

学 位 論 文 題 名

Molecular Pathogenesis for Dominant Hereditary
Spherocytosis Associated with Band 3 Deficiency in
Cattle Due to A Nonsense Mutation of The *AE1* gene

(牛バンド3 (AE1) 欠損症における優性遺伝球状赤血球症発症の分子機構)

学位論文内容の要旨

ヒトと動物で、AE1（アニオン交換輸送体 anion exchanger 1、バンド3）遺伝子の様々な変異が赤血球膜 AE1 の減少をもたらし、代表的な先天性溶血性貧血である遺伝性球状赤血球症発症の原因となることが知られる。AE1 減少の程度と病態はそれぞれの変異により異なるが、ほとんどの場合、球状赤血球症は優性の遺伝様式をとる。ところが、AE1 タンパク質含量の低下、ならびに赤血球病態の優性遺伝をもたらす分子機構はいずれも不明である。黒毛和種牛のバンド3欠損症 (band 3^{Bov. Yamagata}) は、AE1 遺伝子のナンセンス変異 (R664X 変異) に起因する疾患であり、ホモ接合型では AE1 の完全欠損による重度の赤血球形態異常を、またヘテロ接合型では AE1 の部分欠損による典型的な球状赤血球症を生じ、やはり優性の遺伝様式を示す。本研究の目的は、この AE1 の R664X 変異がどのようにして赤血球 AE1 含量の低下を生じるのか、また、なぜ赤血球病態が優性遺伝するのか、その分子機構を解明することである。

第1章では、正常 AE1 (WT AE1) と R664X AE1 を K562、あるいは HEK293 細胞とカエル卵母細胞に発現させて、それらの発現動態と細胞内分布とを解析した。K562 細胞の安定発現系において R664X 変異体は著しく不安定で合成後早期に分解された。また、WT AE1 と共存させるとヘテロオリゴマーを形成し、WT AE1 の膜移行を低下させ、また分解を促進した。卵母細胞に発現させた WT AE1 によるアニオン輸送は、R664X AE1 存在下で特異的に抑制された。さらに、R664X AE1 は K562、HEK293 の両者で、主に小胞体 (ER) に局在し、プロテアソーム系による ER 関連分解 (ERAD) を受けることが明らかになった。これらの知見は、R664X AE1 が WT AE1 の機能的発現に対してドミナントネガティブな作用を有することを実証するものである。

次に、第2章では、この AE1 分解系の性状について、ユビキチン化されて ERAD 基質となることが知られる CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の変異体 DF508-CFTR と比較・検討を行った。その結果、K562、HEK293、いずれの細胞とも AE1 のユビキチン化は検出できず、AE1 の ERAD はユビキチン非依存性に生じることが示唆された。また、プロテアソーム阻害下で DF508-CFTR が大きな細胞質凝集塊アグリソームを形成するのに対し、AE1 は散在する ER への集積が認められ、AE1 の分解に際しては、プロテアソームが分解に加え

て細胞質への逆行輸送にも関与する可能性が示された。さらに、牛 AE1 が *N*-結合型糖鎖を持たないことを実証し、逆に *N*-結合型糖鎖付加変異体 (P661S/R664X) が R664X と同様の細胞内動態を示すことと併せて AE1 の ERAD が *N*-結合型糖鎖の認識と無関係に生じることを明らかにした。これらの性状は、主に DF508-CFTR について知られてきた膜内在性タンパク質のプロテアソーム系分解の性質と大きく異なり、ERAD の新しい分子認識・分解の機構の存在を示唆するものである。

最後に第 3 章において、band 3^{Bov. Yamagata} の赤血球病態に特徴的な膜骨格タンパク質アンキリンの減少が生じる機序を、HEK293 細胞に WT、あるいは R664X AE1 と EGFP-AnkN90 (enhanced green fluorescent protein で標識した N 末端側 90 kDa の AE1 結合ドメイン) を導入して検討した。WT AE1 との共存下では EGFP-AnkN90 は主に細胞膜に分布が認められた。対照的に、R664X AE1 と EGFP-AnkN90 の両者を発現する細胞のほとんどで、EGFP-AnkN90 は R664X AE1 と同じく ER に分布し、細胞膜への局在は認められなかった。また、これらの細胞では EGFP-AnkN90 と AE1 との特異的な相互作用が確認され、さらにプロテアソーム阻害により EGFP-AnkN90 の分解が抑制された。したがって、ER に留まり ERAD により分解される R664X AE1 は、特異的な結合により EGFP-AnkN90 と複合体を形成し、その細胞膜移行を低下させるとともに分解を促進すると考えられる。

以上の知見から、R664X AE1 が正常 AE1 分子、ならびに AE1 と ER において特異的に結合するアンキリンの両者の機能的発現に対してドミナントネガティブな相互作用を発揮することが、この変異に起因する牛の球状赤血球症優性遺伝の分子機構であることが実証された。さらに、この作用には、従来の知見とは異なる認識・分解機構をもつ AE1 のプロテアソーム系 ERAD による品質管理が重要な役割をもつことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦

副 査 教 授 木 村 和 弘

副 査 助 教 授 稲 波 修

副 査 助 教 授 佐 藤 耕 太

学 位 論 文 題 名

Molecular Pathogenesis for Dominant Hereditary Spherocytosis Associated with Band 3 Deficiency in Cattle Due to A Nonsense Mutation of The *AE1* gene

(牛バンド3 (AE1) 欠損症における優性遺伝球状赤血球症発症の分子機構)

ヒトと動物で、*AE1* (anion exchanger 1、バンド3) 遺伝子の様々な変異が赤血球膜 *AE1* の減少をもたらし、代表的な先天性溶血性貧血である優性の遺伝性球状赤血球症発症の原因となることが知られる。しかし、*AE1* タンパク質含量の低下、ならびに赤血球病態の優性遺伝をもたらす分子機構はいずれも不明である。黒毛和種牛のバンド3欠損症(band 3^{Bov.Yamagata})は、*AE1* 遺伝子のナンセンス変異 (R664X 変異) に起因して典型的な優性遺伝球状赤血球症と溶血性貧血を生じる。本研究は、この R664X 変異が赤血球 *AE1* 含量の低下と赤血球病態の優性遺伝を生じる分子機構の解明を目指したものである。

第1章では、正常 *AE1* (WT *AE1*) と R664X *AE1* を K562 細胞、HEK293 細胞、あるいはカエル卵母細胞に発現させて、それらの発現動態と細胞内分布とを解析した。K562 細胞の安定発現系において R664X 変異体は著しく不安定で合成後早期に分解された。また、WT *AE1* と共存させるとヘテロオリゴマーを形成して WT *AE1* の膜移行を低下させ、また分解を促進した。卵母細胞に発現させた WT *AE1* によるアニオン輸送は、R664X *AE1* 存在下で特異的に抑制された。さらに、R664X *AE1* は K562、HEK293 の両者で、主に小胞体(ER)に局在し、プロテアソーム系による ER 関連分解(ERAD)を受けることが明らかになった。これらの知見は、R664X *AE1* が WT *AE1* の機能的発現に対してドミナントネガティブな作用を有することを実証するものである。

次に、第2章では、この *AE1* 分解系の性状について、ユビキチン化されて ERAD 基質となることが知られる CFTR (cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator) の変異体 Δ F508-CFTR と比較・検討を行った。その結果、K562、HEK293、いずれの細胞とも *AE1* のユビキチン化は検出できず、*AE1* の ERAD はユビキチン非依存性に生じることが示唆された。また、プロテアソーム阻害下で Δ F508-CFTR が大きな細胞質凝集塊アグリソームを形成するのに対し、*AE1* は散在する ER への集積が認められ、*AE1* の分解に際しては、プロテアソームが分解に加えて細胞質への逆行輸送にも関与する可能性が示された。さらに、*AE1* の N-結合型糖鎖付加変異体(P661S/R664X)が N-結合型糖鎖をもたない R664X と同様の細胞内動態を示すことから、*AE1* の ERAD が N-結合型糖鎖の認識と無関係に生じることを明らかにした。これらの性状は、主に Δ F508-CFTR について知られてきた膜内在性タンパク質のプロテアソーム系分解の性質と大きく異なり、ERAD の新しい分子認識・分解の機構の存在を示唆するものである。

最後に第3章において、band 3^{Bov.Yamagata} の赤血球病態に特徴的な膜骨格タンパク質アンキリンの減少が生じる機序を、HEK293 細胞に WT、あるいは R664X *AE1* と EGFP-AnkN90(enhanced green fluorescent protein

で標識した N 末端側 90 kDa の AE1 結合ドメイン)を導入して検討した。WT AE1 との共存下では EGFP-AnkN90 は主に細胞膜に分布が認められた。対照的に、R664X AE1 と EGFP-AnkN90 の両者を発現する細胞のほとんどで、EGFP-AnkN90 は R664X AE1 と同じく ER に分布し、細胞膜への局在は認められなかった。また、これらの細胞では EGFP-AnkN90 と AE1 との特異的な相互作用が確認され、さらにプロテアソーム阻害により EGFP-AnkN90 の分解が抑制された。したがって、ER に留まり ERAD により分解される R664X AE1 は、特異的な結合により EGFP-AnkN90 と複合体を形成し、その細胞膜移行を低下させ、また分解を促進することが示唆された。

本研究は、band 3^{Bov.Yamagata} における赤血球病態が、正常 AE1 とアンキリンの機能的発現に対する R664X AE1 のドミナントネガティブな作用に起因すること、さらにその作用には、従来の知見とは異なる認識・分解機構をもつ AE1 のプロテアソーム系 ERAD による品質管理が重要な役割をもつことを明らかにしたものであり、広く遺伝性膜疾患発症の分子機構解明に貢献すると期待される。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者伊東大介の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。