

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 富張瑞樹

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、獣医臨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、このバンド3欠損牛における赤血球表現型の個体間の相違を明らかにし、この原因の一つとして考えられた膜骨格蛋白質スペクトリン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、バンド3欠損牛における赤血球表現型について、例数は少ないもののホモ接合型牛2頭 (Ho1 ならびに Ho2) を用いて検討している。一般血液検査では、Ho1 はヘマトクリット値が 23%と Ho2 (33%) に比べ低値であり、走査型電子顕微鏡による赤血球形態の観察ではとくに Ho1 の大小不同が著しかった。また孵置6時間後における赤血球の小胞形成率では、Ho2 の 2.0%に対し Ho1 では 63.5 %と著しい高値を示した。一方、エクタサイトメトリーによる赤血球膜ゴーストの変形能の測定では、Ho1 の変形能が Ho2 に比較して低下しており、Ho1 における膜骨格構造の保持能力の低下が疑われた。この Ho1 赤血球における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)含量を解析したところ、とくに Ho1 スペクトリン+アンキリン含量が Ho2 の 45.6%と著しく減少しており、さらにイムノプロットによる解析では、Ho1 アンキリン含量は Ho2 に比較して変化が認められなかったが、Ho1 スペクトリン含量が Ho2 より減少していた。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を明らかにし、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2章では、前章で注目された Ho1 スペクトリン蛋白質について解析している。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観察したところ、Ho1 の網目状構造は Ho2 に比較して粗であった。しかしながら、スペクトリン含量を減少させる機能異常として多くの報告がある、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、ならびに膜との結合能には、Ho1 と Ho2 との差

は認められなかった。したがって、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を明らかにしている。

第3章では、Ho1 スペクトリン蛋白質についてのより詳細な検討を目的とし、スペクトリン蛋白質をコードする遺伝子の面から解析を行っている。まず、牛の α -ならびに β -スペクトリン cDNA 配列の全長を決定し、ついで、この cDNA 配列をもとに Ho1 の骨髄中スペクトリン mRNA 量を定量 PCR 法により測定したところ、Ho1 の骨髄中 mRNA 量は、 α -ならびに 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 Ho1 に認められた α -スペクトリンの 11カ所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、健常個体 193頭を用いて遺伝子型の発現頻度を検討したところ、E91K変異は11個体がホモ接合型(K/K)、63個体がヘテロ接合型(E/K)と、他2カ所と比較して最も低い発現頻度であり、また3カ所ともに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を明らかにしている。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ている。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推定している。

このように、本論文は牛バンド3欠損牛ホモ接合型個体における赤血球表現型の異なる個体の存在を明らかにするとともに、その原因の一つとして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)がもたらす量的な減少であることを見だし、バンド3欠損牛におけるスペクトリンの新たな異常の存在を明らかにしたものである。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。