

学位論文題名

Canine Reticulocyte Exosomes: Parallel and Selective Extrusion of Na,K-ATPase and Stomatin during Reticulocyte Maturation in Dogs with HK and LK Red Cell Phenotypes

(犬網状赤血球エクソゾーム：HK型ならびにLK型犬の網状赤血球成熟過程におけるNa,K-ATPaseとstomatinの選択的同時排出機構)

学位論文内容の要旨

網状赤血球の成熟は、赤芽球系細胞分化・成熟の最終段階であり、成熟赤血球が必要とする膜の特性を獲得するために、トランスフェリンレセプター(TfR)をはじめとする過剰/不要な細胞膜成分を排除する過程である。この過程には、タンパク質分解、ならびにエクソゾーム(exosome)と呼ばれる微小小胞の放出が関わりとされる。犬網状赤血球にはNa, K-ATPaseが存在するが、これは成熟赤血球に至る過程で消失し、結果として、犬赤血球は一般に高Na⁺、低K⁺のLK型赤血球となる。一方で、柴犬や珍道犬には遺伝的にNa, K-ATPaseを保持したHK型赤血球をもつ個体が存在する。本研究の目的は、犬網状赤血球成熟過程におけるNa, K-ATPase消失におけるエクソゾームの役割と、そのHK/LK赤血球表現型との関連の解明である。

第1章では、犬網状赤血球の成熟過程で放出される小胞の性状を解析した。LK型犬から得た網状赤血球を孵置し、24、72時間後に上清を分別遠心すると微小小胞が得られた。この小胞は直径20~60 nmで、Hsc70、TfRなど、既報エクソゾームの指標となるタンパク質を主要成分として含むことから、エクソゾームと判断した。膜タンパク質の解析から、犬の網状赤血球膜に含まれるが赤血球膜には存在しないNa, K-ATPase α サブユニット、Hsc70、TfR、GLUT1、ならびに脂質ラフトタンパク質のひとつstomatinは、いずれもこのエクソゾームに存在した。一方で、赤血球膜の主要タンパク質、バンド3、スペクトリンは検出されなかった。また、Na, K-ATPase、Hsc70、TfRはTriton X-100可溶性画分に、一方、GLUT1は不溶性画分に、GLUT1と相互作用するstomatinは両画分に含まれていた。さらに、このエクソゾームをショ糖密度勾配遠心で分画したところ、小胞は比重1.06 g/ml~1.14 g/ml(画分4~12)の範囲に広く分布し、Hsc70、TfR、stomatinは画分5~8、特にラフトマーカークのGM1と同じ画分7と8に多く含まれていた。一方、Na, K-ATPaseは、より比重の小さい画分4~6に主に認められた。これらの結果から、網状赤血球エクソゾームの組成は均一ではなく、タンパク質構成の異なるポピュレーションから成ることが明らかになるとともに、Na, K-ATPaseと一部のstomatin、Hsc70が同一ポピュレーションに存在することが示唆された。

そこで第2章では、overhydrated stomatocytosis (OHSt)患者における欠損を発端に見出され様々なトランスポーターとの相互作用が提唱されているstomatinに焦点をあて、遺伝子型*hk/hk*のHK型、*hk/lk*と*lk/lk*由来のLK型各犬の網状赤血球と成熟赤血球におけるstomatinの含量を検討した。HK型(*hk/hk*)の赤血球膜におけるstomatin含量がヒト赤血球と同程度であるのに比べ、LK型(*lk/lk*)はその2%以下でOHSt患者と同様の低値を示した。また、遺伝子型*hk/lk*のLK型赤血球のstomatin含量はHK型の10%程度で、*hk/hk*型、ならびに*lk/lk*型と明確な差異を示した。上述のようにLK型(*lk/lk*)網状赤血球にはstomatinが存在し、これに対するHK型の赤血球、網状赤血球のstomatin含量はそれぞれ8倍、12.5倍であった。Na, K-ATPase

と GLUT1 にも類似した量的関係が認められた一方で、TfR 含量は HK 型、LK 型の網状赤血球で同程度であった。これらの成績から、HK 型と LK 型は、いずれも網状赤血球の成熟にともなった stomatin と Na, K-ATPase の減少を同様に生じること、成熟赤血球の HK/LK 表現型が両型の網状赤血球における発現量の差違に基づくことが明らかになった。

