

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 13 年度博士課程 進学

氏 名 富張 瑞樹

指導教員名 小野 憲一郎

論文題目

遺伝性バンド3欠損牛における

赤血球表現型に及ぼす膜骨格蛋白質スペクトリンに関する研究

黒毛和種牛において認められているバンド3欠損症は、バンド3遺伝子のナンセンス変異(R664X変異)により、赤血球ならびに腎の組織・細胞のバンド3が欠損する常染色体性優性の遺伝性疾患である。バンド3を完全に欠損するホモ接合型牛では、溶血性貧血、球状赤血球症を示す。こうした赤血球膜の安定性と形態の保持には、膜骨格構造が重要な役割を果たしている。膜骨格はそれ自体が網目状の構造をとることで「横方向のつながり」を保持すると同時に、膜貫通蛋白質と連結し「縦方向のつながり」によって赤血球膜を内側から裏打ちしている。この「横方向のつながり」に最も主要な役割を果たしている蛋白質は、スペクトリン(α と β)と呼ばれる 246 kDa~280 kDa の線維状の蛋白質である。またスペクトリンは、アンギリンを介して主要な膜貫通蛋白質であるバンド3蛋白質と結合し、「縦方向のつながり」を構築する。

一方、バンド3欠損牛の赤血球形態や赤血球膜の安定性には個体間に相違のあることが認められており、これらの個体ではバンド3蛋白質の欠損に加え、さらに何らかの異常が存在する可能性が示唆されている。

そこで本研究では、膜骨格蛋白質であるスペクトリンに注目し、まず第一章において、バンド3欠損牛であるホモ接合型2個体についてその赤血球表現型の評価と解析を行った。ついで、第二章ではスペクトリン蛋白質の構造ならびに機能について解析し、さらに第三章ではスペクトリンの遺伝子解析を行い、遺伝性バンド3欠損牛における赤血球表現型に及ぼすスペクトリン遺伝子型について検討した。

第一章 バンド3欠損牛における赤血球表現型

バンド3欠損牛ホモ接合型2頭を用い、赤血球形態、赤血球膜の物理的性状と安定性、ならびに膜骨格蛋白質の量的異常について検討した。

1) 赤血球形態、ならびに赤血球膜の物理的性状および安定性の相違

バンド3欠損牛(Ho1およびHo2)ならびに健常個体について、一般血液検査による赤血球恒数などを測定したところ、Ho1は平均赤血球容積ならびに平均ヘモグロビン濃度では差は認められなかったが、ヘマトクリット値が23%とHo2(33%)に比べ低値であった。走査型電子顕微鏡による赤血球形態の観察ではいずれも有口球状で大小不同であったが、とくにHo1の大小不同が著しかった。ついで赤血球の小胞化や断片化の生じ易さを観察したところ、孵置6時間後における小胞形成率では、Ho2の2.0%に対しHo1では63.5%と著しい高値を示した。また、メンブレンフィルター(孔径0.45 μ m)を通過させた赤血球溶出で得られたHo1の小胞膜蛋白質では、Ho2には認められないスペクトリン、アンキリン、プロテイン4.1、ならびにアクチンの膜骨格成分が含まれていた。一方、エクタサイトメトリーによる変形能の測定では、赤血球をそのまま用いた場合には両者に差は認められなかったが、赤血球膜ゴーストを用いた場合にはHo1の変形能がHo2に比較して減少していた。

2) 赤血球の膜骨格蛋白質

赤血球数あたり、あるいは赤血球容積あたりの主要赤血球膜骨格蛋白質(スペクトリン+アンキリン、プロテイン4.1、アクチン)含量を解析した。Ho2では健常個体と差は認められなかったが、Ho1ではスペクトリン+アンキリン、プロテイン4.1、アクチン含量はそれぞれHo2の46%、74%、および60%と明らかな低値を示し、とくにスペクトリン+アンキリン含量の減少が著明であった。さらに膜骨格蛋白質を低張バッファーで赤血球膜から遊離させ、抗スペクトリンあるいは抗アンキリン抗体を用いてイムノプロットにより検討したところ、アンキリン含量に変化は認められなかったが、遊離した膜骨格蛋白質、また膜骨格を遊離させた後の反転小胞(inside-out vesicles depleted for spectrin, IOV Δ Sp)のいずれにおいても、スペクトリン含量の減少が認められた。

したがって、バンド3欠損牛ホモ接合型個体には赤血球形態、赤血球膜の物理的性状および安定性において異なる表現型を呈する個体の存在することが明らかとなり、さらにその原因の一つには膜骨格蛋白質であるスペクトリン含量の減少が関連するものと考えられた。

第二章 スペクトリン蛋白質の解析

バンド3欠損牛における赤血球表現型の多型に関連すると考えられたHo1のスペクトリン蛋白質に

ついて、その網目状構造ならびに赤血球膜との結合能などについて検討した。

1) 膜骨格の網目状構造

Ho1ならびにHo2赤血球について、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy : AFM)を用いて主にスペクトリンから成る赤血球膜の膜骨格網目状構造を内側から観察したところ、Ho1の膜骨格網目状構造はHo2に比較して低密度で不規則な配列を示した。

2) スペクトリンの分子形成能ならびに赤血球膜との結合能

スペクトリンの $\alpha\beta$ ダイマーあるいは $(\alpha\beta)_2$ テトラマー形成能をHo1、Ho2、ならびに健常個体の赤血球膜についてゲル濾過クロマトグラフィーによりスペクトリンを精製して比較検討した。Ho1のダイマーおよびテトラマーの形成能はいずれもHo2ならびに健常個体と比較して明瞭な差異は認められなかった。ついで、各個体赤血球膜から、膜骨格蛋白質の大部分を除いた反転小胞(10V Δ Sp)と、これをアルカリ処理することでさらにその末梢蛋白質をほぼ完全に除去した反転小胞(10VAIK)とをそれぞれ調製し、精製スペクトリンとの結合能を検討した。Ho1の精製スペクトリンは、いずれの小胞との結合においてもHo2ならびに健常個体と差は認められなかった。

したがって、Ho1赤血球膜の膜骨格網目状構造は低密度で不規則な構造ではあるものの、その主要構成成分であるスペクトリンのダイマーあるいはテトラマー形成能、ならびに赤血球膜への結合能にHo2と差は認められず、Ho1赤血球に認められるスペクトリン含量の減少は、これらスペクトリンの分子形成能および赤血球膜との結合能の異常によるものではないことが明らかとなった。

第三章 スペクトリン蛋白質の遺伝子解析

バンド3欠損牛の赤血球表現型の多型は主に赤血球膜のスペクトリン含量の減少が関与すると考えられるため、牛スペクトリン遺伝子配列、骨髄中mRNA量、ならびにHo1に特異的なスペクトリン遺伝子型の特性について検討した。

1) 牛スペクトリン遺伝子配列、ならびに骨髄中スペクトリン mRNA 量

既に同定されているヒトのスペクトリン cDNA 配列からプライマーを作成し、健常個体の骨髄中 mRNA を鋳型として、牛の α -ならびに β -スペクトリン cDNA 配列の全長を決定した。ついで、この cDNA 配列をもとに α -ならびに β -スペクトリンのHo1の骨髄中 mRNA 量を定量 PCR 法で測定し、Ho2と比較検討した。Ho1の骨髄中 mRNA 量は、 α -、 β -スペクトリンともにHo2と比較して差は認められなかった。一方、Ho1の α -ならびに β -スペクトリンの cDNA 配列をHo2ならびに健常個体と比較したところ、Ho1のみに α -スペクトリン91番目のグルタミン酸のリジンへの置換(E91K)の存在が明らかとなった。またHo1には、健常個体にも認められる α -スペクトリン10カ所(A17E, H87N, W139Q, E157G, E179K, K543E, A741V, S748I, H785Y, E804V)ならびに β -スペクトリン2カ所(M526T, R1576Q)のアミノ酸置換が存在した。この α -スペクトリンの10カ所のアミノ酸置換は全て同じアレル(allele Sp α b)上に存在していた。また、Ho1のみに認められたE91K置換も同一のアレル状に存在していた。したがってHo1の赤血球膜スペクトリン含量の減少には、これらアミノ酸置換を引き起こす遺伝子異常が関与すると推測された。

2) 健常牛における α -スペクトリン遺伝子型の発現頻度

Ho1 に認められる α -スペクトリンのアミノ酸置換に注目し、E91K、E179K(179 番目のグルタミン酸がリジンに置換)ならびに E804V(804 番目のグルタミン酸がバリンに置換)の計3カ所について、健康個体 193 頭を用いて遺伝子型の発現頻度を検討した。E91K 変異は、193 個体中 11 個体がホモ接合型(K/K)で、63 個体がヘテロ接合型(E/K)であった。また E179K 変異は 58 個体がホモ接合型(K/K)で 96 個体がヘテロ接合型(E/K)、E804V 変異は 65 個体がホモ接合型(V/V)で 92 個体がヘテロ接合型(E/V)であった。E91K 変異を含め α -スペクトリンのアミノ酸置換は、黒毛和種牛の集団ではポリモルフィズムとして存在することが明らかとなった。

3) α -スペクトリン遺伝子型とスペクトリン+アンキリン含量

ついで、193 個体のうち 80 個体の α -スペクトリン遺伝子型と、赤血球膜スペクトリン+アンキリン含量について検討した。E179K 変異ならびに E804V 変異の遺伝子型とスペクトリン+アンキリン含量との間に相関は認められなかったが、E91K 変異をホモ(K/K)ならびにヘテロ(E/K)で保有する個体は、保有していない個体に比較して赤血球膜スペクトリン+アンキリン含量に約 10%の有意な減少が認められた。したがって、E91K 変異は赤血球膜スペクトリン量の減少に強く関与する遺伝子変異であると考えられた。

以上の結果、牛バンド3欠損牛ホモ接合型個体には赤血球表現型の異なる個体が存在し、その原因の一つは赤血球膜骨格蛋白質であるスペクトリンの遺伝子変異(E91K)による量的な減少であると考えられた。