

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松 本 光 史

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 70-80kDa の単一分子として検出される。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、赤血球膜の安定化に寄与すると推測されているが、実際の存在様式と生理機能は、ほとんど実証されていない。本論文は、仔牛で認められた protein 4.2 の 2 つのアイソフォームをもとに、その多型性と赤血球膜との相互作用について検討したもので、以下の 3 章より構成されている。

第 1 章では、牛赤血球 protein 4.2 の多型性について検索した。赤血球形態異常を呈する仔牛の赤血球膜タンパク質分析から、分子量 76kDa の protein 4.2 (P4.2/76) を持つ個体 P4.2⁷⁶の他に、P4.2/76 と 75kDa (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を確認した。また、これら仔牛では、P4.2/75 を持つ個体が比較的高頻度で見られた。ついで、健常成牛 (黒毛和種、計 209 頭) について検索したところ、P4.2⁷⁶、P4.2^{76/75}、および P4.2⁷⁵という 3 種類に分けられ、その比率はそれぞれ 58%、38%、および 4% であった。したがって、牛では protein 4.2 の多型性が広く存在し、少なくとも成牛ではこの多型性により赤血球形態の異常は示さないものと考えられた。しかしながら、P4.2/76 と P4.2/75 には、何らかの機能的な違いが存在すると推測された。

第 2 章では、protein 4.2 多型性の分子基盤について検討した。まず、表現型 P4.2^{76/75}の個体の骨髄 cDNA から、塩基配列が一部異なるふたつの protein 4.2 cDNA クローンを単離した。すなわち、一方は 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、他方は上記 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。ゲノム DNA 解析により、前者は P4.2/76 cDNA、後者は P4.2/75 cDNA に由来した。また、両 cDNA クローンから *in vitro* 転写・翻訳反応で、電気泳動上、移動度の異なる P4.2/76 と P4.2/75 の合成されることが確認された。したがって、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、P4.2/76 と P4.2/75 という分子多型性の生じることが明らかとなった。

第 3 章では、protein 4.2 と赤血球膜との相互作用と C-末端領域の役割について検討した。まず、protein 4.2 組み換え体を作製し、網状赤血球翻訳系で合成して、赤血球 inside-out vesicles (IOV)

との結合を検討した。IOVは正常赤血球とバンド3完全欠損赤血球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のN-末端細胞質ドメイン(cdb3)との結合、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結合という2つの様式で赤血球膜に結合することが明らかになった。また、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。さらに、C-末端領域を欠く組み換え体では、バンド3依存性のIOVへの結合が消失し、またcdb3との結合も認められず、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。ついで、数種のC-末端領域の組み換え体とcdb3との結合実験を行った。その結果、各組み換え体はcdb3と結合したが、多型性を示す領域のみの組み換え体とは結合しなかった。したがって、protein 4.2は膜脂質ならびにcdb3と結合して赤血球膜に存在し、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。またこの結合には、P4.2/76とP4.2/75とに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存在すること、また、この多型性の遺伝子基盤が明らかとなった。さらに両分子の構造上の相違部位が存在するC-末端領域は、バンド3との結合に重要であるものの、この多型性は、赤血球膜との結合には機能的に違いはないと考えられた。

このように本論文は、獣医学上、また畜産学上、重要な問題となっている仔牛の奇形赤血球症の解析から、赤血球膜protein 4.2の分子性状の一端を明らかにしたもので、獣医学の学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。