵素は、粗面小胞体、ゴルジ装置にて逐次的に糖鎖を付加する酵素で、ヒトでは100種類以上の酵素の遺伝子が単離、解析されている。また、糖鎖の種類としては、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンに大別され、更に糖タンパク質は *N*-結合型と *O*-結合型に分けられる。粘液の主成分である糖タンパク質のムチン型糖鎖は、*O*-結合型糖鎖の一つであり、他の糖鎖構造に比べ、糖鎖の単離が非常に困難なため糖鎖構造解析が難しく、その性質についてもリンパ球のホーミングに重要なセレクトインのリガンドとしての機能以外はほとんど明らかになっていない。本研究で使用する糖タンパク質糖鎖の一つであるムチン型糖鎖合成を担うコア1構造合成酵素 (core 1 1,3-ガラクトース転移酵素 (C1gal t)) 遺伝子のノックアウトマウスを作製、表現型解析をおこなう。C1gal t 遺伝子完全ノックアウトマウスは、血管形成不全により胎生致死である (Xia L. et al, J Cell Biol, 2004) ことがすでに他のグループより報告されており、コンディショナルノックアウト (ckO) マウスを作製し、様々な Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配することにより組織別にムチン型糖鎖の表現型解析をおこなう。これらの遺伝子改変マウスの解析によりムチン型糖鎖の生体内での機能が解明され、さらに機能的糖タンパク質の同定およびヒト疾患との関係が明らかになれば飛躍的に糖鎖機能の理解が進歩すると考えられる。

## 2. 研究の目的

骨髄中の造血幹細胞においてムチン型糖鎖の機能を解明するために、Mx1-Cre マウスを使用した誘導型コンディショナルノックアウトマウスを作製、表現型解析をおこなう。さらに、ムチン型糖鎖の変化により機能異常をきたす分子、すなわちムチン型糖鎖のキヤ

リアタンパク質の同定をおこなうことを目的とする。具体的には、C1gal t 酵素が無くなることにより露出するレクチンより糖鎖改変タンパク質を濃縮して、質量分析にてタンパク質を同定する。問題点としては、マウスの骨髄中の巨核球細胞数は非常に少ないために、このようなプロテオミクス解析をおこなうためには非常に多くのマウスを必要とする。よって生体材料での解析と平行して、培養細胞を用いた実験系の確立を目指す。質量分析にて非常の多数の候補タンパク質が選別されるが *in silico* 解析により、表現型に關与している糖タンパク質を更に選別する。次に実際にそれら糖タンパク質候補分子に本当にムチン型糖鎖が結合しているかを確認する。その候補分子の糖鎖が失われることが表現型の原因分子であることを証明するには、個体レベルでの直接的な証明は不可能であるため、その候補分子自身のノックダウン細胞株もしくはノックアウトマウスの解析によって間接的に検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) ムチン型糖鎖合成を担うコア1構造合成酵素 (core 1 1,3-ガラクトース転移酵素 (C1gal t)) 遺伝子改変マウスの作製

生体におけるムチン型糖鎖の機能を解明するためにムチン型糖鎖コア1構造の合成酵素の遺伝子改変マウスを作製した。この酵素は、全身性に発現しており、また完全欠損マウスは胎生致死であるために、Cre-loxP 系を用いた ckO マウスを作製し、様々な Cre リコンビナーゼ発現のドライバーマウスと交配する。今回は、造血細胞での機能を見るために Mx1-Cre マウスを使用する。

### (2) polyI-polyC 誘導 Mx1-Cre マウスと の C1gal t ckO マウスの作製と末梢血表現型解析

合成 2 本鎖 RNA である polyI-polyC (pIpC) を腹腔内投与により Cre リコンビナーゼの発現が誘導され、主に骨髄内のほとんどの細胞で目的遺伝子が欠損される。C1gal t<sup>fllox/-</sup>/Mx1-Cre (C1-Mx1) マウスの末梢血を採取して血算およびギムザ染色、尾静脈の出血時間を測定する。血小板のサイズをフローサイトメトリー解析 (CD41 染色) によって判定する。

### (3) 骨髄および脾臓における巨核球数の確認

血小板産生細胞である巨核球数の異常があるかを、組織学的に解析する。骨髄および脾臓のパラフィン切片をヘマトキシリンエオジン染色し、検鏡により巨核球数を判定する。また、骨髄については、類洞血管に接している巨核球数も計測する。

