

機関番号： 3 4 5 1 9

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591359

研究課題名（和文）トランスグルタミナーゼの新規酵素活性に基づく角化の分子病態解析

研究課題名（英文）Transglutaminase and protein polymerization in keratinization

研究代表者

山西 清文 (YAMANISHI KIYOFUMI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

研究成果の概要（和文）：角層におけるタンパク質架橋構造として Gln-Lys 結合と SS 結合が存在するが、これらの形成機構や調節については十分解明されていない。本研究では、トランスグルタミナーゼ活性および SS 結合の局在を高感度に可視化する蛍光基質を用いた組織化学を実施し、これらのタンパク質架橋構造が角化の進行に従って順序よく形成され、角層を強靱な構造に維持していることを明らかにした。さらに、トランスグルタミナーゼ 1 遺伝子改変マウス皮膚の形態的観察から、トランスグルタミナーゼ 1 が SS 結合の局在化にも必須の役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The protein cross-links in the stratum corneum include Gln-Lys and SS bonds. In the present study, in combination of the high resolution fluorescent imaging for in situ transglutaminase activity and SS bonds with immunofluorescence, we showed that those cross-links are formed in order in the keratinization process to reinforce the structure of the stratum corneum. Furthermore, we demonstrated that transglutaminase 1 is inevitable for the proper localization of SS in the stratum corneum using mutant mice in transglutaminase 1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：角層、タンパク質架橋、トランスグルタミナーゼ、Gln-Lys 結合、SS 結合

1. 研究開始当初の背景

角層細胞辺縁のタンパク質膜構造である周辺帯にはトランスグルタミナーゼによって触媒される Gln-Lys 結合が存在する。トランスグルタミナーゼ 1 (TGM1) 欠損マウスでは周辺帯の形成不全が観察され、角層バリア機能が破綻することから、TGM1 は Gln-Lys 結合の形成に不可欠と考えられる。タンパク質間架

橋結合として、角層には Cys 間に形成される SS 結合も存在する。しかし、その形成機構や生理的役割については明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

角化過程における Gln-Lys 結合および SS 結合の形成と局在を解析し、これらタンパク

架橋結合の皮膚における機能と生物学的、病態学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物

遺伝子改変マウスの作出とそれを用いる実験は兵庫医科大学動物実験委員会・遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもとに実施した。

(2) 培養細胞

ヒト培養角化細胞はKURABO社から購入し、KGM-2培地で培養した。

(3) トランスフェクション

プラスミドはFugene (Roche diagnostics社) を用いて培養角化細胞に導入した。FLAG-tagは抗FLAG M2モノクローナル抗体で反応後、Cy3標識抗マウスIgG抗体で可視化した。Halo-tagベクターは導入後、TMRあるいはAlexa Fluor® 488標識Halo-tag ligandを培養細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) を用いて蛍光局在を観察した。

(4) 改良In situ TGM アッセイ

組織をブロッキングの後、100 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM CaCl₂、0.1 mM Alexa Fluor® 488 カダベリン (Molecular probe社) 溶液を凍結組織切片に加え、37°C、90分インキュベートした。25 mM EDTAで反応を停止し、LSM510 METAで蛍光画像を記録した。

(6) SS結合の局在アッセイ

凍結切片を5 mM Tris-acetate (pH 6.8)、0.85% NaCl (TAS溶液) で洗浄後、0.15 M N-メチルマレイミド (NEM) を含むTAS溶液で37°C、10分処理しSH基をブロッキングした。TAS溶液で洗浄後、40 mM ジチオスレイトール (DTT) 0.5 mM EDTA溶液で37°C、10分処理しSS結合を開裂させた。洗浄後、0.1 μM Alexa Fluor® 488 マレイミドを加え、室温で10分インキュベートし、洗浄後、LSM510 METAで蛍光を記録した。

4. 研究成果

(1) in situ TGMアッセイの改良と新規基質の応用

組織切片上でTGM1活性を評価する場合、従来基質として用いられているダンシルカダベリンは感度や特異性が低いため、組織中のTGM1活性を忠実に反映する検出方法が必要であると考え、まず、ダンシルカダベリンの代わりにAlexa Fluor® 488カダベリンを用いてin situ TGMアッセイを行う実験系 (改良in situ TGMアッセイ) を構築した。この方法で野生型マウス皮膚のTGM1活性の局在を検討したところ高感度に活性局在を検出できた。TGM1活性のないTGM1欠損マウス皮膚では特異的な蛍光局在はみられないことから、改良in situ TGMアッセイは、TGM1活性をin situで比較的良好に反映する実験系であることが示唆

された。一方、名古屋大人見らはファージディスプレイ法によって、TGMアイソフォームに特異的な基質の開発を行っており、共同研究として、TGM1で架橋される特異的なアミノ酸配列を持つペプチドをダンシルクロライドで標識し、野生型およびTGM1欠損マウス皮膚と反応させた。その結果、この方法で選択したペプチドは野生型マウス皮膚ではAlexa Fluor® 488カダベリンを用いた場合と同様に蛍光局在が検出できた。しかし、TGM1ノックアウトマウス皮膚では特異的な蛍光は検出されないことから、このペプチド基質はin situ TGM1アッセイとして有用であることが明らかになった。

(2) 表皮におけるSS結合の局在検出法の改良

タンパクのCys残基間に形成されるSS結合が角層に存在することは従来より知られていたが、その形成機序や調節については明らかになっていない。In vivoにおけるSS結合の可視化にはN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリル)-マレイミド (DACM) が用いられてきたが感度が低く、蛍光顕微鏡では明瞭な画像として捉えることが難しい。そこで、Alexa Fluor® 488マレイミドを用いて皮膚におけるSS結合の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察する実験系を構築した。その結果、正常マウス皮膚では層状に角層辺縁にSS結合の局在が観察された。NEM処理を行わない場合、DTT処理の有無にかかわらず角層における蛍光はみられなかった。さらに、TGM1の基質となるロリクリンの蛍光抗体法と改良in situ TGMアッセイ/SS結合を検出する実験法を組み合わせ、それぞれの局在の相違を検討した。その結果、ロリクリンとTGM1活性は、ほぼ共局在するが、SS結合はTGM1活性よりも上層に局在することが判明した。即ち、表皮では、TGM1によって触媒されるGln-Lys結合が先に形成され、その後SS結合が形成されて角層を補強することが示唆された。このように、これらのタンパク架橋構造は角化の進行に従って順序よく形成されることが明らかになった。

(3) TGM1変異による細胞内TGM1局在の解析

トランスグルタミナーゼ1 (TGM1) の変異に起因する非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症において見いだされる変異のなかで、アルギニン142をコードするコドンの変異はフィンランドにおいて高頻度に認められ、重症の葉状魚鱗癬の表現型をとることが多い。変異としてはアルギニンからシステイン (R142C)、フェニルアラニンあるいは、ヒスチジンへの変異が報告されているが、それらの異常によるTGM1の持つ酵素活性や局在の異常については詳細は不明である。これらの変異がTGM1の細胞内局在に及ぼす影響について、角化細胞への

一過性のトランスフェクションにより解析した。まず、これらのヒト変異TGM1 cDNAにFRAGをコードする配列を3'側に付加し、CMVプロモーターの制御下に発現するプラスミドを構築し、培養ヒト角化細胞に導入した。その結果、同じ部位の変異でも、それぞれ異なる細胞内局在を示すことが示唆された。次に、Halo-tagをC末端に付加した野生型およびR142C変異ヒトおよびマウスTGM1 cDNAを培養角化細胞に導入した後に、細胞内あるいは細胞外からtagを蛍光標識共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、少なくともTGM1のC末側は細胞外からの標識では蛍光を示さず、細胞内からの標識で初めて検出できることが判明した。即ち、TGM1は細胞膜に存在するタンパクであるが、細胞外へフリップ・フロップすることはないと考えられた。また、野生型TGM1と比較してR142C変異TGM1タンパクは細胞内の核周辺で凝集塊を形成することが判明した。以上の結果から、R142C変異では、酵素タンパクの高次構造の形成障害に加え、細胞内凝集塊形成による膜移行の障害を来すことが示唆された。

(4) TGM1 R142C変異モデルマウスの作成

TGM1のR142C変異による病態として、ヒトでは重症の葉状魚鱗癬の表現型を示す。この変異がマウス皮膚の形成に及ぼす影響について検討するため、この点突然変異をもつマウスを作出した。loxP配列を両側に持つNeoカセットに、マウスTGM1 exon 3にC→T変異をもつDNA断片を組換え、ターゲティングベクターを作成し、ES細胞に導入した。得られたESクローンからキメラマウスを作成し、R142C変異とloxP-Neoを持つマウスを一旦樹立したが、形態的に、このマウス系列のヘテロ変異マウスの表現型は野生型マウスと差異はなかった。また、ホモ変異マウスは致死性であった。この系列のヘテロ変異マウスをCAGCreトランスジェニックマウスと交配して生殖細胞系列からNeoを除去し、TGM1にヘテロR142C変異を持つ変異マウスを作成した。ヘテロR142C変異マウスの表現型も野生型と全く区別がつかなかった。R142Cホモ変異マウスはTGM1欠損マウスと同様の所見を示し、新生仔期に致死性であった。このマウスの表現型解析は現在も引き続き実施中であるが、少なくとも、変異TGM1 mRNAは野生型と同程度の発現が認められた。

(5) TGM1欠損・変異に伴うSS結合局在の解析

TGMファミリーのなかには、TGM2, XIII因子のようにGln-Lys結合以外にSS結合を触媒する活性を有することも報告されている。また、TGM2はGタンパクとしての機能も有してお

り、TGMは複合した酵素活性を示す多機能酵素であると考えられる。そこで、TGM1欠損マウス、TGM1 R142C変異マウス皮膚におけるSS結合の局在を上記の方法で観察した。その結果、野生型に比較して、層状のSS結合の分布は見られず、蛍光は顆粒状、短い膜状、あるいはび漫性に角層細胞質にみられた。即ち、TGM1欠損・変異によりSS結合の適切な形成・分布も著しく障害されることが明らかになった。恐らく、Gln-Lys結合の生成と、SS結合による補強により角層細胞の強靱なバリアとしての機能が保たれるが、少なくともこれらの構造の産生にTGM1が不可欠であり、R142Cのようなわずかな変異でも個体レベルでは重大な障害として表現されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

① Yamamoto M, Imai Y, Nakagawa N, Yamanishi K. Lichen planus-like dermatosis distributed along the lines of Blaschko. *J Dermatol*. 38:190-1, 2011 (査読有)

② Itoh M, Kawamoto T, Tatsukawa H, Kojima S, Yamanishi K, Hitomi K. In Situ Detection of Active Transglutaminases for Keratinocyte-type (TGase 1) and Tissue-type (TGase 2) Using Fluorescence-labeled Highly Reactive Substrate Peptides. *J Histochem Cytochem*. 59:180-187, 2011 (査読有)

③ Tarutani M, Imai Y, Yasuda K, Tsutsui H, Nakanishi K, Yamanishi K. Neutrophil-dominant psoriasis-like skin inflammation induced by epidermal-specific expression of Raf in mice. *J Dermatol Sci*. 58:28-35, 2010 (査読有)

④ Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H, Nakagawa N, Yamanishi K. Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:1760-1765, 2009 (査読有)

⑤ Fujimoto T, Tsuda T, Yamamoto M, Tarutani M, Natsuaki M, Minami S, Ito T, Kozuka T, Yamanishi K. Cutaneous malignant fibrous histiocytoma (undifferentiated pleomorphic sarcoma) arising in a chronic scalp ulcer of a

patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. J Eur Acad Dermatol Venereol, 23:202-203, 2009 (査読有)

⑥ Sugimura Y, Hosono M, Kitamura M, Tsuda T, Yamanishi K, Maki M, Hitomi K. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1-development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. FEBS J, 275:5667-5677, 2008 (査読有)

⑦ Tsuda T, Ishikawa C, Nakagawa N, Konishi H, Tarutani M, Matsuki M, Yamanishi K. A novel point mutation of keratin 17 (KRT17) in a Japanese family with pachyonychia congenita type 2: An RNA-based genetic analysis using a single hair bulb. Br J Dermatol, 159:730-732, 2008 (査読有)

⑧ Tsuda T, Ishikawa C, Konishi H, Hayashi Y, Nakagawa N, Matsuki M, Mizutani H, Yamanishi K. The effect of 14-membered ring macrolides on the production of interleukin-8 mediated by protease-activated receptor 2 in human keratinocytes. Antimicrob Agents Chemother, 52:1538-1541, 2008 (査読有)

[学会発表] (計3件)

① Nakagawa N., Yamamoto M, Sakaguchi Y, Imai Y, Yamanishi K. An unusual Japanese case of congenital ichthyosis with TGMI mutations: A variant of bathing suit ichthyosis? The 10th Ionic Dermatological Association (ADI) International Congress, 2010.10.29-11.3, St. Paul's bay, Malta

② Yamanishi K. Stratum corneum and homeostasis of the cutaneous barrier. The 1st international symposium of deimination and skin biology. 2009.4.11, Osaka, Japan

③ Tarutani M, Imai Y, Tsuda T, Nakanishi K, Yamanishi K. Psoriasis-like hyperplastic and inflammatory lesions produced by epidermis-specific inducible activation of Raf in mice. International Investigative Dermatology 2008.5.14-17 Kyoto, Japan

[図書] (計2件)

① 山西清文, 他, 文光堂 皮膚疾患診療実践ガイド 第2版, 2009, 856

② 山西清文, 他, 講談社, 皮膚科診療カラーアトラス体系 第2巻「角化異常/紅斑・紅皮症/紫斑/血管」, 2008, 184

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm/t/Ref1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 清文 (YAMANISHI KIYOFUMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10182586

(2) 研究分担者

樽谷 勝仁 (TARUTANI MASAHIRO)
高知大学・医学部・准教授
研究者番号: 30301261

(3) 研究協力者

津田 達也 (TSUDA TATSUYA)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80434942
今井 康友 (IMAI YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10529514
中川 登 (NAKAGAWA NOBORU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90412014
山本 雅章 (YAMAMOTO MASAHIRO)
兵庫医科大学・大学院生
小西 弘江 (KONISHI HIROE)
兵庫医科大学・実験補助
坂口 祥子 (SAKAGUCHI YOSHIKO)
兵庫医科大学・実験補助