

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590289

研究課題名（和文） 核の無い赤血球の寿命はどのように定められているのか

研究課題名（英文） An ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes

研究代表者 萬野 純恵（ MANNO SUMIE ）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10101205

研究成果の概要（和文）：赤血球には「核」が無い。したがって「アポトーシス」は起こらない。しかし、寿命はほぼ正確に120日に定められている。何が赤血球の寿命を規定しているのだろうか？様々な要因が想定されるが、いづれにせよ赤血球は日数を重ねるとともに変形能が低下し脾洞内皮細胞の間隙を通過できなくなり、マクロファージに貪食されることで寿命を全うする。したがって、赤血球の寿命を規定する要因は時間依存性に変形能を低下させる変化であるに違いないとの考えの基に、赤血球変形能の維持を担う膜骨格蛋白質スペクトリンの時間依存的、非可逆的な糖化修飾が赤血球寿命を定めているとの独自の仮説を検証したところ、この仕組みに、生存に必須のATPの関与の重要性を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Human erythrocytes are continuously exposed to glucose which reacts with the amino terminus of the α -chain of hemoglobin (Hb) to form glycated Hb, HbA1c, levels of which increase with the age of the circulating cell. In contrast to extensive insights into glycation of hemoglobin, little is known about glycation of erythrocyte membrane proteins. In the present study, we explored the conditions under which glucose and ribose can glycate spectrin, both on the intact membrane and in solution and the functional consequences of spectrin glycation. While purified spectrin could be readily glycated, membrane-associated spectrin could be glycated only after ATP depletion and consequent translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner to the outer lipid monolayer. Glycation of membrane-associated spectrin led to a marked decrease in membrane deformability. We further observed that only PS-binding spectrin repeats are glycated. We infer that the absence of glycation *in situ* is the consequence of the interaction of the target lysine and arginine residues with PS and thus being inaccessible for glycation. The reduced membrane deformability following glycation in the absence of ATP is likely the result of the inability of the glycated spectrin repeats to undergo the obligatory unfolding as a consequence of inter-helix crosslinks. We thus postulate that erythrocytes through the use of an ATP-driven phospholipids translocase have evolved a protective mechanism against spectrin glycation and thus maintain their optimal membrane function during their long circulatory life span.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：赤血球、スペクトリン、変形能（膜伸展性）、糖化、リポース、ペントシジン、寿命、ATP

1. 研究開始当初の背景

変形能は主に細胞膜を裏打ちする膜骨格ネットワークの主要構成蛋白質であるスペクトリン分子自体の屈伸性によって維持されている。実際、スペクトリン分子は三つのヘリックスからなる分節（三つ折れ構造）が繰り返されて線維状を形成し、丁度エキスパンダーのような伸び縮みをすることによって細胞に変形能を与える。スペクトリン分子に起こる翻訳後修飾として我々は従来リン酸化が膜機能を調節することを示してきた(J.Biol.Chem. 1995&2005)が、常に血糖に曝されている赤血球内のヘモグロビンが糖化され(HbA1c)糖尿病の血糖値の指標とされていることから、我々は同一環境にある膜骨格蛋白質も糖化修飾されうるに違いないとの着想を持つに至った。既に我々は赤血球を高血糖状態に曝すとスペクトリンが特異的かつ非可逆的に糖化修飾(Advanced end products; AGE化)され、呼応して変形能が低下することを見出していた。おそらく三つ折れ構造に架橋が起こり伸展性を失ったものと考えられ、新しい知見として今年の Gordon Research Conferenceでも注目を集めた。一方、「糖化

は健常者でも起こっている」ことを前提に、長時間循環している老化赤血球（高比重赤血球）では HbA1c 量が多く、変形能も低下していることを見いだしていた。

2. 研究の目的

核の無い赤血球ではあるが 120 日間は循環して組織に酸素を供給し、寿命がくると変形能が低下し脾臓でマクロファージに捕捉されて血中から排除される。本研究ではこの仕組みに、生存に必須の ATP を産生する糖が関与していることを検証した。

3. 研究の方法

生存に必要な糖は spectrin が PS に結合して糖化部位をマスクするために必要であることを示した。すなわち、糖化していない spectrin は PS 結合性があること (*in vitro*)、解糖がすすみ ATP が十分に存在する赤血球では糖化は起こらないこと (*in vivo*) を示した。一方、排除に貢献する糖は何らかの要因で糖化部位が露出し糖化 spectrin の PS 結合性が低下するとともに、生じた分子内架橋は膜の変形能が低下させることを示しつつ、その結果細胞は PS を表在化しマクロファージによる捕捉が亢進されることを示した。

< *In vitro* 実験 >

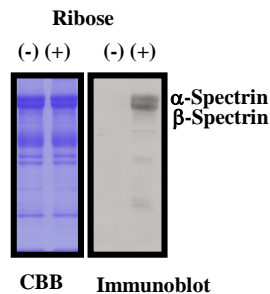
- (1) spectrin の赤血球膜からの抽出・精製
- (2) spectrin の糖化部位を含むリコンビナントペプチドの調製
- (3) PS リポソームを調製し、spectrin の結合を SDS-PAGE で確認する。
- (4) ATP の存在の有無でゴーストを作成し糖化に対する反応性を比較する。

< *In vivo* 実験 >

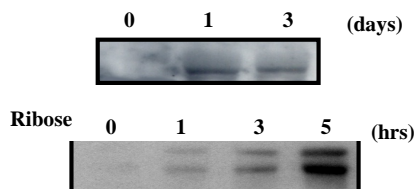
- (1) 赤血球を糖化し、spectrin の糖化の程度と変形能の低下を確認
- (2) spectrin の糖化の程度；Immunoblot 法
- (3) 変形能の低下；自作のEktacytometerを使用（レーザー回折法に基づく自作の装置。糖化後、再封したゴースト粘調な溶液に入れ、shear stressの増加に伴う変形指数の増加をモニターして評価する。）

4. 研究成果

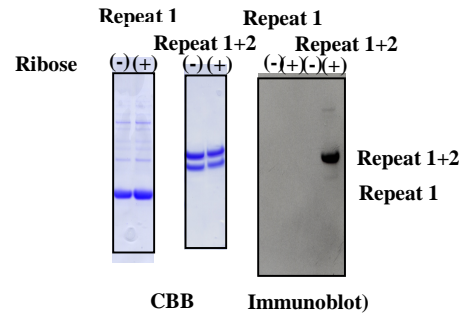
- (1) 赤血球膜蛋白質の内、スペクトリンが主に糖化（ペントシジン化）された。



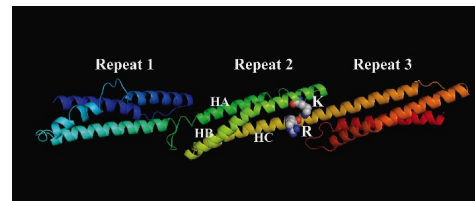
- (2) スペクトリンの糖化はグルコースに比べてリボースの方が反応性は高かった。



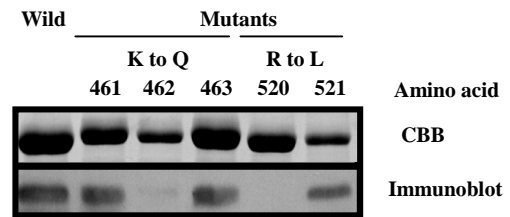
- (3) スペクトリンの糖化部位は、鎖のリピート2でありこれはPS結合部位であった。



