

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591341

研究課題名（和文）

ヒトヘミデスモソーム構成タンパク質の質量分析による網羅的解析

研究課題名（英文）

Comprehensive analysis of human hemidesmosomal proteins by mass spectrometry

研究代表者：

平子 善章 (HIRAKO YOSHIAKI)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：50377909

研究成果の概要（和文）：

ヘミデスモソーム（HD）は表皮・基底膜間の接着を担うタンパク質複合体である。私は、これまで困難とされていたヒト表皮培養細胞からHD構成タンパク質を豊富に含む画分を単離する事に初めて成功した。この試料に含まれるポリペプチド鎖を質量分析で解析したところ、既知のHD構成タンパク質に加えて、複数種のタンパク質が検出された。これらのタンパク質はHDと何らかの形で協同しながら表皮・基底膜間接着に寄与している事が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Hemidesmosomes (HDs) are protein complexes connecting epidermal basal cells to underlying basement membranes. The present study describes, for the first time, a method to prepare a fraction highly enriched with HD proteins from human material. Mass spectrometry and immunoblotting analyses demonstrated that the fraction contained newly identified proteins in addition to known HD components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：細胞接着、表皮水疱症、自己免疫疾患、ヘミデスモソーム、質量分析

1. 研究開始当初の背景

ヘミデスモソームは主に表皮などの上皮組織において細胞を基底膜に結び付けているタンパク質複合体である。これまでに分かっているヘミデスモソームの主要な構成タンパク質は、接着受容体として働く3種類の膜貫通型タンパク質(インテグリン α 6、インテグリン β 4、BP180)と膜貫通型タンパク質を細胞骨格につなげる2種類のアンカータンパク質(プレクチン、BP230)の5種類のみである。これら5種類のヘミデスモソーム構成タンパク質は、いずれも上皮と基底膜の接着に重要な役割を果たしている。また、ヘミデスモソーム構成タンパク質は自己免疫性および遺伝性の表皮水疱症の原因分子としても知られている。しかし、50種類近いタンパク質が関与しているといわれるアクチン系の接着装置フォーカラルアドヒージョンに比べると、既知の主要構成タンパク質数が5種類とはいかにも少ない。いまだ未知のヘミデスモソーム構成タンパク質が多く存在する可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

このような背景の下、私はヒト培養細胞からのヘミデスモソーム単離法の確立し、さらに調製した画分中のポリペプチド鎖を質量分析法で解析する事で、ヘミデスモソームの新規構成タンパク質を発見することを目的に研究をおこなった。

3. 研究の方法

ヘミデスモソーム豊富(HD-rich)画分の単離法

ヒト扁平上皮癌由来の培養細胞株であるDJM-1細胞はEagle's medium(含0.4 μ g/ml hydrocortisone, 20 ng/ml epidermal growth factor, 40 mM glutamine, 2.5% NaHCO₃ および10% fetal bovine serum)、不死化したヒト角化細胞由来の培養細胞株であるHaCaT細胞はDMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium(含40 mM glutamine, 2.5% NaHCO₃ および10% fetal bovine serum)を用いて37°C, 5% CO₂で培養した。

長期培養ではコンフルエントになるまでEagle's mediumまたはDMEMで培養し、その後2週間はインビトロジェン社のカルシウム不含角化細胞用培養液(KGM)を用いて培養をおこなった。

また、HD-rich画分を得るためのカルシウム濃度の検討においては、培養液(B)および培養液(B)にCaCl₂を最終濃度がそれぞれ0.1 mM、0.5 mM、1 mMになるように添加した培養液を用いて培養をおこなった。

培養後の細胞をPBSで3回洗い、33 mM ア

ンモニア水(pH 11.0)で5分間処理した。細胞が完全に剥がれたことを確認した後、DDWで3回すすぎ、さらにPBSで3回洗った。その後、0.1% Triton X-100(in PBS)で5分間処理してHD以外のTx-100可溶性の膜タンパク質を除き、PBSで3回洗った。SDS-PAGEにはこの培養皿上に残ったヘミデスモソームを2%のSDSを含む少量の緩衝液に溶かしたものをを用いた。

SDS-PAGEで分離した各ポリペプチド鎖をin-gel digestionし、質量分析計にて解析した。質量分析にはESI-イオントラップ型質量分析装置MAGIC-LCQ(TermoQuest)を使用した。測定されたペプチド断片群の質量をもとに、Mascot(<http://www.matrixscience.com/>)を用いてNCBI nrとSWISS-PROTデータベースを検索した。

4. 研究成果

培養表皮角化細胞からHD-rich画分を得るために最も適した条件はヒト角化表皮培養細胞株であるDJM-1をまず通常の血清含有培地で培養し、培養皿底面を完全に覆う状態になってから、インビトロジェン社から購入した無血清角化細胞用培地KGM中で約10日間培養する。この際、カルシウムは添加しない。このような条件下で培養した細胞の形成するヘミデスモソームの形態を透過型電子顕微鏡を使って観察したところ、通常培養条件下では認められないプラーク構造が観察され、質的にも成熟したヘミデスモソームが形成されていることが明らかとなった。HaCaT細胞を同様の条件で培養しても、HD成分を多く含む画分は得られなかった。この結果によって、初めてヒト培養細胞からHD構成タンパク質を豊富に含む画分を得る方法が確立された。また、確立した条件下で培養したDJM-1細胞のマトリックスにはプロセッシングを受けていないラミニン332の α 3鎖と γ 2鎖がメジャーな成分として含まれていた。プロセッシングを受けていない α 3鎖と γ 2鎖はラミニン332の蓄積と関係することが知られている。私はプロセッシングが抑制されたためにラミニン332が蓄積し、その結果ヘミデスモソームが濃縮したのではないかと考えた。

そこで、次に、ラミニン332のプロセッシング抑制とHD蓄積のメカニズムについて調べた。まず、表皮細胞においてラミニン332のプロセッシング酵素として知られているBMP-1に注目して実験をおこなった。その結果、(1)BMP-1がカルシウム依存的に細胞外への分泌量が上昇すること、(2)BMP-1はカルシウム存在下においてのみ、活性型となっていることが明らかとなった。さらにNon-processed formのラミニン332を含

むマトリックス上に、ラット表皮由来のFRSK細胞をplatingし、3時間経過した時点でのHD形成を観察したところ、Processed formのラミニン332を含むマトリックス上にplatingしたFRSK細胞に比べてより早くHD形成が起きることがわかった。以上の実験結果から、カルシウム不含KGM下では、Ca²⁺依存性のBMP-1のプロテアーゼ活性が抑えられると同時に、分泌量も著しく低下する事で、non-processed formのLm332が蓄積されたのではないかと考えられた。また、Non-processed formのラミニン332はProcessed formに比べてより高いHD形成促進能をもつことが示唆された。

さらに、DJM-1細胞から得られたHD-rich画分中のポリペプチドを一次元SDS-PAGEによって分離し、各バンドに含まれるポリペプチドを質量分析による解析した。その結果、既知のヘミデスマソーム構成成分とラミニン332以外にも、マイナー成分ながら、数種類のタンパク質が含まれる事が明らかとなった。これらタンパク質について解析を進めたところ、膜貫通型タンパク質であるlutheranと細胞外マトリックスタンパク質Tinalがケラチノサイトの細胞・基質間接着に関わる分子として同定された。Lutheranはラミニン511の接着受容体として知られている。ラミニン511は、ヘミデスマソームのリガンドであるラミニン332とは異なり、インターヘミデスマソームの接着に関わると考えられている。このことから、HD-rich画分にはヘミデスマソーム以外に、ラミニン511とlutheranを含む接着タンパク質複合体が含まれている可能性が考えられる。Tinalは、これまで上皮基底膜への局在は報告されていなかった。私たちの研究によって、Tinalは重層上皮だけでなく消化管単層上皮の基底膜にも局在している事がわかった。さらにケラチノサイトではTinalはIV型コラーゲンと相互作用している事、接着実験の結果から、Tinalがケラチノサイトの細胞・基質間接着を直接的に仲介し得ることが明らかとなった。臨床研究においても、皮膚科医との共同研究の結果、これまで検出が難しかった自己免疫性皮膚疾患の自己抗原の同定が、HD-rich画分を用いる事で容易になる事が確かめられた。

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4件)

① Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H. Plectin deficiency

leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex.

Hum Mutat. 査読有 31(10), 2010, 1687-98.

② Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. Hum Mutat. 査読有 31(3), 2010, 308-16.

③ Iwata H, Kamio N, Aoyama Y, Yamamoto Y, Hirako Y, Owaribe K, Kitajima Y. IgG from patients with bullous pemphigoid depletes cultured keratinocytes of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen) and weakens cell attachment. J Invest Dermatol. 査読有 129(4), 2009, 919-26

④ 平子善章, 尾張部克志. 細胞接着と細胞骨格 生化学 査読有 80(3), 2008, 184-93.

[学会発表] (計9件)

① 松下知嗣、尾張部克志、平子善章 A monoclonal antibody and Linear IgA bullous dermatosis autoantibodies preferentially recognize epitopes within the NC16A domain of BP180 第35回日本研究皮膚科学会大会、2010、和歌山

② 平子善章 Cell to matrix adhesion structures in stratified and simple epithelia 第34回日本研究皮膚科学会大会、2009、博多

③ 米元裕貴、桂朋矢、尾張部克志、平子善章 Analyses of hemidesmosome-rich fraction prepared from a human squamous cell carcinoma line 第61回日本細胞生物学会大会、2009、名古屋

④ 米元裕貴、尾張部克志、平子善章 Preparation of the hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma line 第60回日本細胞生物学会大会、2008、横浜

[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

平子 善章 (HIRAKO YOSHIAKI)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：50377909

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし