

学 位 論 文 題 名

Modification of Spectrin in Red Cell Membranes
by the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-nonenal
Associated with the Changes in Red Cell Membrane Properties

(赤血球膜スペクトリンの脂質過酸化産物

4-ヒドロキシ-2-ノネナルによる分子修飾と赤血球膜物性の変化)

学位論文内容の要旨

膜脂質の過酸化は、4-hydroxyl-2-nonenal (HNE)をはじめとする種々のアルデヒドやアルケナールを産生する。これらの脂質過酸化産物は、核酸やタンパク質と共有結合して、その構造と機能の障害を生じる。赤血球は、こうした脂質過酸化産物による障害を最も受け得る細胞であり、その老化にともなう HNE の蓄積が知られるが、実際にいかなる分子修飾がどのような影響をもたらすのかは不明である。本研究は、その解明を目的に、主にヒト赤血球膜における HNE 付加タンパク質と修飾部位の同定、ならびに膜物性に対する影響の解析を行った。

まず、抗 HNE 抗体を用いたイムノブロッティングの結果、膜骨格網状構造の主体をなすタンパク質、 α -、ならびに β -スペクトリンに HNE 付加体のシグナルが検出された。赤血球膜ゴーストを HNE と孵置すると、アクチンやバンド 3 をはじめとする他の主要膜タンパク質に HNE 付加が生じたが、無傷赤血球に HNE を作用させた場合にはスペクトリンにのみ、特に β -スペクトリンに HNE 付加体の著しい増加が認められ、 α -、ならびに β -スペクトリンが HNE の主たる標的分子であることが明らかになった。飛行時間型質量分析装置を用いた解析から、その修飾部位は、 β -スペクトリン分子 N 末端ドメイン (β N) 中の Ile¹¹⁰-----Arg¹²⁷ 配列など、膜脂質と直接に相互作用する領域を中心に複数存在し、Cys、His、ならびに Lys 残基の Michael 付加体として、また Lys 残基では加えて Schiff 塩基付加体として存在すると推定された。一方、ヒト以外の赤血球膜でも、HNE との孵置により HNE-スペクトリンの著増がみられたが、自然付加体の量はヒト赤血球に比べて少なく、また動物種により差異が認められた。これらの知見は、スペクトリン分子と膜脂質との相互作用が HNE 修飾に影響することを示唆するものである。

そこで、赤血球におけるスペクトリン-膜脂質間結合を保つ MgATP の存在／非存在下に膜ゴーストを調製し、これらの HNE 付加を検討した。その結果、MgATP 存在下では、HNE との孵置でスペクトリンの不可溶性凝集体形成が生じ、 α 鎖よりも β -スペクトリンの修飾が優位であった。対照的に、MgATP 非存在下では、HNE- α -スペクトリンの生成が β 鎖のそれを上回り、明瞭な凝集はみられなかった。また、比重遠心で分画した赤血球では、予想に反して全ての分画の赤血球でスペクトリンの HNE 修飾がみられ、最下層の老化赤血球では軽度の HNE-スペクトリン減少が認められた。これらの知見は、スペクトリンの膜への組み込み後早期に一定量の HNE 付加が生じることを示すとともに、赤血球の末梢循環過程で限定的な HNE-スペクトリン凝集体の形成と膜小胞としての除去が生じることを示唆している。

さらに、HNE 付加による赤血球膜の機械的特性の変化を知るために、エクタサイトメーターで赤血球の変形能を解析したところ、変形能指数は、HNE の濃度と孵置時間に応じて対照赤血球の値の 40%~80%に低下した。また、HNE-スペクトリンの赤血球反転小胞への結合定数は対照スペクトリンの約 1/2 とわずかではあるが低下を示した。したがって、一時的な HNE 付加体の増加は、スペクトリン-アクチン膜骨格の変形能を低下させて局所的な膜の断片化を生じ得ると推測され、その一因として赤血球膜との相互作用の強まりが考えられた。