- (4) リピート2内の予想架橋部位

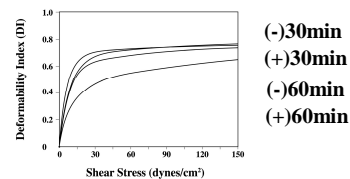


- (5) 変異リピート2を作成し糖化を検討し、部位を確定した。

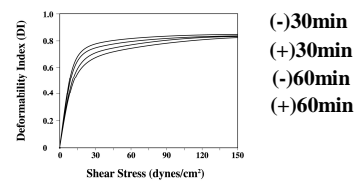


- (6) ATP を維持して作成したゴーストでは糖化は起こらず、変形能も低下しなかった。

Control



ATP ghosts



以上の結果から、赤血球の糖化には生存に必須のATPを産生する糖が関与していることを検証した。

時間依存性で非可逆の糖化は長命の蛋白質に顕著に見られる。本研究は蛋白質が代謝されない(合成がない)赤血球を用い変形能に必須の spectrin に起る糖化を対象とした。また、核の無い(アポトーシスの無い)細胞の生存と排除が共に糖に依存するのではないかとの着想に長年の研究実績から沸き上がった独創性があり、本年の Gordon Research Conference でも注目を集めた。仮説としては「生存」は解糖により産生されるATP依存性 flippase によるPSの内層局在(外層露出によるマクロファージの貪食を防ぐ)であり、「排除」は spectrin の pentosidine 架橋による変形能(unfolding)の低下に起因するとの結果が予想された。糖化は非酵素、非可逆反応であることに鑑み、一般に長寿命細胞(神経細胞など)における spectrin 類似蛋白質での時間依存性の糖化の蓄積から細胞機能低下の機序を探る端緒を開く意義は大きいと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Koshino I, Takakuwa Y

Disruption of lipid rafts by lidocaine inhibits erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*

Exp. Parasitol. 、査読有

Nunomura W, Parra M, Hebiguchi M, Sawada K, Mohandas N, and Takakuwa Y

Marked difference in membrane protein binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation

Biochem J, 417 141-148, 2009、**査読有**

Kamata K, Manno S, Ozaki M, Takakuwa Y
Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gs in rafts is essential for signal transduction
Am J Hematol. 83.5.371-375.2008、**査読有**
Hebiguchi Miwa, Takakuwa Y et.al(12/13)
Dynamics of human erythroblast enucleation.

Int. J. Hematol. 88.5.498-507, 2008、**査読有**

越野 一朗、高桑 雄一

赤血球膜とマラリア原虫

検査と技術、36.2.164-166, 2008、**査読有**

萬野 純恵、高桑 雄一

翻訳後修飾による赤血球膜機能の調節
膜、32,3,122-128,2007、**査読有**

Boampong J N, Manno S, Koshino I, Takakuwa Y

Erythrocyte Shape Change Prevents Plasmodium falciparum Invasion Membrane、32,2,95-102,2007、**査読有**

[学会発表](計6件)

Manno S, Mohandas N, Takakuwa Y, The red cells have evolved an ATP-dependent protection mechanism against spectrin glycation, Gordon research conference, 2009, 7, 24, USA

萬野純恵、高桑雄一、赤血球における Spectrin の糖化部位の解析と糖化防御機構の解明、第 82 回日本生化学会大会、2009, 10, 21、神戸

萬野純恵、高桑雄一、赤血球は ATP 濃度を維持することにより Spectrin の糖化を防ぐ機構を備えている、第 81 回日本生化学会大会、2008, 12, 9、神戸

Manno S, Takakuwa Y, The red cells have evolved an ATP-dependent protection mechanism against spectrin glycation, W. Meibaum-Katzenellebogen's Molecular Biology Seminars, 2008, 6, 15, Zakopane

萬野純恵、高桑雄一、スペクトリンの糖化による赤血球膜機能、第 80 回日本生化学会大会、2007, 12, 11、横浜

萬野純恵、高桑雄一、赤血球膜機能の糖化による調節、日本膜学会第 29 年会、2007, 5, 10、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

萬野 純恵 (MANNO SUMIE)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10101205

(2)研究分担者

高桑 雄一 (TAKAKUWA YUICHI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40113740