

令和 2 年 3 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10139

研究課題名(和文)ヘアケラチンK85の機能解析 なぜK85の遺伝子変異は貧毛症を引き起こすのか

研究課題名(英文)Analysis of the functional characteristics of human hair keratin K85

研究代表者

安藤 祥司 (ANDO, Shoji)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：20193104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘアケラチンK85および貧毛症関連変異をもつK85変異体をそれぞれK35と共に培養細胞に発現させ、中間径フィラメント(IF)形成特性とK85の変異の影響を解析した。その結果、SW-13細胞内では、野生型K85はK35と重合して、通常のIFよりも短いフィラメントの束を細胞核近傍の細胞質に形成した。貧毛症変異のうち、テイルドメインに変異をもつK85変異体はK35と重合したがフィラメントを形成できず、凝集体のみを生じた。しかしヘッドドメインに変異をもつK85変異体では変異の影響は見られず、野生型と同様のフィラメントを形成した。これらの知見は毛の形成機構と貧毛症の発症機序の解明に役立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、毛皮質細胞の分化段階で最初に発現されるヘアケラチンK85とK35は、サイトケラチンとは異なる機能をもつことが初めて明確に示された。つまりK85-K35のペアは、細胞質全体に広がる長い中間径フィラメント(IF)を形成するのではなく、短いIFの束を形成するという特性をもつ。この特性は、毛髪的主要構造であるマクロフィブリルの初期形成において重要な意義があると考えられる。さらに貧毛症を起こす2種類の変異のうち、少なくともテイルドメインの変異についてはK85のフィラメント形成能を阻害することで貧毛症を発症させることが明らかになった。これらの成果は、今後の毛髪研究の進展に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Human type I hair keratin 35(K35) and type II hair keratin 85(K85) are the first pair expressed in the early differentiation of hair-forming cells. Two kinds of mutations in the K85 gene have been identified in the families with pure hair and nail ectodermal dysplasia. To study the filament forming abilities of the translated products of the K85 genes with or without the disease-causative mutations, the K85 genes were transiently co-expressed with the K35 gene in human cultured cells. The structures and localization of the filaments produced by the hair keratin pairs varied depending on the types of endogenous intermediate filaments in the cells, location of the mutations in the K85 gene, and elapsed time after transfection. These results provide insights into the molecular mechanisms of hair formation and hair diseases.

研究分野：生物化学、蛋白質工学

キーワード：ヘアケラチン 中間径フィラメント 毛髪形成 外胚葉性形成不全症 貧毛症 マクロフィブリル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケラチンは中間径フィラメント (IF) 蛋白質に属し、サイトケラチン (上皮細胞の細胞質に長い IF のネットワークを形成する) とヘアケラチン (毛や爪など角化組織を形成する) に分類される。毛の大部分を占める毛皮質の細胞内には、ヘアケラチンの IF が多数集合して束になったマクロフィブリル (MF) が存在し、細胞質を満たしている。マクロフィブリルにはケラチン結合蛋白質 (KAPs) も存在し、IF 間のスペースを埋めている。マクロフィブリルは毛の形状 (直毛・縮毛) や強度と密接に関連すると考えられているが、その形成機構を含め、依然として不明点が多い。近年、ヒトのヘアケラチンの遺伝子解析が行われ、毛根の毛皮質では 9 種類のタイプ I と、4 種類のタイプ II が発現する (Schweizer *et al.*, *Exp Cell Res*, 313, 2010-2020, 2007 など)。しかし、1 本の毛に多種類のヘアケラチンが発現する意義は不明である。また、毛母細胞から毛皮質細胞へと分化し、角化するまでに発現するタイプ I と II の種類が順次変化する。一方、毛の疾患では、これまでにタイプ I のみに遺伝子変異が確認されている。具体的には、毛が生えず、爪の形成異常を示す外胚葉性形成不全症 (pure hair and nail ectodermal dysplasia, PHNED) では、毛皮質細胞の分化段階で最初に発現される K85 に遺伝子変異がある (Naeem *et al.*, *J Med Genet*, 43, 274-279, 2006; Shimomura *et al.*, *J Invest Dermatol*, 130, 892-895, 2010)。また、連珠毛 (毛の太さが不均一で切れやすい) では K86、K83、K81 に遺伝子変異が報告されている (Korge *et al.*, *J Invest Dermatol*, 113, 607-612, 1999; van Steensel *et al.*, *J Med Genet*, 42, e19, 2005 など)。

