

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成13年度博士課程 入学

氏名 玉原 智史

指導教員名 小野 憲一郎

論文題目 バンド3欠損牛の赤血球膜グライコフォリンCに関する研究

膜貫通蛋白質とアンカー蛋白質との結合は、膜骨格と細胞膜との間を連結し、赤血球膜の物理的安定性を決定する要因と考えられている。これまでに、ヒトや動物において赤血球の遺伝性疾患の解析とそのターゲット分子の生化学的な解析が行われ、現在のところ、バンド3—アンキリンスペクトリン間の結合、グライコフォリンC—4.1蛋白質—スペクトリン/アクチン間の結合の二つが膜の安定性に貢献する主要な要素と考えられている。黒毛和種牛の遺伝性バンド3欠損症は、バンド3遺伝子のナンセンス変異(R664X)に起因し、ホモ接合体牛の赤血球では完全にバンド3蛋白質が欠失している。この赤血球においては、バンド3—アンキリンスペクトリン間の連結が完全に消失し、その結果膜の安定性が著しく低下し、遺伝性球状赤血球症を呈する。しかしながら、最低限の膜の安定性は保持されており、その安定性に貢献する要素として、もう一つの連結であるグライコフォリンC—4.1蛋白質—スペクトリン/アクチン間の結合が想定される。牛4.1蛋白質の解析では、そのN末端30 kDa領域が細胞膜に対する主な結合部位であることが明らかになっている。しかしながら、そのターゲットと想定される牛グライコフォリンCに関してはその性状ならびに発現いづれについて全く明らかにされていない。そこで本研究において、まず第1章では、cDNAおよびゲノムDNAを解析し、牛グライコフォリンC分子の同定と、その遺伝子多型について検討した。第2章では、その蛋白質性状、ならびに

発現について解析し、さらに第 3 章では、バンド 3 欠損症牛赤血球における発現と膜骨格との連結を解析し、グライコフォリン C の意義について検討した。

第 1 章 牛グライコフォリン C 分子の同定と遺伝子多型

牛の骨髄 cDNA から、ヒトのグライコフォリン C の配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR によって、牛グライコフォリン C cDNA の部分断片 (144 bp) を得た。その塩基配列をもとに、3'-RACE 反応および 5'-RACE 反応を行って、牛グライコフォリン C の全長 (922 bp) の cDNA 配列を決定した。得られた塩基配列から推定される牛グライコフォリン C は、109 個のアミノ酸残基からなる分子量 11,830 の分子で、その膜貫通領域および細胞内領域はヒトのグライコフォリン C と相同性が高かった (69.2%および 78.7%)。また、4.1 蛋白質との結合領域および、C 末端の PDZ-結合モチーフは極めてよく保存されていることから、牛赤血球において、グライコフォリン C と 4.1 蛋白質および p55 との結合が存在すると推測された。一方、細胞外領域は、ヒトと大きく異なっていたが、セリン残基やスレオニン残基に富んでおり、O-型結合糖鎖修飾を受けると推測された。ゲノム DNA の解析から、牛グライコフォリン C 遺伝子は 2 つの exon と 1 つの intron から構成されることが明らかになった。牛グライコフォリン C 遺伝子の 5' 上流領域の解析の結果、人グライコフォリン C 遺伝子の 5' 上流領域と類似し、GATA 配列、TATA box、CAAT box、CACCC box、Sp-1 結合配列がクラスターを形成していた。牛赤血球膜に対して、ヒトグライコフォリン C の 4.1 蛋白質結合領域に対する抗体でイムノブロットを行ったところ、約 36 kDa の位置に特異的な反応が認められた。また、その反応強度は個体によって異なり、デンストメトリー解析の結果、反応の強い群 (6.64 ± 0.40)、中等度の群 (3.80 ± 0.84)、弱い群 (< 0.2) の 3 群に分けられた。この反応性の違いの原因を明らかにするため、遺伝子多型の解析を行った。その結果、コード領域では、11 番目 (CCG あるいは CAG)、249 ならびに 254 番目 (GCG GAG AAC あるいは GCC GAG AGC) の塩基に、非コード領域では、414 番目 (ACG あるいは ACT) の塩基において遺伝子多型が存在することが明らかとなった。そのうち、11 番目は 4 番目のアミノ酸残基 (Pro⁴ あるいは Gln⁴)、254 番目は 85 番目 (Asn⁸⁵ あるいは Ser⁸⁵) のアミノ酸残基の多型を導くものであった。ゲノム DNA の遺伝子型と抗ヒトグライコフォリン C 抗体の反応性を照らし合わせたところ、254 番目の塩基が A/A (アミノ酸残基では Asn⁸⁵/Asn⁸⁵) の個体は反応が弱い群、G/G (Ser⁸⁵/Ser⁸⁵) の個体は反応が強い群、A/G (Asn⁸⁵/Ser⁸⁵) の個体は中等度の群と、遺伝子多型と抗ヒトグライコフォリン C 抗体の反応性が完全に相関した。

第 2 章 牛グライコフォリン C 分子の蛋白質性状と発現

1 章で明らかになった、85 番目アミノ酸残基の多型をふまえ、セリン型 (bGPC^{S85})