以上のように、本研究は、複数のポピュレーションを含む犬網状赤血球エクソゾームが Na, K-ATPase や stomatin をはじめとする膜タンパク質の同時、かつ選択的な除去に寄与すること、ならびに stomatin の膜含量が HK/LK 遺伝子型の指標となることを明らかにした。加えて、これらの知見は、HK/LK 赤血球表現型を生じる本質的要因が TfR を発現するよりも前の前駆細胞の段階にあることを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 教 授 木 村 和 弘
副 査 准教授 山 盛 徹
副 査 准教授 佐 藤 耕 太

学 位 論 文 題 名

Canine Reticulocyte Exosomes: Parallel and Selective Extrusion of Na,K-ATPase and Stomatin during Reticulocyte Maturation in Dogs with HK and LK Red Cell Phenotypes

(犬網状赤血球エクソゾーム：HK型ならびにLK型犬の網状赤血球成熟過程におけるNa,K-ATPaseとstomatinの選択的同時排出機構)

網状赤血球の成熟段階では、成熟赤血球が必要とする膜の特性を獲得するために、トランスフェリンレセプター(TfR)をはじめとする不要な細胞膜成分の排除が生じるが、これにはタンパク質分解、ならびにエクソゾーム(exosome)と呼ばれる微小小胞の放出が関わりとされる。犬では網状赤血球のNa,K-ATPaseがこの過程で消失し、成熟赤血球は一般に高Na⁺、低K⁺のLK型赤血球となる。一方で、柴犬等には遺伝的にNa,K-ATPaseを保持したHK型赤血球をもつ個体が存在する。本研究は、犬網状赤血球成熟過程におけるNa,K-ATPase消失におけるエクソゾームの役割と、そのHK/LK赤血球表現型との関連の解明を目指したものである。

第1章では、まず犬網状赤血球の成熟過程で放出される直径20~60 nmの小胞がHsc70、TfRなど、既報エクソゾームの指標となるタンパク質を主要成分として含むことに基づきこれをエクソゾームと同定した。網状赤血球膜に含まれるが赤血球膜には存在しないNa,K-ATPase α サブユニット、Hsc70、TfR、GLUT1、ならびに脂質ラフトタンパク質のひとつstomatinがいずれもこのエクソゾームに含まれるのに対し、赤血球膜の主要タンパク質、バンド3、スペクトリンは存在しなかった。ショ糖密度勾配遠心により分画したエクソゾームでは、主にラフトマーカのGM1と同じ画分に、次いで比重の小さな画分にHsc70、TfR、stomatinが多く含まれていたのに対し、Na,K-ATPaseは比重の小さい画分に主に分布していた。したがって、網状赤血球エクソゾームの組成は均一ではなく、タンパク質構成の異なるポピュレーションから成ることが明らかになるとともに、Na,K-ATPaseと一部のstomatin、Hsc70が同一ポピュレーションに含まれることが示唆された。

そこで第2章では、overhydrated stomatocytosis (OHSt)患者における欠損を発端に見出され様々なトランスポーターとの相互作用が提唱されているstomatinに焦点をあてた。HK型(*hk/hk*)の赤血球膜におけるstomatin含量がヒト赤血球と同程度であるのに比べ、LK型(*lk/lk*)はその2%以下でOHSt患者と同様の低値を示した。また、遺伝子型*hk/lk*のLK型赤血球のstomatin含量はHK型の10%程度で、*hk/hk*型、ならびに*lk/lk*型と明確な差異を示した。ま

た、HK 型の赤血球、網状赤血球の stomatin 含量は LK 型(*lk/lk*)網状赤血球の 10 倍程度であり、Na,K-ATPase と GLUT1 にもこれに類似した量的関係が認められたが、HK 型、LK 型の網状赤血球の TfR 含量は同程度であった。これらの成績は、HK 型と LK 型は stomatin と Na,K-ATPase の減少を網状赤血球の成熟過程で同様に生じることを明らかにし、また成熟赤血球の HK/LK 表現型が両型の赤芽球系前駆細胞における発現量の差違に基づくことを示唆するものである。

以上のように、本研究は、複数のポピュレーションを含む犬網状赤血球エクソゾームが Na,K-ATPase や stomatin をはじめとする膜タンパク質の同時、かつ選択的な除去に寄与すること、さらに stomatin の膜含量が HK/LK 遺伝子型の指標となることを明らかにしたものであり、犬をはじめとする哺乳動物種ごとに特有な HK/LK 赤血球表現型発現の機序、および関連する溶血性疾患の易罹患性の解明に資するものである。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者小松智彦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。