



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Morphogenesis of ellipsoidal camelid red cells : a possible role of a hyperstable membrane skeleton due to a novel alternatively spliced 4.1R [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 陳, 玉琪                                                                                                                                                                                                            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                                                            |
| Degree Name         | 博士(獣医学)                                                                                                                                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第15511号                                                                                                                                                                                                         |
| Issue Date          | 2023-03-23                                                                                                                                                                                                       |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/89927">https://hdl.handle.net/2115/89927</a>                                                                                                                                |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                                                                          |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                                                  |
| File Information    | Yuqi_Chen_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                                                                                      |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：陳 玉琪（Chen Yuqi）

|      |        |         |
|------|--------|---------|
| 審査委員 | 主査 教授  | 木 村 和 弘 |
|      | 副査 教授  | 稲 葉 睦   |
|      | 副査 教授  | 滝 口 満 喜 |
|      | 副査 准教授 | 市 居 修   |

## 学位論文題名

**Morphogenesis of ellipsoidal camelid red cells: a possible role of a hyperstable membrane skeleton due to a novel alternatively spliced 4.1R**

（ラクダ科動物の赤血球が楕円形である仕組み：特徴的構造をもつ 4.1R による膜骨格の超安定化作用）

ラクダ科動物の赤血球は、扁平、小球性の楕円形状をもち、膜変形能は極めて低い。これは、多くの哺乳動物の赤血球が中窪み円盤状の形態をもち、高い変形能を有することと大きく異なる特徴である。赤血球の形態と変形能はスペクトリン、アクチン、ならびに 4.1R から構成される膜骨格の構造と物理的性状・機能に依存する。スペクトリンや 4.1R の異常は、貧血をとまなうヒト・動物の遺伝性楕円赤血球症を引き起こす。したがって、ラクダ科赤血球の楕円形状の要因として、膜骨格が他種哺乳動物とは異なる構造や物理的性状をもつことが示唆される。本研究では、ラクダ科の赤血球が楕円形状をもつ仕組みの解明を目的に、アルパカ赤血球膜骨格のタンパク質 4.1R に焦点をあて、その構造と機能の解析を行った。

哺乳動物赤血球の 4.1R のアミノ酸配列は種間でよく保存されており、その電気泳動上の分子質量は 80 kDa である(4.1R<sup>80</sup>)。まず、免疫ブロッティングでの解析で、アルパカ赤血球膜の 4.1R を同定し、これが 90 kDa の質量を示す(4.1R<sup>90</sup>)ことを明らかにした。次いで末梢血の網状赤血球の 4.1R cDNA 配列を解析し、エクソン 13 由来配列の C 末端領域にプロリンとグルタミン酸を多く含む配列(PE)が存在すること、ならびにスペクトリン-アクチン結合ドメイン(SABD)の N 末端側にエクソン 14 由来の配列(e14)が存在することを示した。エクソン 14 は可変スプライシングによって組織・時期特異的に発現するもので、他種の赤血球 4.1R<sup>80</sup> の mRNA には存在せず、PE 配列も他種にはない。さらに、LC-MS/MS 解析、ならびに抗 e14 抗体を用いた免疫ブロッティングと免疫染色でアルパカ 4.1R<sup>90</sup> が実際に PE と e14 配列をもつことを実証した。続いて、末梢血単核球から 2 段階培養法によって得られた多染性／正染性赤芽球と末梢血由来網状赤血球とでエクソン 14 の発現を比較し、赤芽球の成熟にしたがってエクソン 14 を含む転写産物の割合が大きくなることを明らかにした。

かにした。

次いで、4.1R が溶液中スペクトリン-アクチン間結合を安定化させ溶液粘度を増加させることを利用して、PE、e14 配列が 4.1R 機能に及ぼす影響を検討した。すなわち、ヒト 4.1R (h4.1R WT)に PE と e14 (PE14)を組み込んだ h4.1R[PE14]、あるいは PE を単独で組み込んだ h4.1R[PE]を作製し、それぞれを加えたスペクトリン-アクチン溶液の粘度変化を解析した。その結果、h4.1R[PE14]はスペクトリン-アクチン-4.1R 三者複合体の形成を著しく促進することが判明した。一方で、h4.1R[PE]には促進作用は認められなかった。また、無症候性のヒト遺伝性楕円赤血球症の原因となる SABD の重複変異体に相当する h4.1R(SABD)<sub>2</sub> も h4.1R[PE14]と同様に三者複合体形成を顕著に増強する作用を示した。さらに、 $\beta$ -スペクトリンとの結合において、h4.1R[PE14]は h4.1R WT に比べて平衡解離定数  $K_D$  で 5 倍高い結合親和性を示した。

これらの知見は、e14 配列をもつ 4.1R<sup>90</sup> が、スペクトリン-アクチン-4.1R 間結合の増強を介して、末梢循環血中で受けるシアストレスにより伸展・変形した膜骨格構造を不可逆的に超安定化させることが、ラクダ科赤血球の楕円形状の形成と維持の分子基盤となり得ることを明確に示したものである。本研究の知見は、進化過程における 4.1R 遺伝子可変スプライシング制御の変化が、脊椎動物全般における赤血球形態の多様性を生じた一因となることを示した点で生物学上の大きなインパクトを有する。また、人工的な機能的赤血球生産にも有益な示唆をもたらすものと期待される。よって審査員一同は、上記学位論文提出者陳玉琪(Chen Yuqi)氏の学位論文が北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。