

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 マウス組織内活性可視化に基づく
タンパク質架橋化酵素に関する組織化学的研究

氏名 * 伊藤 みほ

論文内容の要旨

生体構造の構築やその保持は生命活動を維持する上で欠かすことのできない生理現象である。本研究では、生体構造構築に関与することが知られているタンパク質架橋化酵素「トランスグルタミナーゼ」(以下 TGase と略記)に焦点を当てて研究を進めている。

TGase は Ca^{2+} 依存的にタンパク質中の特定のグルタミン (Gln) 残基とリジン (Lys) 残基を共有結合により架橋する酵素である。微生物から植物、高等動物まで幅広い生物種で保存されていることが知られており、ヒトでは現在までに 8 種類のアイソザイム (TGase 1~TGase 7, Factor XIII) が存在していることが確認されている。主要なアイソザイムとして、Factor XIII は血漿中や血小板に、TGase 1 や TGase 3 は皮膚や毛胞などの上皮組織に、また TGase 2 は多様な組織に広く存在するとされている。他にも、TGase 4 は前立腺に、TGase 6 や TGase 7 は近年クローニングされた新規のアイソザイムであり、TGase 6 は主に表皮に、TGase 7 は胎盤・子宮に存在する事が示されている。このように多くのアイソザイムが生体内に広く存在するため、幅広い生理現象に関与していることが予想される。

このように各 TGase アイソザイムは生体内の様々な部位で、それぞれ異なったタンパク質を基質とすることで多彩な生命現象に関与している。しかし、TGase に関する研究は、その多くが個々の現象や疾患に対する各論的・散発的研究であり、その大半は活性化される時期や詳細な局在部位も明確には示されておらず、基礎的な知見が不足していた。そもそも、これまで TGase の活性について組織学的な観点から調べた研究は少ないが、TGase の生理機能解明の点から、生体内の活性としての存在部位の網羅的な検出は必須である。そのため、まずアイソザイムごとに活性としての存在部位を調べることで機能解明にも繋がると考えた。ここで問題となるのは、これまでに TGase の存在部位を調べた例はあるが、ほとんどが抽出液のウェスタンブロット

や抗体染色など、どれもタンパク質としての存在しか捉えていないという点である。TGase 1 は限定分解されると活性を示す不活性前駆体として存在し、TGase 2 は架橋反応だけでなく G 蛋白質としてなどの他の機能も持つため、TGase 活性を調べる必要がある。また活性に基づいた検出でも、アイソザイムごとの局在分布を調べられたものは無かった。

そこで本研究ではすでに同定されている TGase アイソザイムごとのグルタミン残基側として至適な「高反応性基質配列」を利用して、簡易かつアイソザイム特異的な活性の局在を可視化できる方法を確立した。またマウスの全身凍結切片を用いて網羅的に研究を進めることで機能解明にも繋がると考えた。これは、TGase の認識する基質タンパク質中の特定のグルタミン残基は周囲の配列に一定の法則性があることに基づいて、ランダムペプチドライブラリから得たものであり、わずか 12 残基のペプチドとして各 TGase アイソザイムに特異的で高反応な基質として機能する。方法としては、マウス等の組織切片を蛍光標識した「高反応性基質配列」のペプチドを含む反応溶液で反応させる。この操作により活性を持つ内在性の TGase が存在する部位では、グルタミン残基側として働く「高反応性基質配列」のペプチドと、組織切片中のリジン残基を提供するタンパク質が架橋構造を形成するため、組織内の TGase 活性がある箇所では蛍光の観察が可能となる。今回は TGase 1 と TGase 2 の高反応性基質配列を利用して解析を行い、まずは出生後 8 日目のマウスの全身凍結切片に関して研究を進めた。これにより、これまで解析が不可能であった組織も含め、全組織において同条件下で網羅的に調べることが可能であった。

