

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21780282  
 研究課題名（和文） 牛ピロプラズマ病抗病性をもたらす牛赤血球膜グライコフォリンAの分子多型解析  
 研究課題名（英文） The study of molecular polymorphisms of glycophorin A oligomer in bovine red blood cells associated with the bovine piroplasmosis resistibility  
 研究代表者  
 大塚 弥生 (OTSUKA YAYOI)  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員  
 研究者番号：30396303

## 研究成果の概要（和文）：

牛赤血球膜グライコフォリンA(GPA)が赤血球膜上で形成する500 kDa以上の高分子複合体(GPAヘテロオリゴマー)にはGPAとともにGPB、CD58が含まれること、GPBには変異体が存在し、牛血液型Fシステムの抗原分子として機能することを実証した。牛ピロプラズマ原虫の赤血球侵入とFシステムとの関連性を*Theileria orientalis*との共培養系で解析したが、原虫の赤血球内侵入はいずれの赤血球でも認められず、抗病性の評価には至らなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

The present study demonstrated that a high-molecular weight sialoglycoprotein with apparent molecular masses >500 kDa (GPA oligomer) in bovine erythrocyte membranes consists of glycophorin A, glycophorin B, and CD58. GPA oligomers showed variety among individuals in their protein compositions, contents and sizes. Moreover, there were served different glycophorin B variants and this variation in glycophorin B species appeared to represent the blood group system F. Moreover, diversity of GPA oligomer might be involved in protozoan infectivity into bovine red cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：牛ピロプラズマ病・グライコフォリンA・受容体・シアル酸・シアロ糖蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

牛ピロプラズマ病は貧血・黄疸・発育不良を主徴とする我が国の代表的な放牧病で、バベシアやタイレリア原虫の赤血球内寄生に起因する。以前より牛ピロプラズマ病に対する抗病性に品種差・個体差があることが知られているが、その理由は不明である。

グライコフォリンは膜を一回貫通するシアロ糖タンパク質であり、ヒトではA～Eまで5種のアイソフォームが存在する。ヒトの赤血球に寄生するマラリア原虫は赤血球膜のシアル酸を認識して赤血球に接着することが知られ、主要な赤血球膜シアロ糖蛋白質であるグライコフォリンA(GPA)はマラリア原虫が赤

血球に侵入する際の受容体とされている。またマラリアと同じアピコンプレクサのバベシア原虫の感染に対し、GPAがマウスは抵抗性を示すことも報告され、赤血球表面のGPAやシアル酸が原虫侵入の受容体であるという見解が一般的になりつつある。

牛 GPA は赤血球膜上において還元条件下、SDS で可溶化されない巨大なサイズ (>500 kDa) を示すヘテロオリゴマーを形成することが申請者らの研究から分かっている。さらに GPA オリゴマーの PAS 染色性(シアル酸量)および分子サイズに個体差があり、遺伝性を示唆する規則性が認められる。牛の場合 GPA オリゴマーが主たる赤血球表面のシアロ糖タンパク質であることから、GPA オリゴマーの個体差と遺伝的要素はその個体の赤血球膜表面の性状にも大きく影響していると考えられる。ヒトやマウスの研究から牛赤血球においても GPA がバベシアやタイレリア原虫の受容体として作用していると推測され、GPA オリゴマーのもたらす赤血球膜表面の性状の個体差が、牛ピロプラズマ病に対する抗病性に寄与する可能性を強く示唆される。

## 2. 研究の目的

本申請期間中に、自らの研究より得た「主要PAS陽性シアロ糖タンパク質複合体の性質に個体差をもたらすGPA分子の遺伝的基盤」を(1)(2)にて解析し「GPA分子のもたらす赤血球表面性状の差と、牛ピロプラズマ病に対する抗病性」を(3)(4)にて実証し関連づける。

(1) 牛各個体の持つGPA遺伝子配列、赤血球膜シアロ糖タンパク質(GPAオリゴマー)のPAS染色性・分子サイズの解析を行い、品種・家系および系統などの遺伝的要因がどのように関連するのか、その規則性を同定しグループ化する。

(2) 各グループより牛を選定し、各牛赤血球より粗グライコフォリン画分を抽出し、赤血球膜上でGPA と共にオリゴマーを構成する分子の探索と糖鎖の組成・分配を解析し、GPA分子がもたらす遺伝的規則性が赤血球膜表面の性状にどのような差違として表れるのか解析する。

(3) グループ各個体の牛赤血球を用いて試験管内原虫感染実験を行い、原虫の赤血球内寄生率により原虫侵入感受性・抵抗性を評価する。

(4) リコンビナントタンパク質および牛赤血球膜より分離したGPAが含まれる粗グライコフォリン画分を用いて、原虫の赤血球侵入を阻害出来るかどうか検証し、GPAおよびそのシアル糖鎖が真に原虫の受容体として作用す

るのか検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 血液型Fシステムを用いた牛赤血球の血液型分類

牛赤血球は生理食塩水にて3回洗浄後、2%懸濁液を作製した。抗F抗体および抗V2抗体はそれぞれ $2^0$ - $2^4$ の段階希釈となるように生理食塩水にて希釈した。96ウェルプレートに赤血球懸濁液10  $\mu$ l、ウサギ・モルモット補体溶液10  $\mu$ lと抗体希釈液を加え37°Cで2時間培養し、溶血を指標に牛血液型をFF、FV2、V2V2型に分類した。

(2) 赤血球膜GPA 分子の解析

牛赤血球膜画分は低張溶血処理により得、SDS-PAGE後、PAS 染色にてシアル酸の付加を相対的に定量した。牛赤血球膜GPA 量は申請者らが作製した抗牛GPA-C末端抗体(anti-GPA-Ct)を用いてイムノブロット(IB)を行いGPA オリゴマーの分子サイズ・含有量を定量した。

(3) 牛GPA 遺伝子の解析

牛GPA 遺伝子のエクソン2 および3が細胞外領域をコードすること、細胞外領域には5個のO-結合型糖鎖が付加し得ることが分かっている(図1)。牛ゲノムDNA を全血より抽出し、DNA シークエンス法にてGPAの遺伝子多型を解析した。

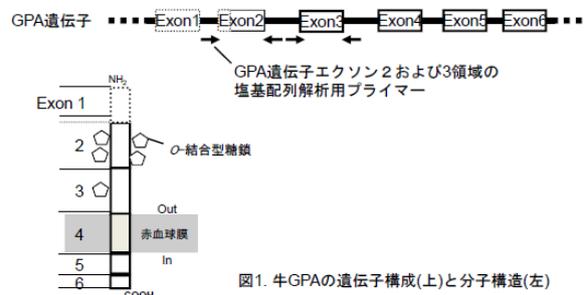


図1. 牛GPAの遺伝子構成(上)と分子構造(左)

(4) 粗グライコフォリン画分を用いたGPAオリゴマー構成分子の解析

牛赤血球膜画分よりリチウムジヨードサリチル酸/フェノール抽出法にて粗グライコフォリン画分を分離した。次にSDS-PAGEにて蛋白質を分離後、銀染色し、>500 kDaに位置するバンドを抽出し、Nano-LC-MASS分析によってGPAオリゴマー構成分子の解析・同定を行った。

(5) 高分子複合体形成機構の解析

pcDNA3.1にGPA、GPBF、GPBV2、CD58、Band 3をそれぞれ組み込み、発現ベクターを構築した。CHO細胞に一過性発現後、複合体の形成をIBにて解析した。

(6) 牛赤血球を用いた牛ピロプラズマ原虫

## Theileria orientalis試験管内感染実験

*Theileria orientalis*(TO)は末梢血由来単核細胞内にて持続感染しているものを用いた。FFおよびV2V2型牛赤血球5%(v/v)懸濁液をTO感染細胞培養系に0.2%となるように加え、試験管内培養実験を行った。経時的に血液塗抹標本を作製し、ギムザ染色にて赤血球内の原虫寄生率を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 牛赤血球膜GPAオリゴマーのPAS染色性とGPA含量

FF、FV2、V2V2血液型の牛赤血球膜画分を電気泳動後、PAS染色ならびにanti-GPA-Ctを用いてIBを行った。500 kDaよりも大きなサイズのGPAオリゴマーのPAS染色性とanti-GPA-Ctによるシグナル強度と分子サイズにおいて、血液型による相関関係が認められた(図2A、B)。

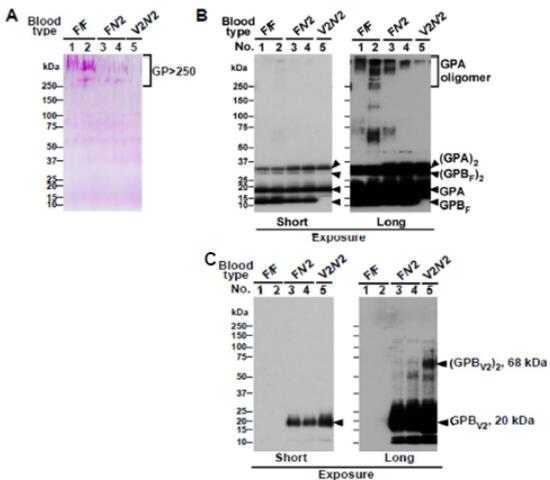


図2. 牛赤血球膜画分のPAS染色(A)とIB(B, Anti-GPA-CtおよびC, Anti-GPB-V2)

#### (2) Fシステム抗原分子の同定

図2Bに示すように、FF、FV2血液型の牛赤血球ではanti-GPA-Ctによって、14 kDaのバンドが認められる一方、V2V2型赤血球では検出されなかった。このことからFシステムの抗原分子である可能性が示唆された。FV2血液型の牛骨髄から抽出したRNAを用いてクローニングを行った結果、2つのPCR断片が得られ、便宜上GPBF、GPBV2とした(図3A)。GPBFの細胞質内領域のアミノ酸配列はGPAと相関性が高く、anti-GPA-Ctによって認識されると考えられた(図3B)。一方GPBV2の細胞質内領域のアミノ酸配列はGPA、GPBFとは大きく異なっていたため、新たに抗牛GPB-V2抗体(anti-GPB-V2)を作製しIBを行った。その結果、FV2、V2V2型赤血球において20 kDaのバンドが検出された(図2C)。この結果からFシステムを担う抗原分子はGPBであ

ることが明らかとなった。

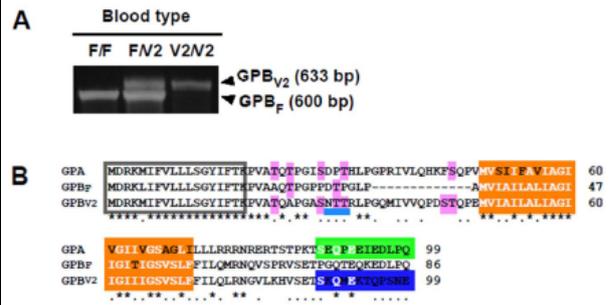


図3. 牛GPB遺伝子のクローニング(A)と推定アミノ酸配列(B) 緑はAnti-GPA-Ct、青はAnti-GPB-V2の抗原ペプチド配列

#### (3) 牛GPA遺伝子の解析

GPAオリゴマーのPAS染色性および分子サイズの異なる個体を選出し、牛血液よりゲノムDNAを採取した。牛GPA遺伝子のエクソン2および3領域の塩基配列を解析するために、イントロン1と2および2と3(図1)にそれぞれプライマーを設計し、PCRを行った。得たPCR産物をダイレクトシーケンス法によって塩基配列を比較したところ、アミノ酸置換は認められず、推定されるO-結合型糖鎖付加部位に増減をもたらす結果は得られなかった。

#### (4) 粗グライコフォリン画分を用いたGPAオリゴマー構成分子の解析

GPAオリゴマーの成分をNano-LC-MASSにて分析した。その結果、GPA、GPBとともにCD58、Band 3が含まれていた。

#### (5) 高分子複合体形成機構の解析

GPAの単独発現ではモノマーとホモダイマーが形成されたが、GPBはモノマーのみ検出された。続いてGPAと共にGPB、CD58、あるいはBand 3をそれぞれCHO細胞に導入し複合体形成の有無を解析したところ、いずれも細胞膜に発現することが確認できたが、それらはすべてSDS可溶化物のモノマーとして存在し、複合体形成は認められなかった。一方、健常牛の赤血球膜画分ではGPAモノマー、ダイマー、オリゴマーが検出されたが、Band 3欠損牛の赤血球膜におけるGPAモノマー、オリゴマー量は著しく少なく、ダイマーは検出できなかった。これらの結果から、GPAの高分子複合体形成には、その構成成分であるGPA、GPB、CD58、ならびにBand 3のうち、Band 3を含む少なくとも3種以上の分子が必要であることが推測された。

#### (6) TO原虫試験管内感染実験

Fシステムにて分類した牛赤血球を用いて、単核細胞にて試験管培養されているTO原虫との共培養実験を行った。しかし原虫の単核細胞から赤血球内への移行はいずれの赤血球

でも認められず(図4)、抗病性の評価には至らなかった。

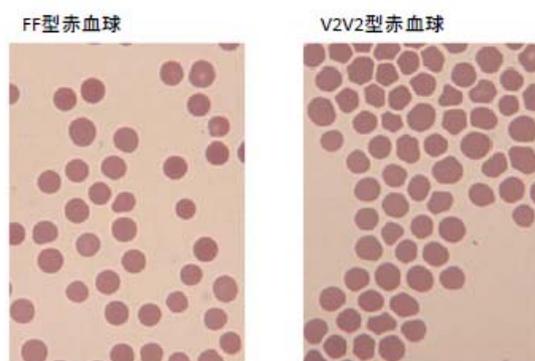


図4. TO寄生単核細胞と培養したRBCの塗沫標本 培養開始14日目

#### 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3件)

(1) Komatsu T, Sato K, Otsuka Y, Arashiki N, Tanaka K, Tamahara S, Ono KI, Inaba M. 「Parallel reductions in stomatin and Na,K-ATPase through the exosomal pathway during reticulocyte maturation in dogs: stomatin as a genotypic and phenotypic marker of high K<sup>+</sup> and low K<sup>+</sup> red cells.」 *J Vet Med Sci*. 2010. 62(7): 737-741. 査読有り

(2) Arashiki N, Otsuka Y, Ito D, Yang M, Komatsu T, Sato K, Inaba M. 「The covalent modification of spectrin in red cell membranes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal.」 *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. 391(3): 1543-1547. 査読有り

(3) Adachi H, Ito D, Kurooka T, Otsuka Y, Arashiki N, Sato K, Inaba M. 「Structural implications of the EL(K/Q)(L/C)LD(A/G)DD sequence in the C-terminal cytoplasmic tail for proper targeting of anion exchanger 1 to the plasma membrane.」 *Jpn J Vet Res*. 2009. 57(3): 135-146. 査読有り

[学会発表] (計7件)

(1) 王 振吉、大塚弥生、大津 航、佐藤耕太、稲葉 睦 「細胞質内ドメインYXXΦ 配列によるマウスAnion Exchanger 1 (AE1)の細胞内への小胞輸送制御」第150回日本獣医学会 2010年9月17日 北海道帯広市 帯広畜産大学

(2) 桂嶋勇輔、大津 航、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦 「R664X変異型Anion Exchanger 1の小胞体関連分解におけるBap31とDerlin-1の働き」第150回日本獣医学会 2010年9月17

日北海道帯広市 帯広畜産大学

(3) 佐藤耕太、大津 航、大塚弥生、稲葉 睦 「GLAST型グルタミン酸輸送体発現赤芽球細胞株の確立とGLAST分子の細胞内分布の解析」日本膜学会第32年会 2010年5月3日 東京都江東区 産業技術総合研究所

(4) 大塚弥生、大村俊弥、大津 航、黒木一仁、森田光夫、佐藤耕太、稲葉 睦 「牛赤血球膜のグライコフォリンAとBによる高分子シアロ糖蛋白質複合体の形成」第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド

(5) 大塚弥生、稲葉 睦 「牛遺伝子にみられる多型：血液型抗原を中心に」獣医臨床遺伝研究会 第18回年会 2009年10月17日 山形県天童市 天童ホテル

(6) 大塚弥生、大村俊弥、大津 航、黒木一仁、森田光夫、佐藤耕太、稲葉 睦 「牛赤血球膜グライコフォリンA&B：性状と血液型抗原との関連」第148回日本獣医学会学術集会 2009年9月25日 鳥取県鳥取市 鳥取市民会館

(7) 大塚弥生、大村俊弥、新敷信人、小松智彦、黒木一仁、佐藤耕太、稲葉 睦 「牛赤血球膜グライコフォリンA&B：性状と血液型抗原との関連」日本膜学会第31年会2009年5月2日 東京都新宿区 東京理科大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 弥生 (OTSUKA YAYOI) (北海道大学・大学院・獣医学研究科・博士研究員) 研究者番号：30396303

(2) 連携研究者

稲葉 睦 (INABA MUTSUMI) (北海道大学・大学院・獣医学研究科・教授) 研究者番号：00183179

佐藤 耕太 (SATO KOTA) (北海道大学・大学院・獣医学研究科・准教授) 研究者番号：50283974