最近、我々は、ヒトのヘアケラチンのタイプ I : 3 種類 (K35、K36、K38) とタイプ II : 2 種類 (K81、K85) の組換え蛋白質を調製し、その機能を試験管内で解析した (Honda *et al.*, *Cell Struct Funct*, 39, 31-43, 2014)。その結果、共重合させるタイプ I と II の組合せを変えて IF 形成能を解析したところ、K85 はタイプ I と共重合して短い IF を形成後、ケラチン結合蛋白質 (KAPs) など他の因子がなくても、IF の方向をそろえて緊密な束を形成することを見出した。特に毛皮質細胞の分化段階の初期に発現される K85-K35 のペアは、その傾向が顕著であった。こうした K85-K35 のペアのフィラメント形成特性は、マクロフィブリルの初期形成に重要である可能性がある。また、PHNED に見られる K85 の遺伝子変異は IF あるいはマクロフィブリルの形成に何らかの悪影響を及ぼしている可能性があるが未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、マクロフィブリルの初期形成とその後の発達に大きな影響を与える可能性が高い K85 に注目し、ヒト培養細胞を用いて K85 が本質的に IF を束化することを明らかにする。そのためには、K85 と K35 を培養細胞内で発現させ、“IF の束”を形成するか、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて解析する。次に、PHNED でみられる 2 種類の K85 変異体と K35 を培養細胞に発現させ、それぞれの変異が K85 の機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることで、PHNED の発症機序の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) K85-K35 を発現する培養細胞の作製

ヒトのヘアケラチン K35 と K85、PHNED で報告された K85 の変異体 2 種類、合わせて 4 個の遺伝子を人工合成した (外注)。次に、K85 (野生型または変異体) 遺伝子を緑色蛍光蛋白質 AcGFP1 と、K35 遺伝子を赤色蛍光蛋白質 DsRed-monomer と融合させて発現するプラスミドを作製した。これらのプラスミドをリポフェクション法でヒト培養細胞に導入し、K85 (野生型または変異体) と K35 のペアを一過性に発現する細胞を作製した。対照として、マウスのサイトケラチンである K8 を AcGFP1 と、K18 を DsRed-monomer と融合させて発現するプラスミドも作製し、培養細胞に導入した。ヒト培養細胞としては、SW-13 細胞と MCF-7 細胞を用いた。その理由は、MCF-7 細胞は内在する IF として K8、K18、K19 のみを発現し、SW-13 細胞については IF を全く発現しないか、あるいはビメンチンのみを発現するからである。今回は、ビメンチンのみを発現する SW-13 細胞を事前にクローニングして解析に用いた。

(2) 培養細胞におけるヘアケラチンの重合産物の形態と局在解析

培養細胞に上記プラスミドを導入後、1 日目、2 日目、4 日目に固定化と標本作製を行い、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて、K85-K35 ペアあるいは K8-K18 ペアの重合産物の形態と細胞内局在を解析した。培養細胞に内在するビメンチン IF あるいはサイトケラチン IF については免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

(1) 内在性の IF としてビメンチンのみをもつ SW-13 細胞では、野生型の K85 は K35 と重合して、通常の IF よりも短くて太いフィラメントを細胞核近傍の細胞質に形成した。その太さは、ビメンチン IF や後述するサイトケラチン IF に比べて明らかにサイズが大きいことから、“短い IF の束”であると考えられた。そのフィラメントは、遺伝子導入後の時間経過に伴って次第に長さが伸長し、絡まっているような観察像も得られた。この結果は、対照のサイトケラチン K8 と K18 が重合して、細胞質全体に広がる長い IF のネットワークを形成したことは明らかに異なっていた。なお、K85-K35 ペアおよび K8-K18 がつくるフィラメントの局在は、内在するビメ