TGase が活性を持ち、架橋反応を行った場所でのみ蛍光シグナルが観察されるが、結果として各 TGase アイソザイムごとに活性分布に大きな違いが見られ非常に興味深い知見を得ることができた。TGase 1 も TGase 2 もこれまでの知見の裏付けとなる結果に加え、例えば TGase 1 は新たに歯などにおいて高い活性が見られるなど、多くの新規の知見を得ることができた。さらに高解像度の解析により TGase 1 は上皮組織でも重層扁平上皮を中心に存在することが明らかになった。TGase 2 はこれまで全組織に存在すると報告されていたが、予想に反し活性分布に偏りがあり、結合組織を中心に存在するという結果を見出した。

また、胎生期（受精後：E10.5, E12.5, E14.5, E16.5, E18.5）及び、新生児を用いて活性染色や免疫組織学的染色を行い、発生段階から出生後にかけての TGase の動向についての研究を進めた。まず TGase 1 においては上皮組織は最初から活性が高いわけではなく、14.5 日目の胎児の腹部に位置する上皮組織でシグナルが目立ち始め、16.5 日目に圧倒的に活性が強くなり、新生児では毛胞でもシグナルが見られ始める。TGase 2 では 12.5 日目からしばらく心臓、肝臓、脊椎において高いが、16.5 日目には急激に筋肉や小腸など他の組織でもシグナルが検出され、以降、ほぼ成体のシグナルに近づく。活性染色と共に抗体染色も行い、その拡大像を見てみると TG1 の皮膚では 14.5 日目から発現も活性も見られるが、興味深いことに、蛋白は顆粒層から角質層にかけて発現しているのに対し、活性は顆粒層でのみ見られた。よってこの結果から、

この活性検出法は発現と区別して活性を持ち得る TGase の検出に有効であることが確認された。また、TGase 1 も TGase 2 も受精後 16.5 日目を境にシグナルに大きな変化が観察され、この時期に組織の構成にも大きな変化があるのではないかとということ、そして、TGase の発現時期が各臓器が発生し始めた後に活性を持ち始めることから、組織の強化によく関わっているのではと考えた。

また、TGase は生体構造の構築など生命活動の保持に関与するだけでなく、異常な状態での架橋反応は種々の病的現象（例えば角化異常による皮膚疾患やアルツハイマーなどの神経変性疾患、線維症など）にも関わることが知られている。タンパク質架橋化反応が関与した結果生じる、病態の発生部位、発生時期、発生メカニズムについては、これまで詳細な検討はなされていない。よって確立した活性の検出方法を利用して、さらに TGase の関与が予想される疾患モデルマウスにおいても研究を進めることで、疾患の病因究明にも大きな役割を果たすと考えた。今回は TGase 1 についてのみ絞り、皮膚形成異常である「魚鱗癬」のヒト疾患モデルマウスを用いて実験を進めた。魚鱗癬とは、皮膚病の一つであり、魚の鱗様の角質の堆積をほぼ全身の皮膚に広範囲に認められる。遺伝子異常による皮膚表面角質の形成障害が原因と考えられており、原因となる遺伝子により魚鱗癬は数種類に分類される。その中で今回は最も重篤な先天性魚鱗癬であり、新生児期の死亡例も見られる「道化師様魚鱗癬」を対象とした。病因となる ABCA12 は脂質を含む層板顆粒に局在し、この脂質の膜輸送に関与することで皮膚バリア機能の大きな役割を担う細胞間脂質層を形成し水分損失や抗原侵入を防ぐ。この原因遺伝子である *Abca12* をノックアウトさせたヒト疾患モデルマウスを対象に、胎生期(E14.5, E16.5, E18.5)及び新生児の TGase 1 の酵素活性とタンパク質発現の動向について調べた。

また道化師様魚鱗癬について全身で網羅的に調べた報告はあまり無いため、TGase 1 についてのみ言及するのみに留めず、皮膚構成タンパク質や、ABCA12 をはじめ、細胞増殖因子など、関与しうる因子の発現部位についても抗体染色により明らかにし、この結果を正常なマウスの染色結果と比較することで各種関連因子と皮膚疾患との相互関係を明らかにした。結果、ABCA12 が 16.5 日目には発現しており、皮膚では角質層で最も ABCA12 の影響が観察され、また皮膚以外の組織でも影響を及ぼすことが確認された。今後、結果を分析し、データ蓄積を行うことで病因の解明、および治療法の開発、疾患の評価の指標として貢献できることを期待している。