

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09746

研究課題名(和文) エピプラキンの遺伝子の多様性と低分子化機構

研究課題名(英文) Intragenic copy number variation within human epiplakin 1 (EPPK1) generates variation of molecular size of epiplakin

研究代表者

石川 一志 (Ishikawa, Kazushi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80600452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エピプラキンはブラキンファミリー分子の一つであるがBドメイン構造が13個繰り返すと以前報告されていた。本研究ではヒト白血球由来のエピプラキン遺伝子の3'側の規則的な繰り返し構造に多様性が存在することを見いだした。このエピプラキン遺伝子の多様性がエピプラキン分子の多様性の原因になっているか否かを4種の培養細胞を用いて検証した結果エピプラキン分子サイズと繰り返し構造の多寡に相関が見られた。エピプラキンはフィラグリンと分子構造が類似していることからエピプラキン遺伝子の繰り返し構造の多寡をアトピー性皮膚炎罹患患者と非罹患患者とで比較したが差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The protein coding sequence length of EPPK1 was 15.3 kb and estimated the molecular size of the protein to be 555 kDa. However, additional protein bands above and below the dominant 555 kDa protein were observed by immunoblot analysis of epidermal extracts or cell lysates. This study was investigated copy number variation (CNV) of EPPK1. We performed long-range PCR analysis on DNA derived from leukocytes of 13 nonatopic and 10 atopic individuals and from four cell lines. We compared the molecular sizes of epiplakin by immunoblot analysis and CNV. Genetic variations consisting of three to eight, four to eight, or four to nine highly conserved repeats located in the 3' region of EPPK1 were detected in nonatopic, atopic dermatitis groups and cell lines, respectively. The largest and smallest molecular sizes were estimated to be 789 kDa and 439 kDa (17 and 11 B domains), respectively. We concluded that the isoforms of epiplakin is caused by CNV of highly conserved repeats.

研究分野：皮膚

キーワード：エピプラキン 遺伝子 コピー数多様性 HeLa細胞 HaCaT細胞

1. 研究開始当初の背景

エピブラキンは自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定されたブラキンファミリー分子の一つである。ヒトでは、繰り返し構造が13個とされており、マウスでは16個とされていた(Fujiwara 2001, Spazierer 2003)。しかし以前から表皮抽出物や、培養細胞において、分子量の異なる蛋白質バンドが2本見られることがあったが(Fujiwara 1992, Jang 2005, Tsuchisaka 2016)、この理由は不明であった。

2. 研究の目的

最近我々は long PCR の技術を使い、エピブラキン遺伝子の繰り返し構造に多様性が存在することを見いだした(未発表)。今回、このエピブラキンの遺伝子の多様性が、エピブラキンの分子の多様性の原因になっているか否か、およびその生物学的・医学的意義について、特に皮膚疾患との関連について検討したい。

3. 研究の方法

- (1) 13名の非アトピー性皮膚炎の対照群と10名のアトピー性皮膚炎群について、文書による同意書を得た上で、血液からDNAを採取した。
- (2) それぞれのDNAについて、エピブラキン遺伝子の前半部分(1B-8B)、後半部分(8B-XB)に分けて、long PCRを行い、後半部分(8B-13B)のリピート数を推定した。1リンカーと1Bドメインを1リピートとした。
- (3) アトピー性皮膚炎患者群、非アトピー性皮膚炎群で、リピート数の頻度に違いがあるか否か、検討した。
- (4) 3組の母子におけるエピブラキン遺伝子のリピート数が保存されているか否かを検証した。
- (5) クローン化された細胞(HaCaT, HeLa, KU-8, SCC-25)からもDNA、RNA、蛋白質を抽出し、まずエピブラキン遺伝子のリピート数、

翻訳産物の分子量の多様性の有無を検討した。

(6) 5'側転写産物の長さをHaCaT、HeLa、KU-8、SCC-25のRNAを用いてRT-PCRで検討した。

4. 研究成果

(1) エピブラキン遺伝子の前半部分(1B-8B)の長さ

13名の非アトピー性皮膚炎群、10名のアトピー性皮膚炎群では共に、8.1kbで同一であり、これはDNA塩基配列で確認した(図1)。

(2) エピブラキン遺伝子の後半部分(8B-XB)の長さ

13名の非アトピー性皮膚炎群、10名のアトピー性皮膚炎群に、リピート数の多様性(コピー数多様性、copy number variation; CNV)が存在した。非アトピー性皮膚炎群では、3-8リピート(11-16Bドメイン)(図2)、アトピー性皮膚炎群では、4-8リピート(12-16Bドメイン)(図3)が見られた。このPCR産物をBamHIにより切断すると、3つのDNA断片が得られ、エピブラキン遺伝子の3'側部分であることが確認された。

この結果エピブラキン分子は、439kDaから730kDaの分布をとることが推定された。しかし最も頻度の高いリピート数は、非アトピー性皮膚炎群、アトピー性皮膚炎群共に5で、対立遺伝子におけるリピート数の合計も、非アトピー性皮膚炎群10.5に対して、アトピー性皮膚炎群は10.2で両群に有意差を認めなかった。

(3) 3組の母子におけるエピブラキン遺伝子のリピート数

父親由来のDNAは解析できなかったが、3組の母のエピブラキン遺伝子のリピート数は、それぞれの子に保存されていた。

(4) クローン化された細胞のエピブラキン遺伝子のリピート数とエピブラキン分子サイズの相関

4種類の細胞株(HaCaT, HeLa, KU-8,

SCC-25)のエピブラキン遺伝子の後半部分(8B-XB)のリピート数を検討した結果、それぞれ9/7、6/4、5/5、5/5であった(図4)。したがって分子量はHaCaT細胞では789kDa、672kDa、HeLa細胞では614kDa、497kDa、KU-8、SCC-25細胞では555kDaと推定された。抗エピブラキン抗体を用いた免疫プロットでは、これらの分子サイズに矛盾しない結果が得られた(図5)。

(5) エピブラキン 5'側転写産物の長さの推定

エピブラキン遺伝子は3つのエキソンから構成されており、分子はほとんど第3エキソンから転写されることがあきらかになっているが(Takeo, 2003)念のため第1、第2エキソンからの転写の可能性を考えて上記の4種の細胞株のRT-PCRを行った。HaCaT細胞以外は、第1エキソンを含む転写産物が得られたが、第3エキソンの最初のATGの上流には新たなATG配列はなく、いずれの細胞種でも転写は、第3エキソンから始まることが推定された。このため、4種の細胞株のエピブラキン分子サイズの違いは、5'側のスプライシングの違いによるものではなく、3'側のCNVによるものと結論づけられた。

考察

エピブラキン遺伝子にCNVが存在することが初めて明らかになった。エピブラキン遺伝子とフィラグリン遺伝子はよく類似している。共に、3つのエキソンから構成され、翻訳領域が第3エキソンにあり、その部分にCNVが存在するという特徴がある。しかしフィラグリン遺伝子のCNVが10-12であるのに対して、エピブラキン遺伝子のCNVは11-17とより多様性に富んでいた。フィラグリン遺伝子のCNVは、アトピー性皮膚炎の易罹患性に関与することが明らかになっているが(Brown 2012)、エピブラキン遺伝子のCNVの病的、生理的意義は、この研究からは明らか

かにできなかった。今後患者数を増やして、アトピー性皮膚炎や他の皮膚疾患の易罹患性の違いを検証したい。その場合、遺伝子の多様性が、分子の多様性を反映するか、今一度各ヒトのレベルで確認する必要があるが、今回口腔粘膜細胞を用いて、エピブラキンの免疫プロットを試みたが、成功しなかった。蛋白質が微量であるためと考えられ、今後検出感度を向上させる必要がある。

本研究は、ヒト・エピブラキン遺伝子についてCNVが存在することを示したが、おそらくマウスのエピブラキン遺伝子についても同様のCNVが存在すると推察される。ヒトとマウスで遺伝子配列が異なるにもかかわらず、同様に3'側部分にリピート構造が存在することは、その構造の成り立ちを考える上で大変興味深い。

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)

Shimada H, Takeo N, Saito-Shono T, Ishikawa K, Sakai T, Goto M, Hatano Y, Fujiwara S, Matsuda M, Hamada T, Nakama T, Hashimoto T, Kono M, Akiyama M, Kitajima Y. Superficial epidermolytic ichthyosis concomitant with atopic dermatitis. *European Journal of Dermatology*, 査読有、2018、28(1)、pp.94-96.

Saito-Shono T, Nakamura Y, Sakai T, Ishikawa K, Goto M, Takeo N, Hatano Y, Seguchi S, Ishii N, Koga H, Hashimoto T, Fujiwara S. A case of IgA pemphigus foliaceus with high scores on drug-induced lymphocyte stimulation tests secondary to various drugs. *European Journal of Dermatology*, 査読有、2017、27(6)、pp.664-665.

Ishikawa K, Shono-Saito T, Yamate T, Kai Y, Sakai T, Shimizu F, Yamada Y, Mori H,

Noso S, Ikegami H, Kojima H, Tanaka H, Fujiwara S, Hatano Y. A case of fulminant type 1 diabetes mellitus, with a precipitous decrease in pancreatic volume, induced by nivolumab for malignant melanoma: analysis of HLA and CTLA-4 polymorphisms. *European Journal of Dermatology*, 査読有、2017、27(2):184-185.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 一志 (Ishikawa Kazushi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80600452

(2) 研究分担者

島田浩光 (Shimada Hiromitsu)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70330826

工藤純 (Kudo Jun)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80178003

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()

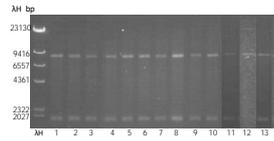


図1 13名の非アトピー性皮膚炎群のエピブラキン遺伝子の前半部分(1B-8B)の長さ 8.1kbで同一であった。

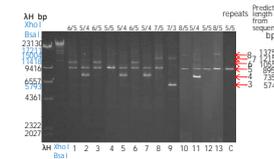


図2 13名の非アトピー性皮膚炎群のエピブラキン遺伝子の後半部分(8B-XB)のリピート数 3-8リピートと多様性を示した。

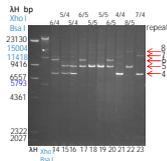


図3 10名のアトピー性皮膚炎群のエピブラキン遺伝子の後半部分(8B-XB)のリピート数 4-8リピートと多様性を示した。

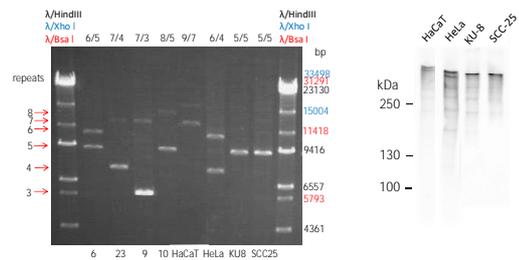


図4 4種の細胞のエピブラキン遺伝子の後半部分(8B-XB)のリピート数 HaCaT細胞は9/7、HeLa細胞は6/4、KU-8、SCC-25は5/5であった。

図5 4種の細胞の抗エピブラキン抗体による免疫プロット HaCaT細胞では789kDa、672kDa、HeLa細胞では614kDa、497kDa、KU-8、SCC-25細胞では555kDaに相当するバンドを認めた。