

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25日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659514
 研究課題名（和文） Coiled-coil ドメイン阻害に伴う 17 型コラーゲン切断亢進メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Pathomechanism for increased ectodomain shedding of collagen XVII by targeting coiled-coils
 研究代表者
 西江 渉 (NISHIE WATARU)
 北海道大学・北海道大学病院・講師
 研究者番号：20443955

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid, BP）の自己抗原である 17 型コラーゲン（COL17）の最も主要な抗原領域である NC16A ドメイン内に存在する Coiled-coil の生理機能を解明することである。本研究により、Coiled-coil は、正しく 3 量体として COL17 を構築する上で不可欠な領域であり、3 量体の形成がうまくいかなかった場合、プロテアーゼによって速やかにタンパクが分解される認識部位となることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Collagen XVII (COL17) is the major autoantigen for bullous pemphigoid. Juxtamembranous NC16A domain of COL17 contains major epitopes, in which potential coiled-coil exists. The aim of this study is to address the pathomechanism of the coiled-coils. The experiments disclosed that coiled-coils are essential motives for COL17 to form triple-helical structure; in addition the motif can be targeted by proteases when miss-folded COL17 are produced. Thus, the domain has a novel vital role for quality checking of folded COL17.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

Coiled-coil は、タンパク質同士の結合に重要な、7 アミノ酸ごとの繰り返し配列である。特定の部位の疎水性アミノ酸、特に“d”部位のロイシンが、ジッパー機能として中心的な働きを担う。最近、研究者らは、自己免疫性水疱症である“水疱性類天疱瘡”の自己抗原である、17 型コラーゲン（COL17）の coiled-coil に構造障害が生じると、COL17 の細胞外領域の切断が著明に亢進することを発見した。これまで coiled-coil ドメインが、タンパク質の分解などプロセッシングに

関与する報告はないため、coiled-coil ドメインタンパクの新たな生理機能の存在が予想された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、coiled-coil ドメインが COL17 の細胞外領域切断をどのような機序で制御しているか解明することが目的である。COL17 は水疱性類天疱瘡の自己抗原であり、近年、COL17 の切断と水疱性類天疱瘡発症との関連が明らかになってきているため、coiled-coil ドメインが関与する COL17 の細

胞外領域切断と、水疱性類天疱瘡の病態との関連も解明を目指す。従って本研究は、coiled-coil がタンパク質のプロセッシングに関わる新しい生理機能の解明につながるものである。

3. 研究の方法

本研究では、COL17のcoiled-coilドメインのアミノ酸配列の一部へ変異を導入し、coiled-coilドメイン形成を阻害させたヒトCOL17タンパクをHEK293細胞で発現させ、細胞外領域切断亢進メカニズムを解明する(図1、2)。更に、Coiled-coil導入によって生じる切断部を同定し、同定された切断部を特異的に認識する切断部位特異抗体を作製し、水疱性類天疱瘡病変部皮膚において、coiled-coil阻害に伴うCOL17切断亢進の有無を確認する。

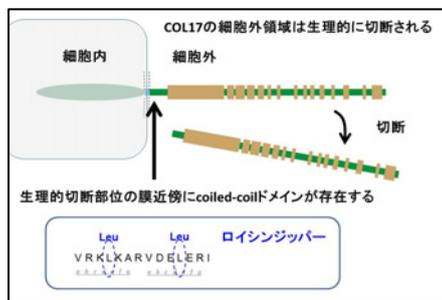


図1 COL17のCoiled-coilドメイン

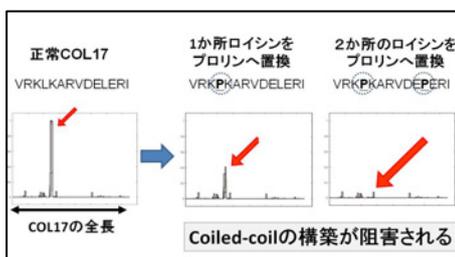


図2 Coiled-coilへ導入した変異体

4. 研究成果

(1) Coiled-coil機能障害によるCOL17切断亢進機序の解明

Coiled-coil領域に存在するジッパー部位のロイシンを1か所プロリンへ置換したコンストラクト1 (L⁴⁹⁵ to P) と、2ヶ所をプロリンへ置換したコンストラクト2 (L^{495/502} to P) の2種を安定発現するHEK293細胞をFlp-Inシステムで作成した。変異を導入したCOL17タンパクでは、細胞外領域の切断が亢進するが、これら切断は、生理的な切断酵素であるADAMの阻害剤(Marimastat)では抑制されなかった。一方、セリンプロテアーゼ(Inhibitor cocktail, Pefabloc)では切断亢進が阻害され、特にFurin阻害剤

(Dec-RVCR-CMK)では抑制効果が著明であった(図3)。一方、細胞膜を通過できないFurin阻害剤(α 1-PDX)では抑制効果を認めなかったため、COL17切断亢進は細胞内で生じている可能性が示唆された(図3)。そのため、ERからゴルジを経たタンパク輸送過程での検討を行った結果、Brefeldin A投与により切断亢進が抑制されたため、Coiled-coil阻害に伴うCOL17細胞外領域切断の亢進は、ゴルジでFurinにより生じることが示唆された(図4)。

