

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791247

研究課題名（和文）転写因子のスプライシングによる表皮細胞の分化・増殖の調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of keratinocyte differentiation and proliferation by splicing of transcription factor.

研究代表者

中島 康爾（NAKAJIMA KOJI）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）大学院医学研究科・助教

研究者番号：70374832

研究成果の概要（和文）：Skn-1 は POU ドメイン蛋白に属し表皮細胞特的に発現される転写因子であり、表皮細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしていることが示唆されている。転写因子は細胞質で翻訳されるが働く場は核であるため、その核移行のメカニズムの解析は重要である。近年、組織や細胞特異的に転写因子の核移行がコントロールされている報告も多い。しかし、Skn-1 表皮細胞での核移行を詳細に研究した報告はない。本研究の目的は表皮の分化、増殖に重要な転写因子の Skn-1 の表皮での役割や機能を明らかにするために、Skn-1 の核移行のメカニズムや調節の解析に焦点をあてる。その結果、Skn-1 の核移行シグナルが表皮細胞の分化や増殖に関連することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Skn-1, a member of the POU domain protein family, appears to be expressed predominantly in epidermal keratinocytes and is thought to play a critical role in keratinocyte differentiation and proliferation. Since Transcription factors are translated in the cytoplasm and transferred to the nucleus, study of nuclear transfer mechanism of their transcription factors is important. Recently, some studies reported that nuclear transfer of transcription factor is regulated in tissue or cell specific manners. However, nuclear transfer of transcription factor Skn-1 has not elucidated yet. In this study, we examined the mechanisms involved in the nuclear localization of Skn-1 to clarify involvement of Skn-1 nuclear transfer in keratinocyte differentiation and proliferation. The results showed that Skn-1 nuclear transfer may be related with keratinocyte differentiation and proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮細胞、転写因子、分化、角化、増殖

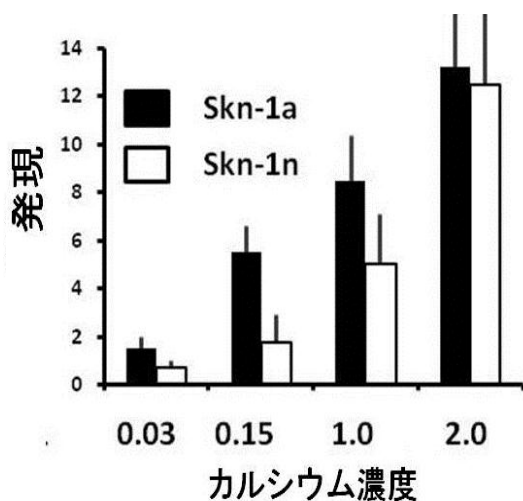
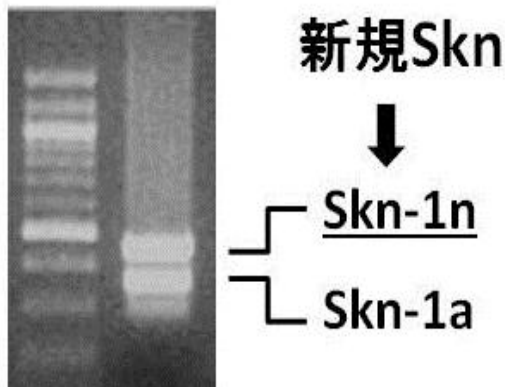
1. 研究開始当初の背景

表皮細胞の分化と増殖は表皮に発現される遺伝子あるいは蛋白によって営まれているが、その発現を厳重に調整しているのが、転写因子である。現在までに AP-1、NF-κB、

POU など表皮細胞において重要な転写因子であることがわかってきている。その中で POU 転写因子は特に細胞の分化に強く関連する転写因子として知られ、表皮には OCT-1、OCT-6、Skn-1 が発現するが、表皮に選択的に

発現しているのは Skn-1 のみである。

申請者らは、Skn-1 に 2 つ isoform (Skn-1a と Skn-1n) が表皮細胞に発現していることを見出した (Nakajima K et al : Identification of Skn-1n, a splice variant that is induced by high calcium concentration and specifically expressed in normal human keratinocytes. J Invest Dermatol 2008; 128(5) : 1336-1339)、またその二つの isoform は表皮細胞の分化の過程で異なって発現されること (下図) を見出している (Takimoto et al. JDS 2010)。



転写因子は細胞質で翻訳されるが働く場は核であるため、そのメカニズムの解析は重要である。近年、組織や細胞特異的に転写因子

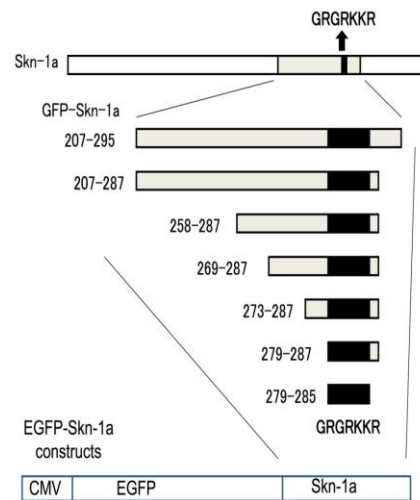
の核移行がコントロールされている報告も多い。しかし、Skn-1 表皮細胞での核移行を詳細に研究した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的はでは表皮の分化、増殖に重要な転写因子の Skn-1 の表皮での役割や機能を明らかにするために、Skn-1 の核移行のメカニズムや調節の解析に焦点をあてる。

3. 研究の方法

Skn-1 の蛋白のコンピュータープログラムの解析から核移行部位の同定を試みる。次にその領域を発現する種々のコンストラクトを作成し、培養表皮細胞への核移行を測定する。なお、コンストラクトは GFP との融合蛋白として、その蛍光から核移行を判定する。作成したコンストラクトを以下に示す。



また、核移行部位やその周囲にいろいろな変異を導入してその核移行も観察する。さらに、表皮細胞を分化させたときの核移行の状態についても観察する。

4. 研究成果

コンピュータープログラムを用いた本蛋白の核移行シグナルの検索では、275-285 に存在する GRKRKKR が核移行シグナルであるこ

とが強く示唆された。また、その核移行シグナルを含む GFP 融合リコンビナント蛋白では、コンストラクト pEGFP-Skn-1a258-287、269-287、273-287、279-287、and 279-285 はほとんど同じ核移行を示し、コンストラクト pEGFP-Skn-1a 207-295 と 207-287 は比較的低い核移行性を示した。コントロールプラスミドである。pEGFP は核移行性がなかった。つぎに、3 個の変異蛋白を作成した。コンストラクト EGFP-Skn-1a207-287m1 では 286 のスレオニンをアラニンに変え、コンストラクト EGFP-Skn1a207-287m2 では 287 のセリンをアラニンに変えた。さらに、コンストラクト EGFP-Skn-1a207-287m3 では、286 のスレオニンをアラニンに、287 のセリンをアラニンに変換した。その結果、コンストラクト EGFP-Skn-1a207-287m1 と EGFP-Skn-1a 207-287m2 の核移行性はコンストラクト EGFP-Skn-1a 207-287 と同様であったが、コンストラクト、EGFP-Skn-1a 207-287m3 は逆により高い核移行を示した。さらに、この変異コンストラクトを用いて、PMA で角化誘導した培養表皮細胞で核移行を検討したところ、コンストラクト EGFP-Skn-1a 207-287、EGFP-Skn-1a 207287m1、and EGFP-Skn-1a 207-287m2 は PMA 処理によって核移行性が増強された。しかしながら、コンストラクト EGFP-Skn-1a 207-287m3 では PMA の濃度には依存していなかった。以上の結果は、核移行によって表皮細胞の角化や分化が調整されている可能性を示し、実験当初想定された仮説を指示する結果であった。

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 5 件)

- (1) Korekawa A, Kaneko T, Hagiwara C, Nakajima K, Takayuki A, Nakano H, Sawamura D: Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia in infancy. 査読有. *J Dermatol.* 2012;39(12):1052-1054. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01578.x
- (2) Korekawa A, Nakano H, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, Sawamura D: Buschke-Ollendorff syndrome associated with hypertrophic scar formation: a possible role for LEMD3 mutation. 査読有. *Br J Dermatol.* 2012; 166(4): 900-903. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10691.x.
- (3) Korekawa A, Nakajima K, Nishikawa Y, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D: Late-onset, eruptive syringoma in an elderly man: correlation with carbamazepine. 査読有. *Acta Derm Venereol.* 2012; 92(1): 87-88. doi: 10.2340/00015555-1156.
- (4) Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Kimura K, Takiyoshi N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, Tsuchida S, Sawamura D: Raf kinase inhibitor protein expression correlates with differentiation but not with ERK phosphorylation in cutaneous squamous cell carcinoma. 査読有. *J Dermatol Sci.* 2011;60(3):199-201. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.10.005.

- (5) Takeda H, Nakajima K, Kaneko T, Harada K, Matsuzaki Y, Sawamura D: Follicular mucinosis associated with radiation therapy. 査読有. J Dermatol. 2011; 38(11): 1116-1118. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01187.x

[学会発表] (計 5 件)

- ① 中島康爾、赤坂英二郎、六戸亜希子、六戸大樹、皆川智子、会津隆幸、中野 創、澤村大輔：骨膜性軟骨腫との鑑別を要した爪下外骨腫の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 359 回例会, 2012. 9. 2. 青森市
- ② 中島康爾、福井智久、西川陽平、金子高英、松崎康司、中野 創、澤村大輔、小原理：高 Ca 血症を合併したアポクリン腺癌の多発骨転移の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 358 回例会、2012. 4. 8. 弘前市
- ③ 中島康爾、福井智久、西川陽平、金子高英、中野 創、澤村大輔、中野あおい：爪甲色素線条を呈した爪部 Bowen 病の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 356 回例会、2011. 11. 27. 弘前市
- ④ 中島康爾、金子高英、福井智久、西川陽平、中野 創、澤村大輔、竹本啓伸：膝窩郭清を施行した悪性黒色腫の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 355 回例会, 2011. 9. 4. 八戸市
- ⑤ 中島康爾、六戸亜希子、赤坂英二郎、金子高英、中野 創、澤村大輔、原田 研：足穿孔症の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 354 回例会, 2011. 6. 5. 弘前市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 康爾 (NAKAJIMA KOJI)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)

・助教

研究者番号：70374832

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：