ンチン IF とは一致しなかった。PHNED 変異のうち、K85 のヘッドドメインに変異をもつ変異体を K35 とともに発現したところ、変異の影響は観察されず、野生型と同様のフィラメントを形成した。しかし、テイルドメインに変異をもつ K85 変異体では、K35 と重合はするがフィラメントを形成できず、凝集体のみを細胞質に生じた。なお、各ヘアケラチン遺伝子を単独に発現した場合は、いずれもフィラメントを形成しなかった。

(2) 一方、内在性 IF としてサイトケラチンを持つヒト MCF-7 細胞では、野生型の K85、ヘッドドメイン変異型 K85、テイルドメイン変異型 K85 はいずれも、K35 とともに内在するサイトケラチンの IF に取り込まれ、細胞質全体に広がる IF を形成した。また、各ヘアケラチン遺伝子を単独で MCF-7 細胞に導入した場合も、内在するサイトケラチンの IF に取り込まれた。同様の結果は、サイトケラチンを内在する HaCaT 細胞でも観察され、細胞質全体に広がる IF を形成した。これらの結果は、ヘアケラチン K85 と K35 がサイトケラチンと共重合して IF を形成できることを示した。また、この結果は、PHNED が劣性遺伝の疾患であることにも関連していると考えられた。

(3) 今回の解析から、毛皮質細胞で最初に発現されるヘアケラチンの K85 と K35 のペアは、サイトケラチンのように細胞質全体に広がる IF のネットワークを形成するのではなく、“短い IF の束”を細胞核の近傍に形成するという特性があることが示された。この結果は、既に我々が野生型の K85 と K35 の組換え蛋白質を試験管内で重合させたときに、(他の補助因子が無い状態で)“短い IF の束”を形成したことに一致する。ヘアケラチンは毛皮質細胞内で IF の束であるマクロフィブリル (MF) を形成するが、今回見出された K85-K35 ペアの特性はマクロフィブリルの形成上、特にその初期形成において重要な意義をもつことが考えられる。テイルドメイン変異型の K85 と K35 のペアが SW-13 細胞でフィラメントを形成せず、凝集体のみを生じたことは、テイルドメイン変異型 K85 がフィラメント形成能を消失し、そのことが PHNED の発症原因であることを示唆している。一方、ヘッドドメイン変異型の K85 はテイルドメイン変異型よりも臨床的に重篤な PHNED を示すが、今回の解析では野生型と同じようなフィラメントを形成した。このためヘッドドメイン変異型が重篤な症状を引き起こす理由は、現時点では不明である。K85 のヘッドドメイン変異は、ヘアケラチンとともにマクロフィブリルの形成に働くケラチン結合蛋白質 (KAP) との相互作用に支障をきたしている可能性もあり、その解析を今後行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

坂本 泰子、山本 雅貴、本田 裕子、小池 謙造、松元 俊彦、安藤 祥司：培養細胞に一過性発現されたヒトヘアケラチン K85 と K35 の中間径フィラメント形成：第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年

坂本 泰子、山本 雅貴、本田 裕子、小池 謙造、松元 俊彦、安藤 祥司：外胚葉形成不全症に関わるヒトヘアケラチン K85 と K35 の培養細胞における中間径フィラメント形成特性：2018 年度日本農芸化学会西日本支部大会、2018 年

山本 雅貴、坂本 泰子、本田 裕子、小池 謙造、松元 俊彦、安藤 祥司：ヒトヘアケラチン K85 と K35 の培養細胞における中間径フィラメント形成特性：第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、2019 年

山本 雅貴、坂本 泰子、本田 裕子、小池 謙造、松元 俊彦、安藤 祥司：培養細胞で発現されたヒトヘアケラチン K85 と K35 のペアによるフィラメント形成：第 56 回化学関連支部合同九州大会、2019 年

山本 雅貴、坂本 泰子、本田 裕子、小池 謙造、松元 俊彦、安藤 祥司：ヒトヘアケラチン K85 の遺伝子導入細胞における機能特性と外胚葉形成不全症の原因となる変異の影響：第 57 回日本生物物理学会年会、2019 年

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：本田 裕子

ローマ字氏名：HONDA, Yuko

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：教務員

研究者番号(8桁): 60295053

(2)連携研究者

連携研究者氏名：村田 祐造

ローマ字氏名：MURATA, Yuzo

連携研究氏名：進 正志

ローマ字氏名：SHIN, Masashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。