

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790795

研究課題名（和文）

エピプラキン分子サイズと結合分子の同定

研究課題名（英文）

The Molecular Size of Epiplakin and the Identification of its Binding Molecules

研究代表者 竹尾 直子(TAKEO NAOKO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30423695

研究成果の概要：エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された表皮細胞内分子である。免疫電子顕微鏡による観察では、創傷治癒 4-6 日目にケラチン 6、10 の混合した太い線維の周囲にエピプラキンが見られたが、今回ケラチン 17 に対する抗体を得て、マウス表皮細胞で、エピプラキン抗体との二重染色を行なったところ、殆どの染色性が一致した。また創傷治癒過程でのマウス表皮細胞においてもその染色性が殆ど一致した。したがってケラチン 17 もエピプラキンに結合することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,600,000	0	2,600,000
2007 年度	0	0	0
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

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：エピプラキン、自己抗原、自己免疫性水疱症、表皮細胞、中間径フィラメント

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト・エピプラキンは他のプラキン分子のカルボキシ末端に見られる B ドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたり 13 個存在する (J Biol Chem, 2001)。しかし、マウス・エピプラキンでは、B ドメインが、ポリペプチド

全体にわたり 16 個存在すると報告され (Spazierer, J Biol Chem 2003)、ヒトとマウスでは分子量がそれぞれ 552kDa、725kDa と大きく異なっている。彼らは、マウス・ゲノム中に非翻訳のエキソン 1 を見出しているが、蛋白質の翻訳領域はヒトと相同部位で

あるとしている。また以前から表皮のイムノブロットでは、低分子量のエピプラキンも検出されており (Fujiwara, J Dermatol 1992)、今回の予備実験でも HaCaT 細胞からはヒト表皮と同じサイズの、HeLa 細胞からは低分子量のエピプラキンが検出された。エピプラキンの翻訳エクソンは一つであるため (Takeo, J Invest Dermatol 2003)、これは異なるスプライシング産物とは考え難く、エピプラキンの限定分解によるものか、それともアミノ末端の翻訳領域が異なる亜型が存在するためかが考えられるが、その原因は不明である。

この研究ではヒトでの転写・翻訳開始点を明らかにするとともに、アミノ末端部、カルボキシ末端部に特異的な抗体を用いて、分子量の異なるエピプラキンとの反応性を検討する。

さらに、エピプラキン・ノックアウトマウスの実験から、創傷治癒過程の表皮でエピプラキンは、ケラチン 6 とともに発現が増強されることが知られている (Goto, Mol Cell Biol 2006)。したがって本研究では、ケラチン 6 以外にエピプラキンと結合する分子を探りたい。

## 2. 研究の目的

エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された表皮細胞内分子であり、その一次構造ならびに遺伝子構造は既に明らかになった。またノックアウトマウスや *in vitro* 相互作用の実験から、その機能の一部が明らかになった。

本研究では、まずヒトのエピプラキン分子サイズを抗体を用いて決定し直し、さらに表皮細胞内でこの分子と結合する分子を同定したい。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト・エピプラキンの翻訳開始点の決定

- 1) 複数の翻訳開始点候補の ATG からの cDNA 配列をに基づいて、ペプチドを作成した。
- 2) そのペプチドに対するポリクローナル抗体を作成し、精製した。
- 3) HeLa 細胞、HaCaT 細胞、ヒト表皮細胞、ヒト表皮抽出物の免疫ブロットを行ない、上記のポリクローナル抗体との反応性を検討した。

### (2) ヒト・エピプラキンのカルボキシ末端部の決定

- 1) カルボキシ末端部に対するペプチドを作成し、精製した。
- 2) そのペプチドに対するポリクローナル抗体を作成し、精製した。
- 3) (1) (3) と同様に、HeLa 細胞、HaCaT 細胞、ヒト表皮細胞、ヒト表皮抽出物の免疫ブロットを行ない、上記のポリクローナル抗体との反応性を検討した。

### (3) 抗ケラチン抗体、抗エピプラキン抗体作成

ケラチン 17 の特異配列部分の cDNA を RT-PCR で合成し、それを GST ベクターに組み込み、融合蛋白質を作成後、ラットに免疫しその血清を採取し抗体を得た。抗ヒトあるいはマウスエピプラキン抗体については、過去の報告 (Fujiwara 2001、Goto 2006) 通り、家兎に免疫して抗血清を得、その抗原で吸収溶出し、特異抗体を得た。

