

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390279

研究課題名(和文) 標的蛋白を急速に分解する画期的マウスシステムの開発

研究課題名(英文) Development of a new murine system to degrade target proteins rapidly

研究代表者

澤村 大輔 (Sawamura, Daisuke)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60196334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子を破壊するのではなく、任意の時期に目的の蛋白そのものを分解できるマウスシステムを着想した。そこでBP180の分解を試みた。K14プロモーター下に、分解TAGを持つBP180遺伝子を発現する遺伝子コンストラクトを作製。表皮細胞株にTIR遺伝子を導入して、TIR遺伝子を恒常的に発現する細胞株を作製した。それらの発現をウエスタンブロットと蛍光抗体法で確認した。次にその細胞株に、TAG-BP180の遺伝子を導入し、オーキシンを加えたところ、TAG-BP180の分解が確かめられた。本研究は、接合部型表皮水疱症や類天疱瘡の新しい観点からの診断法や治療法が確立される可能性が高いことが解明された。

研究成果の概要(英文)：We think of a mouse system in which not gene but protein is destroyed. In this study, we tried to eliminate BP180 in keratinocytes. First, we generated an expression vector BP180 with resolving TAG driven by K14 promoter. TIR gene was introduced to keratinocyte and a keratinocyte line which express TIR gene permanently was established. Expression of TIR gene was examined by western blot and immunofluorescence. Next, we introduced TAG-BP180 construct to those cells and add auxin to culture medium. We found decrease of BP180 expression. This study suggest that this system may provide new diagnosis methods and new treatments for junctional epidermolysis and bullous pemphigoid.

研究分野：医歯薬学

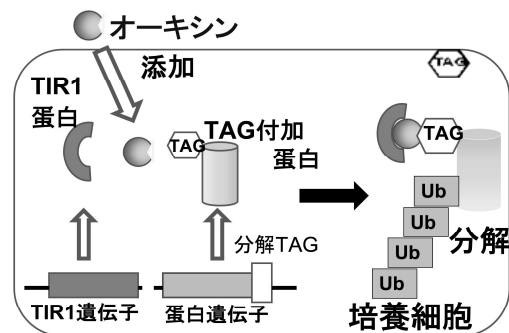
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：マウス モデル 遺伝子 皮膚 表皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ある蛋白がどのように生体で機能しているかを調べる最も直接的な方法のひとつに、その蛋白の遺伝子を破壊したノックアウトマウスの解析がある。申請者もいろいろな皮膚疾患に関連する K0 マウスを作成してきた。しかし、ノックアウトマウスでは胚の段階から目的の遺伝子が破壊されているため、その蛋白が生体にとって重要なものであれば、ノックアウトマウスは生存できないことも多い。そこで、コンディショナルノックアウトマウスが開発された。

このコンディショナルノックアウトマウスでは胚の段階では遺伝子が機能するが、ある薬剤を投与すると遺伝子が破壊されノックアウト状態が作られる。しかしながら、その作成には多大な労力、時間、資金がかかる。そこで申請者は、遺伝子を破壊するのではなく、その産物である蛋白を任意の時期に分解できるコンディショナルノックアウトマウス作成法を着想している。植物のホルモンであるオーキシンは細胞内で TIR1 蛋白と複合



培養細胞での新規分解システム

体をつくると、ある特定の配列(分解TAG)をもつ蛋白に結合できるようになり、ユビキチン化を誘導しその蛋白を分解することが植物の細胞で明らかになった。そこで、そのシステムを動物の培養細胞に応用する新しい分解システムに応用する。TIR1遺伝子と分解TAGを持つ蛋白遺伝子を培養細胞に導入する。そこにオーキシンが添加されるとTIR1蛋白との複合体が分解TAGに結合し、その標的蛋白をユビキチン化して急速に分解するという仕組みである。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、このシステムを皮膚の細胞にて実現し、BP180 を分解することにより接合部型表皮水疱症のモデルを、また SERCA 2 を分解することにより、ダリエ病のモデルを作製することである。

BP180 では、我々が作成した BP180 ノックアウトの表皮細胞に、TIR1 遺伝子と分解 TAG を持つ BP180 遺伝子の両方の遺伝子を導入した細胞を作成する。これにオーキシンを加え

BP180 を分解する。さらに、TIR1 遺伝子と分解 TAG を持つ BP180 遺伝子の両方の遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成する。次に BP180K0 マウスの系と交配し、内因性 BP180 のない状態で TIR1 と TAG-BP180 が発現するマウスを作る。そこにオーキシンを投与し TAG-BP180 を分解し、接合部型表皮水疱症のモデルを作成する。また SERCA2 では単に TIR1 遺伝子と TAG-SERCA2 遺伝子が発現する表皮細胞を作製し、オーキシンを投与する。TIR1 遺伝子と TAG-SERCA2 遺伝子が発現するトランスジェニックマウスを交配し、2 つの遺伝子が発現するマウスにオーキシンを投与する。そのマウスでは内因性の SERCA2 と TAG-SERCA2 の両方を発現しているため、オーキシン投与で TAG-SERCA2 を分解すれば、優性の状態を作成できるという工夫である。

3. 研究の方法

(1) BP180 の発現のない細胞株の作成：我々が作成した BP180 のノックアウトマウスの皮膚を採取し、表皮細胞を分離、その細胞あるいはトランスフォームした細胞を確立する。

(2) TAG-BP180 遺伝子の作成：BP180 の cDNA 遺伝子があるので、それをもとに BP180 の N 末端に TAG を有する TAG-BP180 遺伝子を構築する。なお、BP180 は N 末端に細胞外分泌に関連する signal sequence がなく N 末端がのこるので、分解 TAG は N 末端に付加する。さらに TAG-BP180 遺伝子に K14 プロモーターを有するコンストラクトを組み込む。

(3) BP180 ノックアウトの表皮細胞への TIR1 遺伝子と分解 TAG を持つ BP180 の導入：通常の方法で BP180 発現のない細胞にそれらの遺伝子を導入する。

(4) BP180 蛋白の分解：作成された細胞にオーキシンを様々な濃度で加え、BP180 の分解を蛍光抗体、ウエスタンブロット法にて確認する。

(5) 分解 TAG をもつ SERCA2 遺伝子の構築：我々はすでにヒト SERCA2 の cDNA 遺伝子を有しているため、それをもとに N 末端と C 末端に TAG を有する TAG-SERCA2 遺伝子を構築する。その TAG-SERCA2 遺伝子を K14 プロモーターを有するコンストラクトに組み込む。K14 プロモーターは SERCA2 のものより強い発現を誘導する。

(6) TAG-SERCA2 遺伝子と TIR 遺伝子の導入：マウスの表皮細胞を培養し、通常の方法で、TAG-SERCA2 遺伝子と TIR 遺伝子を組み込み、細胞株を確立する。

(7) SERCA2 蛋白の部分的分解：その細胞にオーキシンを加えることにより、TAG-SERCA2 のみを分解し、ダリエ病の病態を再現する。

4. 研究成果

(1) BP180 の発現のない細胞株の作成

BP180 のノックアウトマウスの皮膚を採取し、表皮細胞を分離し、その細胞あるいはトランスフォームした細胞を確立した。BP180 の発現は、蛍光抗体、ウエスタンブロット、RT-PCR で確認した。

(2) TAG-BP180 遺伝子の作成

構築された遺伝子はシーケンスを行い、適切であることを確認した。さらに、表皮細胞に導入し BP180 の発現を確認した。

(3) BP180 ノックアウトの表皮細胞への TIR1 遺伝子と分解 TAG を持つ BP180 の導入

通常の方法で BP180 発現のない細胞にそれらの遺伝子を導入した。

(4) BP180 蛋白の分解

作成された細胞にオーキシンを様々の濃度で加え、BP180 の分解を蛍光抗体、ウエスタンブロットにて確認する研究を行った。しかしながら、BP180 の発現は、約 40% 減少したがすべての蛋白の消失は起こらなかった。約半分の発現が残っていることは、接合部型表皮水疱症ではキャリアーの状態に近い発現量である。人ではキャリアーの状態では、水疱形成は起こらず、症状はでないのでモデルを作るシステムとしては、有効ではないことが明らかとなった。

(5) 分解 TAG をもつ SERCA2 遺伝子の構築

我々は SERCA2 の cDNA 遺伝子を有しているので、それをもとに N 末端と C 末端に TAG を有する TAG-SERCA2 遺伝子を構築し、K14 プロモーターを有するコンストラクトに組み込んだ。そしてその発現を確認した。

(6) TAG-SERCA2 遺伝子と TIR 遺伝子の導入

マウスの表皮細胞を培養し、通常の方法で、TAG-SERCA2 遺伝子と TIR 遺伝子を組み込み、細胞株を確立した。

(7) SERCA2 蛋白の部分的分解

その細胞にオーキシンをくわえることにより、SERCA2 の発現を確認にしたが、ほとんど減少はみとめられないことが明確となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Shinkuma S, Sawamura D, Fujita Y, Kawasaki H, Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H. Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a patient with recessive

dystrophic epidermolysis bullosa.

Acta Derm Venereol. 査読有,

2014;94(1):98-99.

doi: 10.2340/00015555-1592.

Tarutani M, Shiga T, Nakajima K,

Nakano H, Sawamura D, Sano S.

Dystrophic epidermolysis bullosa

pruriginosa in a mother and daughter

successfully treated by low dose

cyclosporine. Eur J Dermatol. 2013

Sep-Oct;23(5):727-729. 査読有

doi:10.1684/ejd.2013.2126.

Nakajima K, Kaneko T, Aizu T, Nakano

H, Matsuzaki Y, Sawamura D.

Signet-ring cutaneous squamous cell

carcinoma arising on the back of the

finger. 査読有, Case Rep Dermatol.

2013;5(2):215-218.

doi:10.1159/000354536.

Minakawa S, Nakano H, Nakajima K,

Matsuzaki Y, Takiyoshi N, Akasaka E,

Rokunohe D, Sawamura D. Mutational

analysis on 16 Japanese population

cases with epidermolysis bullosa

simplex. 査読有, J Dermatol Sci.

2013 ;72(3):330-332.

doi:10.1016/j.jdermsci.2013.08.001.

Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D.

EPR spectroscopic investigation of

psoriatic finger nails. 査読有, Skin

Res Technol. 2013;19(4):450-453.

doi:10.1111/srt.12068.

Uchiyama K, Nakanishi G, Fujimoto N,

Nakano H, Sawamura D, Tanaka T.

Expression of a mutated allele,

non-reduced by aging, in a Japanese

family with localized epidermolysis

bullosa simplex due to a novel

mutation, p.Arg169Gly, of keratin 5

gene. 査読有, Eur J Dermatol.

2013;23(2):267-269.
doi:10.1684/ejd.2013.1995.
Sayyahfar S, Chavoshzadeh Z, Khaledi M, Madadi F, Yeganeh MH, Sawamura D, Nakano H, Rezaei N. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis presenting with palmoplantar keratoderma. 査読有, *Pediatr Dermatol*. 2013;30(6):754-756.
doi:10.1111/j.1525-1470.2012.01833.x.
Matsuzaki Y, Ota K, Sato K, Nara S, Yagushi T, Nakano H, Sawamura D. Deep pseudocystic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with myasthenia gravis. 査読有, *Acta Derm Venereol*. 2013;93(3):358-9.
doi:10.2340/00015555-1452.
Yajima M, Kitoh A, Nakano H, Sawamura D, Miyachi Y, Kabashima K. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa with the G2287R mutation. 査読有, *Eur J Dermatol*. 2012;22(5):685-7.
doi: 10.1684/ejd.2012.1799.

[学会発表](計11件)

中野 創, 遺伝子診断の検査法, 第112回日本皮膚科学会総会, 2013年6月14-16日, パシフィコ横浜

澤村大輔, 表皮水疱症の基礎と臨床, 第26回愛媛小児科・皮膚科フォーラム, 2013年9月11日, ホテル JAL シティ松山

澤村大輔, 遺伝性水疱症, 平成24年度第111回日本皮膚科学会総会教育講習会 - 必須コース, 2012年6月1-3日, 国立京都国際会館

澤村大輔, 表皮水疱症の医療環境について日本: 東北地域の医療環境, 表皮水疱症友の会 DebRA Japan (NPO 法人) 5周年記念 表皮水疱症アジア交流大会 in 札幌, 2012.7.21-22. 北海道大学学術交流会館

[図書](計1件)

Kouichi Nakagawa, Daisuke Sawamura:
Psoriasis vulgaris investigated by electron paramagnetic resonance.
Psoriasis: Types, Triggers and Treatment Strategies. Phillip B. Smith, Nathan C. Johnson, Nova Science Publishers, Inc. NY USA. 2013;143-164.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 大輔 (Sawamura, Daisuke)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 60196334

(2) 研究分担者

松崎 康司 (Matsuzaki, Yasushi)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50322946

(3) 研究分担者

中野 創 (Nakano, Hajime)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90281922