および、アスパラギン型 (bGPC^{N85}) について、以下の解析をおこなった。まず、牛グライコフォリン C と、4.1 蛋白質間の *in vitro* での結合を IAsysTM システムを用いて解析した。GST-融合牛グライコフォリン C 細胞内領域組み換え体と牛 4.1 蛋白質 N 末端 30 kDa 領域組み換え体は特異的に結合し、Scatchard 解析によって求められた平衡解離定数 K_D はセリン型で $0.18 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 、アスパラギン型で $0.36 \pm 0.02 \mu\text{M}$ と、いずれも 4.1 蛋白質と高い親和性で結合すると考えられた。つぎに牛グライコフォリン C の細胞内領域を抗原とした抗体を作製し、その抗体を用いて健康牛個体の赤血球膜における牛グライコフォリン C の発現を解析した。その結果、牛グライコフォリン C は 85 番目アミノ酸残基の多型によらず同等に発現し、また主要な膜蛋白質量にも差が認められないことが明らかになった。COS-7 発現系の解析では、bGPC^{S85} および bGPC^{N85} はいずれも蛋白質として翻訳され、糖鎖修飾を受けて細胞膜に移行することが明らかとなった。これらの結果から、牛グライコフォリン C は、85 番目アミノ酸残基の多型によらず、蛋白質として産生され、赤血球膜に発現し、4.1 蛋白質と結合すると考えられた。また、牛骨髓細胞に対する免疫蛍光染色の結果、牛グライコフォリン C はバンド 3 を発現している細胞ならびにバンド 3 の発現の認められない細胞いずれにも発現していた。

第 3 章 バンド 3 欠損牛赤血球膜におけるグライコフォリン C の発現と膜骨格との連結

前章までの結果を前提に、バンド 3 欠損症牛 3 個体の赤血球と健康個体の赤血球についてグライコフォリン C、4.1 蛋白質、ならびに膜骨格の構成蛋白質であるスペクトリンとアクチンの発現量を比較検討した。一定量のスペクトリンに対するグライコフォリン C および 4.1 蛋白質の発現量は、バンド 3 欠損 3 個体で正常個体よりそれぞれ増加していた (166–252% および 175–239%)。一方、アクチンの発現量は健康個体と差が認められず (95–117%)、バンド 3 欠損個体の赤血球では膜骨格構成蛋白質の発現量と比較して、グライコフォリン C と 4.1 蛋白質の発現量が相対的に増加していることが明らかとなった。また、グライコフォリン C の発現量と 4.1 蛋白質の発現量の比は、バンド 3 欠損個体と健康個体との間に差は認められず (0.89–1.10)、牛赤血球ではグライコフォリン C と 4.1 蛋白質の発現量には相関性があると考えられた。ついでバンド 3 欠損牛赤血球におけるグライコフォリン C と膜骨格との連結について検討した。マウス赤血球で報告されている赤血球内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることで膜骨格とグライコフォリン C との結合を外す実験系で検討したところ、その形態に著明な変化は認められなかった。また膜骨格との連結を C_{12}E_8 処理における不溶画分に含まれるグライコフォリン C 量で評価したところ、バンド 3 欠損個体の赤血球では、ヒト赤血球やマウス赤血球とは異なり、 Ca^{2+} 濃度が上昇しても膜骨格からグライコフォリン C が外れなかった。よって、牛グライコフォリン C と膜骨格との連結は、ヒトやマウスと異なり、 Ca^{2+} 濃度依存性に制御されるグライコフォリン C と 4.1 蛋白質間の結合ではないと考えられた。またバンド 3 欠損個体および、健康個体

の赤血球ではいずれも、グライコフォリン C の全発現量に対する膜骨格に連結していたグライコフォリン C 量の占める割合が、ヒトやマウスより著明に低かった。一方、牛赤血球膜ではグライコフォリン C または 4.1 蛋白質を免疫沈降した際に共沈される 4.1 蛋白質またはグライコフォリン C 量は極めて少なく、グライコフォリン C と 4.1 蛋白質間との結合はほとんど認められなかった。以上のことから、牛赤血球膜ではアンカー蛋白質である 4.1 蛋白質の細胞膜への結合対象はグライコフォリン C 以外の膜貫通蛋白または脂質と考えられ、バンド 3 欠損牛の赤血球膜で重要であると想定されるグライコフォリン C の 4.1 蛋白質を介した膜骨格との結合は、ほとんど意義を持たないものと考えられた。

以上の結果から、牛グライコフォリン C には、4 番目および 85 番目のアミノ酸残基多型が存在するもののその発現には影響がなく、細胞内領域はヒトと同様の 4.1 蛋白質に対する親和性をもつことが明らかになった。しかしながら、牛赤血球膜でグライコフォリン C の 4.1 蛋白質を介した膜骨格との連結はほとんど存在しておらず、バンド 3 欠損症赤血球で認められる最低限の膜安定性には、グライコフォリン C-4.1 蛋白質間の連結を介したものではないことが明らかとなり、他の膜貫通蛋白あるいは脂質との結合によるものと考えられた。