### (4) 骨髄巨核球の分化能と胞体突起形成能の解析

血小板減少の原因として、血小板産生細胞

である巨核球の異常が考えられるために、骨髄巨核球分化能と巨核球最終分化である胞体突起形成能を解析する。巨核球は、造血幹細胞から様々サイトカインによって分化するが、エンドマイトーシスという特殊な核多倍体化(2N 4N 8N 16N 32N 64N 128N)をおこし、核および細胞が巨大化して成熟巨核球となる。この核多倍体化は、骨髄より巨核球を濃縮して、フローサイトメトリー解析によって解析する。胞体突起形成能は、骨髄より巨核球を濃縮して、一晚培養後抗チューブリン抗体の染色による形態を観察する。

#### (5) 脾臓摘出による血小板捕捉異常の解析

脾臓の肥大による血小板捕捉の亢進の可能性を否定するために、脾臓摘出マウスに pIpC により Cre リコンビナーゼの発現を誘導後、血小板の増減を確認する。

#### (6) 骨髄移植による原因細胞の特定

pIpC 腹腔内投与によって Mx1 プロモーターを誘導する場合、骨髄中の造血幹細胞以外の類洞の内皮細胞でも誘導されてしまう。よって、Mx1-C1 マウス由来の骨髄を野生型マウスに移植してから、pIpC の誘導をおこなうことにより造血細胞のみ遺伝子欠損されるようにした。そのマウスを使用して前述の(2)の解析をおこなう。

#### (7) 血小板/巨核球特異的糖タンパク質の骨髄における遺伝子発現解析

骨髄細胞より RNA を採取、cDNA を合成して、血小板/巨核球特異的な分子、cd41, gpIb, gpIb, gpIX の発現をリアルタイム PCR 法で確認する。

#### (8) 血小板糖タンパク質 GpIb の糖タンパク質異常についての解析

骨髄巨核球および末梢血の血小板における cd42b(GoIb) の発現をフローサイトメーターおよび Western 解析により確認する。

#### (9) 血小板の電子顕微鏡による微小形態解析

血小板の減少に伴い、巨大血小板が観察されたので、C1-Mx1 マウスの血小板より透過型電子顕微鏡観察によってその微小形態を解析する。

#### (10) 血小板における微小管タンパク質の発現解析

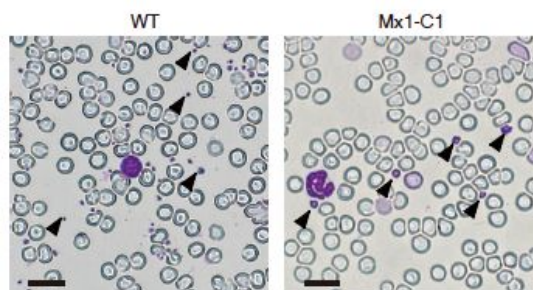
末梢血より血小板を分離して、チューブリンおよび チューブリンの発現を Western 解析より確認する。

#### (11) 糖鎖不全糖タンパク質の網羅的解析

C1-Mx1 マウスの末梢血血小板よりレクチンアフィニティーカラムによりムチン型糖鎖欠損糖タンパク質を粗精製して、質量分析によりムチン型糖鎖キャリアタンパク質の同定を試みる。

## 4. 研究成果

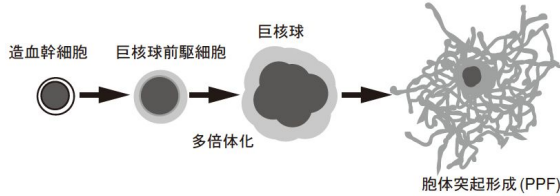
成獣マウスの造血におけるムチン型糖鎖の機能を解明するために、インターフェロンによる誘導型プロモーターをもつ Mx1-Cre マウスをドライバーマウスとしてコンディショナルノックアウトマウスを作製した(Mx1-C1 マウス)。Mx1 プロモーターは、通常は活性化しないが、合成二本鎖 RNA, pIpC の投与によりインターフェロンで誘導される GTP 結合蛋白により活性化される。pIpC 腹腔内投与により、骨髄、肝臓、脾臓においてほとんどの細胞で Cre リコンビナーゼによる組換えが生じる。pIpC を腹腔内に 1 日おきに 3 回投与し、2 週間後の Mx1-C1 マウスの末梢血の血算測定したところ、血小板数では顕著な減少が見られた。末梢血スミアのメイグリュワルドギムザ染色およびフローサイトメトリー解析により、Mx1-C1 マウスの末梢血中には巨大血小板が存在しており(図 1)、マウス尻尾切断による出血時間を測定した結果、Mx1-C1 マウスで顕著な出血時間の延長が観察された。



(図 1)

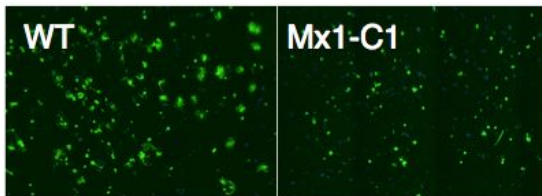
pIpC 腹腔内投与によって Mx1 プロモーターを誘導する場合、骨髄中の造血幹細胞以外の類洞の内皮細胞でも誘導される。Mx1-C1 マウス由来の骨髄を野生型マウスに移植してから、pIpC 誘導して造血細胞のみ遺伝子欠損させた。その結果、Mx1-C1 マウスと同等の末梢血における血小板減少、巨大血小板、出血時間延長が観察された。さらに血小板が脾臓に捕捉されることにより末梢血中の血小板減少する可能性を考慮し、Mx1-C1 マウスの脾臓を外科的に切除後に、pIpC 誘導をおこなった。脾摘なしの Mx1-C1 マウスと同等の結果が得られたことにより、血小板減少の原因が造血細胞の異常より起因することが予想された。そこで、骨髄および脾臓における巨核球数を計測したが、野生型と Mx1-C1 マウスで差は見られなかった。また、骨髄類洞血管に接着している巨核球数にも差はなかった。また、骨髄中における巨核球の分化状態の検討をおこなった。巨核球の分化は特殊であり、造血幹細胞から巨核球前駆細胞へ、次に核のみが多倍体化、細胞胞体自体も巨大化し、巨核球となる。最終分化としては細胞質部分が変形し胞体突起形成(proplatelet forming; PPF)細胞になる(図 2)。その胞体突起がちぎれて血小板として

骨髄の類洞などに放出される。



(図2)

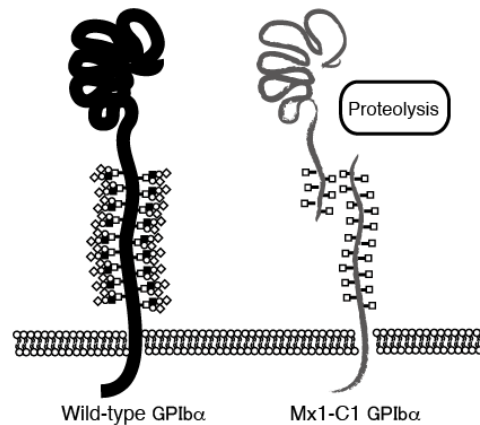
マウス骨髄由来の巨核球の分化状態について検証した結果、巨核球 DNA ploidy 解析による核の多倍体化は、正常であった。続いて骨髄より巨核球を Percoll 比重遠心法、BSA 濃度勾配法にて部分精製し、一晚無血清培地にて培養する PPF アッセイ (胞体突起形成能の検証実験) より、野生型は、巨核球/血小板マーカーである CD41 陽性細胞の約半数に胞体突起形成細胞が見られたが、Mx1-C1 マウスでは5%に減少した (図3)。さらに Mx1-C1 マウス由来の胞体突起は、長さも短く、分岐や突起も少なかった。



(図3)

