

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 玉原智史

黒毛和種牛の遺伝性バンド 3 欠損症は、新生子期に重篤な溶血性貧血を引き起こし、獣医临床上重要な疾患である。また、赤血球膜構造の基礎研究の点で、赤血球膜蛋白質異常の一つのモデルとして位置づけられている。本論文では、この赤血球におけるグライコフォリン C-4.1 蛋白質-スペクトリン/アクチン間の連結について検討したもので、緒論ならびに総括を除いた以下の 3 章から構成されている。

第 1 章では、牛グライコフォリン C の同定を行った。得られた cDNA の塩基配列から推定される一次構造では、膜貫通領域および細胞内領域はヒトグライコフォリン C と類似し、4.1 蛋白質の結合領域および PDZ ドメイン結合モチーフは極めてよく保存されており、牛赤血球においても、グライコフォリン C と 4.1 蛋白質および p55 分子との結合が存在すると推測された。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、牛赤血球膜に対して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、牛グライコフォリン C の存在が確認された。しかしながら、その反応強度には個体によって異なり、遺伝子多型の解析の結果、牛グライコフォリン C の 4.1 蛋白質結合領域の下流に存在する 85 番目アミノ酸残基の多型 (Ser/Asn) と完全に相関した。このことからこの多型が、4.1 蛋白質結合領域を含む細胞内領域の構造に影響を与えていることが推測された。

第 2 章では 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、牛グライコフォリン C 分子の蛋白質性状と発現について検討した。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 IA sys™ システムを用いて解析した。その結果、牛グライコフォリン C 細胞内領域と 4.1 蛋白質 N 末端 30 kDa 領域は 85 番目のアミノ酸残基多型によらず、ヒトと同等に高親和性に結合することが明らかになった。また、赤血球膜ならびに COS-7 細胞発現系の解析の結果、牛グライコフォリンは、85 番目のアミノ酸残基多型によらず、蛋白質として翻訳され、糖鎖修飾を受けたのち、赤血球膜表面に発現することが明らかとなった。

第 3 章では前章までの結果を前提に、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について検討した。まず、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ところ、バンド3欠損個体の赤血球では健康個体の赤血球と比較して一定量の膜骨格構成蛋白質に対する、グライコフォリンCと4.1蛋白質の発現量が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、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Ca²⁺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C₁₂E₈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、Ca²⁺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。したがって、牛グライコフォリンCと膜骨格との連結は、ヒトやマウスとは異なり、Ca²⁺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、バンド3欠損牛の赤血球膜で重要であると想定されていたグライコフォリン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。むしろ、アンカー蛋白質である4.1蛋白質の細胞膜への主な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、その結合が、赤血球膜の安定性に関与していると推測された。

このように、本論文は、牛グライコフォリンC分子の同定、性状を明らかとするとともに、グライコフォリンC分子の膜骨格への連結に関する新しい知見を見だし、バンド3欠損赤血球における意義を明らかとしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、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。