以上のように、本研究の成績は、酸化ストレス下、赤血球内外で生成する HNE が赤血球膜に作用してスペクトリンと共有結合付加体を形成し、スペクトリンの性状と機能を変化させることを通して赤血球膜の変形能を低下させることを明らかにしたものである。これらの知見は赤血球の老化や様々な疾患病態にともなう赤血球膜物性変化に新しい視点を与えるとともに、酸化ストレスが関わる疾患の細胞病態に、膜インターフェースにおける脂質過酸化産物による骨格タンパク質の構造・機能修飾が関わる可能性を示すものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	稲葉	睦
副査	教授	稲波	修
副査	准教授	寺尾	晶
副査	准教授	佐藤	耕太

学位論文題名

Modification of Spectrin in Red Cell Membranes by the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-nonenal Associated with the Changes in Red Cell Membrane Properties

(赤血球膜スペクトリンの脂質過酸化産物

4-ヒドロキシ-2-ノネナールによる分子修飾と赤血球膜物性の変化)

膜脂質の過酸化は、4-hydroxyl-2-nonenal (HNE)をはじめとする種々のアルデヒドを産生する。これらの脂質過酸化産物は、核酸やタンパク質と共有結合して、その構造と機能の障害を生じる。赤血球は、こうした脂質過酸化産物による障害を最も受け得る細胞であり、その老化にともなう HNE の蓄積が知られるが、実際にいかなる分子修飾がどのような影響をもたらすのかは不明である。本研究は、その解明を目的に、主にヒト赤血球膜における HNE 付加タンパク質と修飾部位の同定、ならびに膜物性に対する影響の解析を行ったものである。

まず、抗 HNE 抗体を用いたイムノブロットングの結果、膜骨格網状構造の主体をなすタンパク質、 α -、ならびに β -スペクトリンに HNE 付加体のシグナルが検出された。赤血球膜ゴーストを HNE と孵置すると、アクチンやバンド 3 をはじめとする他の主要膜タンパク質に HNE 付加が生じたが、無傷赤血球に HNE を作用させた場合にはスペクトリンにのみ、特に β -スペクトリンに HNE 付加体の著しい増加が認められた。これらの結果は、 α -、ならびに β -スペクトリンが HNE の主たる標的分子であることを示している。飛行時間型質量分析装置を用いた解析から、その修飾部位は膜脂質と直接に相互作用する領域を中心に複数存在し、Cys、His、ならびに Lys 残基の Michael 付加体として、また Lys 残基では加えて Schiff 塩基付加体として存在することが示された。これらの知見は、スペクトリン分子と膜脂質との相互作用が HNE 修飾に影響することを示唆するものである。

そこで次に、赤血球におけるスペクトリン-膜脂質間結合を保つ MgATP の存在／非存在下に膜ゴーストを調製し、これらの HNE 付加を検討した。その結果、MgATP 存在下では、HNE との孵置でスペクトリンの不可溶性凝集体形成が生じ、 α 鎖よりも β -スペクトリンの修飾が優位であった。対照的に、MgATP 非存在下では、HNE- α -スペクトリンの生成が β 鎖のそれを上回り、明瞭な凝集はみられなかった。また、比重遠心で分画した赤血球では、予想に反して全ての分画の赤血球でスペクトリンの HNE 修飾がみられ、最下層の老化赤血球では軽度の HNE-スペクトリン減少が認められた。これらの知見は、スペクトリンの膜への組み込み後早期に一定量の HNE 付加が生じ、赤血球の末梢循環過程で限定的な HNE-スペクトリン凝集体の形成と膜小胞としての除去が生じることを示唆するものである。

さらに、HNE を作用させた赤血球の変形能指数が HNE 濃度と孵置時間に依りて対照赤血球の値の 40%～80%に低下すること、また、HNE-スペクトリンの赤血球反転小胞への結合定数が対照スペクトリンに比べて低下することを示した。これらの結果から、一時的な HNE 付加体の増加は、スペクトリン-アクチン膜骨格の変形能を低下させて局所的な膜の断片化を生じ、赤血球膜との相互作用の強まりがその一因となることを考察している。

本研究の成績は、酸化ストレス下、赤血球内外で生成する HNE が赤血球膜に作用してスペクトリンと共有結合付加体を形成し、スペクトリンの性状と機能を変化させることを通して赤血球膜の変形能を低下させることを明らかにしたものであり、様々な疾患病態や赤血球老化にともなう赤血球膜物性変化をはじめ、広く酸化ストレスが関わる疾患の細胞病態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新敷信人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。