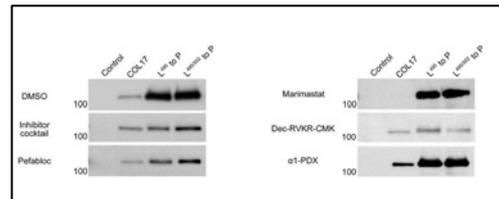


図3 各種プロテアーゼを用いた検討

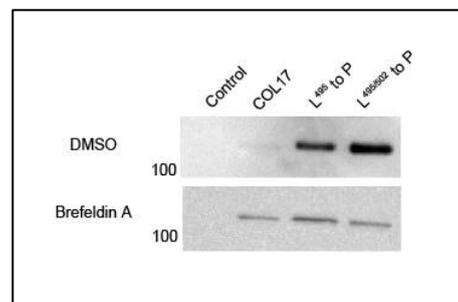


図4 Brefeldin Aによる切断の阻害

(2) Coiled-coil機能障害により亢進したCOL17の切断部位の同定

120kDの切断断片を切り出し、マスマクトロメトリーで解析したところ、生理的切断部位とは異なる、NC16A領域内の508番目セリン(Ser⁵⁰⁸)のアミノ末端で切断されることが判明した。同部位は、Furin認識部位に一致しており、上記(1)で確認された結果と一致するものであった。

(3) Coiled-coil機能障害により生じるCOL17の切断部位認識抗体の作製

Ser⁵⁰⁸から8アミノ酸のペプチドを合成し、2匹の野兎へ免疫した。抗原ペプチドカップリングカラムによってアフィニティー精製した切断部特異抗体は、15例中4例の水疱性類天疱瘡患者病変部表皮真皮間境界部に線状に沈着することを確認した。従って、水疱性類天疱瘡患者病変部では、COL17の高次構造に変化が生じ、生理的な切断部とは異なり、Furin認識部位で切断されている可能性が示唆された。

以上の結果から、Coiled-coilは、COL17

が正しく3量体として構築する上で不可欠な領域であり、3量体の形成がうまくいかなかった場合、Furin 認識部位においてプロテアーゼにより速やかに切断されることが明らかになった。従来、COL17のNC16A領域内にFurin 認識部位が存在することは解っていたが、生理的な切断部として認識されないため、その生理的役割は不明であった。本研究により、Furin 認識領域はCOL17タンパクが構築される際、正しくフォールディングされたか品質管理される際に重要なドメインであることが判明した。更に、数例の水疱性類天疱瘡患者皮膚でもFurin 認識部位でCOL17が切断を受けていることが明らかになったことから、水疱性類天疱瘡患者皮膚においてCOL17タンパクの立体構造の障害が生じている可能性が示唆された。

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8件)

1. Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, Shimizu H: Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen. Br J Dermatol 166:1116-1120, 2012、査読あり
2. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Ujiie H, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H: Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapsone. Eur J Dermatol 22:282-283, 2012、査読あり
3. Nakazato S, Fujita Y, Hamade Y, Nemoto-Hasebe I, Sugita J, Nishie W, Shimizu H: Wells' Syndrome Associated with Chronic Myeloid Leukaemia. Acta Derm Venereol, 2012、査読あり
4. Natsuga K, Nishie W, et. Al: Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. J Immunol 188:5792-5799, 2012、査読あり

5. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H: Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. Br J Dermatol 166:903-905, 2012、査読あり
6. Nishie W, Jackow J, Hofmann SC, Franzke CW, Bruckner-Tuderman L: Coiled coils ensure the physiological ectodomain shedding of collagen XVII. J Biol Chem 287:29940-29948, 2012、査読あり
7. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto-Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H: Circumscribed palmar hypokeratosis: correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. Br J Dermatol 167:221-222, 2012、査読あり
8. Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H: The beta9 loop domain of PA-PLA1alpha has a crucial role in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. J Invest Dermatol 132:2093-2095, 2012、査読あり

[学会発表] (計6件)

1. Nishie W, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Role of collagen XVII in migrating keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, LOISIR HOTEL NAHA, Okinawa, December 07, 2012 to December 09, 2012.
2. Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Shinkuma S, Tanabe M, Nakamura H, Shimizu H: Monoclonal human IgG1 and IgG4 against COL17 induce skin fragility in neonatal COL17-humanized mice in a complement-independent manner. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, LOISIR HOTEL NAHA, Okinawa, December 07, 2012 to December 09, 2012.
3. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H:

Antibodies to epitopes on collagen XVII (COL17) induce skin fragility in COL17-humanized mice in a complement-dependent and -independent way.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, LOISIR HOTEL NAHA, Okinawa, December 07, 2012 to December 09, 2012.

4. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto-Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H: Circumscribed palmar hypokeratosis: correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. The 3rd World Congress of Dermoscopy, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Australia, May 17 to 19, 2012
5. Moriuchi R, Nishie W, Shinkuma S, Fujita Y, Shimizu H: Characteristic dermoscopic features of pseudoxanthoma elasticum: dots in the yellow net. The 3rd World Congress of Dermoscopy, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Australia, May 17 to 19, 2012.
6. Nishie W, Ujiie H, Shinkuma S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Neopeptides on the modified amino-terminus of the shed ectodomain of collagen XVII
The 43rd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Venice Lido Congress Centre, Italy, September 19, 2012 to September 22, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：20443955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし