



## Proper cytoskeletal architecture beneath the plasma membrane of red blood cells requires Ttl4

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ijaz, Faryal メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/3151">http://hdl.handle.net/10271/3151</a>

博士(医学) Faryal Ijaz

論文題目

Proper cytoskeletal architecture beneath the plasma membrane of red blood cells requires *Ttll4*

(赤血球形質膜下の適切な細胞骨格構築は *Ttll4* を必要とする)

論文の内容の要旨

[はじめに]

赤血球の細胞膜は細胞骨格の組織化によって、繰り返される機械的負荷に対する耐性を得ている。赤血球細胞膜の細胞骨格は、準六方格子に配置されている。この格子構造が破壊されると膜が不安定化し、赤血球の形状に変化が生じるとともに赤血球の生理機能が損なわれる。

チューブリンチロシンリガーゼ様タンパク質 4 (TTLL4) は、チューブリンチロシンリガーゼ様 (TTLL) タンパク質ファミリーのメンバーであり、グルタミル化開始グルタミン酸リガーゼの一つである。グルタミル化は標的タンパク質中のグルタミン酸残基の側鎖にグルタミン酸が付加される翻訳後修飾である。TTLL4 はチューブリンやヌクレオソーム集合タンパク質 1 (NAP1) などのタンパク質をグルタミル化する。

本研究では、*Ttll4* 欠損 (*Ttll4*-KO) マウスの赤血球に生じる形質膜下細胞骨格の異常を報告する。

[材料ならびに方法]

全ての動物実験は浜松医科大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C57BL/6J 野生型および *Ttll4*-KO マウスの全血 (200  $\mu$ L) を心臓または尾静脈から 2  $\mu$ L の 10% EDTA を含むプラスチックチューブまたはヘパリン含有毛細管に採取した。C57BL/6J 野生型および *Ttll4*-KO マウス両方の溶血性貧血のマウスモデルは、20 mg/kg のフェニルヒドラジン (PHZ) を腹腔内投与することによって作製した。ギムザ染色は、全血の塗抹標本を空気乾燥した後メタノールで固定し、ギムザ液で染色した。

赤血球の膜骨格は、ホルムバルと炭素被覆銅グリッドに貼付した。次に、貼付した膜骨格をグルタルアルデヒドで固定し、酢酸ウランを用いて染色して透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。

赤血球における TTLL4 の基質の探索は、免疫沈降法およびウェスタンブロットにより行った。TTLL4 による NAP1 のグルタミル化が NAP1 と膜タンパク質との相互作用に及ぼす効果を評価するために、野生型および *Ttll4*-KO の赤血球細胞膜画分を各種濃度 (110, 210, 310 mM) の塩化カリウム (KCl) を含む溶解バッファー (50 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 10% glycerol, pH 7.5) 中でインキュベートした後、上清および残りの膜ペレット画分それぞれに存在する NAP1 の量を定量解析した。

## [結果]

ギムザ染色された血液細胞塗抹標本において、*Till4*-KO マウスと野生型マウスの赤血球の形状に差が認められた。*Till4*-KO 赤血球の平均直径 (5.77  $\mu\text{m}$ ) は野生型赤血球のそれ (5.37  $\mu\text{m}$ ) に比べて有意に大きかった ( $p = 0.017$ )。

赤血球細胞膜の細胞骨格の微細構造解析により、赤血球細胞膜細胞骨格の平均格子細孔密度が *Till4*-KO の赤血球では 9.5 穴/ $\mu\text{m}$  である一方、野生型の赤血球では 12.6 穴/ $\mu\text{m}$  と、*Till4*-KO 赤血球で格子密度が減少していることが明らかになった。

免疫沈降法およびウェスタンブロットにより、野生型赤血球に豊富に存在するグルタミル化 NAP1 が *Till4*-KO 赤血球では完全に消失していることが明らかとなった。また、野生型の赤血球において、膜画分中のグルタミル化 NAP1 の存在比 (1.39) は、細胞質画分中の存在比 (0.73) に比べて約 2 倍であった。

グルタミル化が NAP1 と膜タンパク質との相互作用に及ぼす効果を評価する実験では、赤血球細胞膜から上清中に放出される NAP1 の量は KCl 濃度に依存して増加した。また、210 mM の KCl 存在下では、*Till4*-KO 赤血球細胞膜から上清中に放出される NAP1 の量は野生型赤血球細胞膜から放出される量に比べ 1.5 倍高かった。

*Till4*-KO マウスは、PHZ により誘発される酸化ストレスを受けて著しい溶血を示した。*Till4*-KO マウスの赤血球数が 50% 程度減少した一方、野生型マウスの赤血球数減少は約 29% であった。

## [考察]

微細構造解析により見出された *Till4*-KO マウスの赤血球の原形質膜の下に特徴のない穴は、細胞骨格成分の高分子凝集/不安定性を示唆しており、おそらく *Till4*-KO の赤血球の主要な構造的/機能的欠陥によって引き起こされたものである。

非グルタミル化 NAP1 が高塩濃度条件下でグルタミル化 NAP1 より容易に赤血球細胞膜から遊離したことは、NAP1 と赤血球細胞膜との相互作用がグルタミル化依存的な静電相互作用であることを示している。さらに、*Till4* が細胞骨格の形態に必要であること、グルタミル化 NAP1 が膜画分中に多いことから、グルタミル化 NAP1 がそのシャペロン活性を介して細胞骨格構造の安定化に寄与している可能性が示唆される。

PHZ によって誘発される酸化ストレス後の *Till4*-KO マウスにおける溶血の増加と TEM 観察の結果は、細胞骨格の欠陥が *Till4*-KO 赤血球を酸化ストレスに対して脆弱にすることを示している。

## [結論]

赤血球の適切な細胞骨格構築にはポリグルタミル化開始グルタミン酸リガーゼ遺伝子 *Till4* の存在が必要である。