### (4) 共焦点レーザー顕微鏡

これも既報告通り、FITC 標識抗マウス、ラット IgG、Rhodamine 標識抗ウサギ IgG を用いて 2 重染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (5) HeLa 細胞培養

10%ウシ胎仔血清入り DMEM 培養液で培養した。

#### 4. 研究成果

本研究では、まずヒトのエピプラキン分子サイズを抗体を用いて決定し直すことを目標にあげた。その第一ステップとして、カルボキシ末端部に対するペプチドを 2 種類、アミノ末端部に対するペプチドを 2 種類作成した。これを抗原にして、ラットに免疫し抗体を作成し、HeLa 細胞抽出物の免疫ブロットを行なったが、反応しなかった。エピプラキン遺伝子を含む BAC クローンを 2 種得たが、いずれも十分な 5' 領域を含んでおらず、また有効な 5' RACE も行なえなかった。今後は別の BAC クローンを得て、EcoRI とともに、B+リンカードメインの規則配列部分を切り出し、マウスのそれとのサイズを比較する予定である。また HeLa 細胞をマトリゲル中で培養すると、10 個ほどの細胞が小塊を形成するが、エピプラキンはその小塊の外側を縁取るように発現することが明らかになった。HeLa 細胞をプラスチック上で培養した場合は、2-3 層に重層し、その基底層よりには、エピプラキンは発現せず、上層にのみ発現する傾向にあった。これは表皮でのエピプラキンの発現に酷似しており、空間的発現の違いが、細胞の空間的位置の違いにより制御されている可能性が示唆された。マウス・ケラチン 17 の特異配列断片をラットに免疫し、ケラチン 17 に対する抗体を得て、マウス表皮細胞で、エピプラキン抗体との二重染色を行なったところ、殆どの染色性が一致した。また創傷治癒過程でのマウス表皮細胞においてもその染色性が殆ど一致した。したがってケラチン 17 もエピプラキンに結合することが示唆された。さらにケラチン 16 に対する抗体を購入して、マウス表皮細胞で、エピプ

ラキン抗体との二重染色を行なったところ、表皮では染色性が一致したが、毛包下部、脂腺では一致しなかった (図 1)。

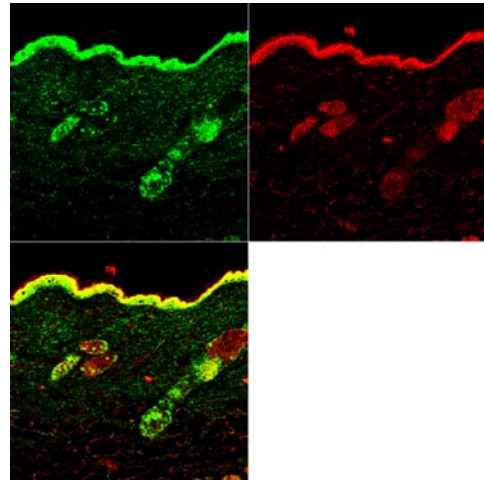


図 1 マウス表皮におけるエピプラキンとケラチン 16 の局在。マウス表皮をエピプラキン (赤) とケラチン 16 (緑) とで二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。表皮では殆ど両者の局在が一致したが、毛包下部では、ケラチン 16 が、脂腺ではエピプラキンが特異的に染色された。

#### 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 2 件)

- ①竹尾直子: コチニール色素によるアナフィラキシーの 1 例. 日皮会誌, 118(6), 1085-1093, 2008. 査読有
- ②竹尾直子: 皮膚症状に対しタクロリムスが有効であった Amyopathic Dermatomyositis の 1 例: 西日皮膚, 69(6), 595-600, 2007. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ①竹尾直子: アスピリン負荷で誘発されたコチニール色素によるアナフィラキシー

の 1 例: 第 106 回日本皮膚科学会総会,  
2007. 4. 20-22, パシフィコ横浜

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹尾 直子 (TAKEO NAOKO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 3 0 4 2 3 6 9 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし