

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 松本 光史

指導教官 小野 憲一郎

論文題目 : 牛赤血球膜 Protein 4.2 の多型性に関する研究

哺乳動物赤血球の Protein 4.2 は、膜タンパク質総量の 5%を占める主要膜構成タンパク質のひとつであり、分子量 70-80 kDa の単一分子として検出される。約 10 種のヒト Protein 4.2 の遺伝子異常が知られ、それぞれのホモ接合型では Protein 4.2 の欠損と球状赤血球症等の赤血球形態異常が生じる。またヒトや牛のバンド 3 欠損に起因する遺伝性球状赤血球症では、バンド 3 含量の減少の程度に応じて、Protein 4.2 含量の低下が同時にみられる。さらにヒトの遺伝性有口赤血球症の一部では、正常な 72 kDa の Protein 4.2 分子に加え、74 kDa の変異分子の出現も知られている。これらの知見から、Protein 4.2 は陰イオン交換輸送体であるバンド 3 に結合して膜に存在し、バンド 3-アンキリン-スペクトリン間連結を強め、赤血球膜の安定化に寄与すると推測されている。しかしながら、これらはほとんど実証されておらず、赤血球膜における存在様式と生理機能は、実際はほとんど不明である。

本研究において、第 1 章では、虚弱新生仔牛奇形赤血球症の膜病態解析を発端に、牛赤血球 Protein 4.2 の 2 つのアイソフォームから成る表現型多型性について、第 2 章では、その分子基盤に

ついて、第3章では、2つの Protein 4.2 アイソフォームと赤血球膜との結合について解析した。

第1章 牛における Protein 4.2 多型性

奇形赤血球症を呈する仔牛の赤血球膜タンパク質分析から、分子量 76,000 の Protein 4.2 (P4.2/76)を持つ個体 P4.2⁷⁶の他に、P4.2/76 と 75,000 (P4.2/75)の2種類の Protein 4.2 を1:1であわせ持つ個体 P4.2^{76/75}と、P4.2/75 だけを持つ個体 P4.2⁷⁵が確認された。ついで、この2種類の Protein 4.2 について表現型の解析を行った。

多数個体から赤血球膜を得、電気泳動によって膜タンパク質を分離し、デンストメーターで分析した。健常成牛(計248頭)は、表現型として P4.2⁷⁶、P4.2^{76/75}、および P4.2⁷⁵という3種類のグループに分けられ、その比率はそれぞれ58%、38%、および4%であった。この比率は、黒毛和種牛およびホルスタインではほぼ同様の値であった。これら3つのグループでは、赤血球形態に異常はなく、Protein 4.2を含め主要膜タンパク質について有意な差はみられなかった。

これらのことから牛では Protein 4.2 の多型性が広く存在することが明らかとなり、少なくとも成牛ではこの多型性による赤血球への影響はないものと考えられた。しかしながら、奇形赤血球症を呈する仔牛で、P4.2/75を持つ個体が比較的高頻度で見られたことや、成牛で P4.2⁷⁵の個体が非常に少なかったことから、P4.2/76 と P4.2/75 には、何らかの機能的な違いが存在することが推測された。

第2章 Protein 4.2 多型性の分子基盤

Protein 4.2 多型性の生じる機序を明らかにするために、遺伝子解析を行った。まず、遺伝性バンド3欠損症で赤血球系の造血が亢進している個体の骨髄 cDNA から、ヒトの Protein 4.2 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR によって、牛赤血球 Protein 4.2 の cDNA 断片(164 bp)を得た。その塩基配列をもとに、5'-ならびに 3'-RACE 反応を行って、牛赤血球 Protein 4.2 の全長の cDNA 配列を決定した。次に、表現型が P4.2^{76/75}の個体の骨髄 cDNA から翻訳領域をすべて含むク

ローニングを行ったところ、塩基配列が一部異なるふたつの cDNA クローンが単離された。両者はともに全長約 2.2 kb で、687 アミノ酸残基からなる Protein 4.2 をコードするものと想定された。うち、ひとつは 599、601、ならびに 627 番目のアミノ酸残基が Pro、Met、および Val であり、これに対し、もうひとつのクローンでは上記 3 カ所のコドンに塩基置換がみられ Thr⁵⁹⁹、Ile⁶⁰¹、ならびに Ile⁶²⁷ であった。その他の領域の塩基配列は両クローンで完全に一致した。さらに表現型が P4.2⁷⁶、P4.2^{76/75}、ならびに P4.2⁷⁵ 個体のゲノム DNA を調製し、当該領域を解析した結果、前者の配列が P4.2/76 cDNA、後者が P4.2/75 cDNA に由来するものであることが判明した。両者の cDNA クローン、pBP4.2/76 と pBP4.2/75 とから *in vitro* 転写・翻訳反応で合成されるタンパク質を分析した結果、電気泳動上、移動度の異なる P4.2/76 と P4.2/75 がそれぞれ合成されることが確認された。

以上のことから、牛 Protein 4.2 には遺伝子に 3 塩基同時置換が認められ、C-末端領域において 3 アミノ酸置換が生じていること、これにより P4.2/76 と P4.2/75 という分子多型性が生じることが明らかになった。

第 3 章 Protein 4.2 と赤血球膜との相互作用と C-末端領域の役割

P4.2/76 と P4.2/75 の相違部位がある C-末端領域が、Protein 4.2 分子の中でどのような役割を果たし、この相違が機能的変化をもたらすか否かを調べるために Protein 4.2 ミュータントを作製し、赤血球膜との結合という観点から解析を行った。

cDNA クローン、pBP4.2/76 (76WT) と pBP4.2/75 (75WT) をもとに、N-末端のミリスチン酸修飾を受けない変異クローン(G2A)、P4.2/76 と P4.2/75 の相違部位を含む C-末端領域の変異クローン(Ct⁵²³⁻⁶⁸⁷)、Ct⁵²³⁻⁶⁸⁷ 部分を欠く変異クローン(Δ Ct⁵²³⁻⁶⁸⁷)、および N-末端領域の変異クローン(Nt¹⁻²¹⁷)を作製した。

これらのクローンを網状赤血球翻訳系で合成し、得られた ³⁵S-標識蛋白質の赤血球 inside-out vesicles (IOV)との結合を検討した。IOV は正常赤血球(IOVb3+)とバンド 3 完全欠損赤血球(IOVb3-)からそれぞれ調製した。その結果、P4.2/76 と P4.2/75 は、バンド 3 との相互作用、および N-末

端に付加されるミリスチン酸と脂質二重膜との相互作用という 2 通りの様式で赤血球膜に結合することが明らかになった。本実験系では P4.2/76 と P4.2/75 とで、IOV への結合に量的差異は認められなかった。バンド 3 との相互作用の部分は、GST 融合ペプチドとして大腸菌で合成した牛バンド 3 の N-末端細胞質ドメイン(cdb3)を添加すると、IOVb3+と IOVb3-とで Protein 4.2 結合量が等しくなることから、Protein 4.2 とバンド 3 との結合は cdb3 を介する結合と考えられた。また、 $\Delta Ct^{523-687}$ および G2A $\Delta Ct^{523-687}$ ではバンド 3 依存性の IOV への結合が消失したことから、バンド 3 との結合には Protein 4.2 の C-末端領域が重要であると考えられた。

次に、上記クローンを同様に網状赤血球翻訳系で合成し、His-tag 融合ペプチドとして大腸菌で合成した cdb3 との結合実験を行った。その結果、WT、G2A、76Ct⁵²³⁻⁶⁸⁷、および 75Ct⁵²³⁻⁶⁸⁷ は、cdb3 と結合したのに対し、Nt¹⁻²¹⁷、ならびに $\Delta Ct^{523-687}$ は cdb3 に結合しなかった。

以上のことから、Protein 4.2 は膜脂質と cdb3 に結合して赤血球膜に存在していると考えられ、cdb3 との結合には特に C-末端部分が重要であると考えられた。また IOV に含まれるバンド 3 との結合では、P4.2/76 と P4.2/75 とで違いはないものと考えられた。

以上の結果から、牛赤血球 Protein 4.2 では、P4.2/76 と P4.2/75 という多型性が広く一般に存在すること、また、この多型性のもととなる遺伝子基盤が明らかとなった。さらに P4.2/76 と P4.2/75 の構造上の相違部位が存在する C-末端部分は、バンド 3 との結合に非常に重要であることが示唆されたが、P4.2/76 と P4.2/75 とでは、赤血球膜との結合には機能的な違いはないものと考えられた。