Mx1-C1 マウスは、巨核球の最終分化異常により血小板産生能低下による血小板減少症を呈した。その原因分子を探索するために、ムチン型糖鎖をキャリアーする糖タンパク質として同定されている血小板糖タンパク質 GpIb に注目した。GpIb は、GPIb(GPIb-GPIb)-IX 複合体を形成して、フォンウィルブランド因子 (vWF) と結合して止血に重要な役割をもつ。常染色体劣性遺伝性の先天性巨大血小板症であるベルナル・スーリエ症候群は、*gplb* および *gplb* 遺伝子の先天性欠損であり、*gplb* および *gplb* 遺伝子のノックアウトマウスの表現型は、Mx1-C1 マウスのものとほとんど同じであった。GPIb はリガンド結合領域とマクログリコペプチド領域からなる膜結合タンパク質であり、マウス GpIb のマクログリコペプチド領域には73箇所のO-結合型糖鎖付加アミノ酸残基の Ser/Thr があり、全分子量の約30%が糖鎖修飾によるものである。最初に転写レベルの影響を調べるために骨髄における遺伝子発現を検討したところ、*cd41*, *gplb*, *gplb*, *gplX* いずれも野生型と Mx1-C1 マウスにおいて同等の発現を示した。しかしながら、フローサイトメトリー解析による血小板および骨髄巨核球における細胞表面 GpIb タンパク質の発現は、Mx1-C1 マウスで著しく減少しており、ウエスタンブロット解析においても GpIb タンパク質の著しい減少が確認された。つまり、遺伝子の発現は変化がないが、マクログリコペプチド領域に糖鎖修飾

がされないため、糖タンパク質として細胞内もしくは細胞表面に存在することができない。つまり、GpIb タンパク質上のムチン型糖鎖は、タンパク質分解酵素からの防御として機能することが考えられる (図4)。



(図4)

また、他の研究グループより、GpIb に加えて、GpII および GpVI もムチン型糖鎖をもっており、それらがタンパク質レベルでの発現が減少すること、vWF およびトロンビン刺激による血小板活性化の低下が報告されている。

血小板の微小形態の解析により、血小板形態を保持するために微小管数が多いことが観察された。微小管を構成するチューブリンおよびチューブリンのタンパク量は変わらないことから、胞体突起伸長異常からの巨大血小板の原因の一つとして考えられた。

Mx-C1 マウスは重篤な血小板減少症を示し、GPIb がその原因分子の一つであることを明らかにした。しかしながら、GPIb の発現は完全に消失しているわけではないので、GPIb 以外の分子の機能不全が病態の原因となっている可能性が考えられた。新たな血小板減少症の原因分子の同定するために、Mx-C1 マウスからの血小板を採取してムチン型糖鎖欠損タンパク質をレクチンにより粗精製し、ムチン型糖鎖を持つ糖タンパク質を質量分析により決定した。35種類の糖ペプチドを同定することに成功し、そのうち6種類が血小板に関連する分子であることが明らかになった。その中に前述した GpIIb も含まれていた。

*C1galT* 遺伝子改変マウスの表現型解析によって、糖鎖異常による疾患病態発現の新しい分子機序が明らかになった。タンパク質のみの解析ではこの糖鎖修飾による機能変化を見つけて出すことはできない。ここ10年で、糖鎖研究の基盤ツールである糖鎖機能解析、糖鎖合成、糖鎖構造決定の技術が整ってきており、今まで困難であったムチン型糖鎖の機能、構造、キャリアタンパク質の同定が可能になってきた。この遺伝子は全身性に発現していることから、様々な組織においてムチン型糖タンパク質の糖鎖機能を解明すること

が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. 工藤崇、高橋智 血小板減少症を呈するムチン型O結合型糖鎖欠損マウスの解析 **医学のあゆみ** 2014. (査読なし)
2. 工藤崇、高橋智 巨核球分化におけるムチン型糖鎖修飾の意義 **血液内科** 2014. (査読なし)
3. Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Ema M, Murata S, Ohkohchi N, Narimatsu H, Takahashi S. C1galt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. **Blood**. 122, 1649-1657 2013. doi: 10.1182/blood-2012-12-471102. (査読有り)

[学会発表](計2件)

1. 工藤崇 Loss of hematopoietic mucin-type O-glycan causes thrombocytopenia in mice. 第36回日本血栓止血学会学術集会 2014. 5. 26 (大阪)
2. 工藤崇、佐藤隆、萩原梢、上妻行則、山口高志、池原謙、濱田理人、松本健、依馬正次、村田聡一郎、大河内信弘、成松久、高橋智 C1galt1 欠損マウスは巨核球の最終分化異常による血小板減少症をおこす 第36回日本分子生物学学会年会 2013. 12 (神戸)

[図書](計1件)

Kudo T, Takahashi S, Mucin-type O-glycan in megakaryocyte differentiation. **Glycoscience: Biology and Medicine**, Springer 713-719, 2014.

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

工藤 崇 (KUDO TAKASHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20288062

### (2) 研究分担者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50271896

### (3) 連携研究者

なし