

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 XVII 型コラーゲンのタンパク質分解的切断によって生じる自己抗原性エピトープの解析

氏 名 山内 友恵

論 文 内 容 の 要 旨

主に重層上皮に発達する細胞-基質間接着装置である I 型ヘミデスモソーム (HD) はプレクチン、BP230、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 、XVII 型コラーゲンを主要な構成成分として形成されている。XVII 型コラーゲンは全長の分子量 180 kDa の II 型の膜貫通型タンパク質で、接着受容体として機能していると考えられている。一部の XVII 型コラーゲン分子はその細胞外部分が細胞膜表面で切断されていることがわかっているが、この細胞外部分の切断は膜に最も近接した非コラーゲンドメイン 16A (NC16A ドメイン) 中で起きている。XVII 型コラーゲンはいくつかの自己免疫性表皮水疱症の主要抗原として知られており、その中の一つに線状 IgA 水疱症 (LAD) がある。LAD 患者の血清中に含まれる自己抗体は、切断によって生じた XVII 型コラーゲンの細胞外断片とは反応するが、全長分子とは反応しないことが知られていて、この点は他の XVII 型コラーゲンを標的とする表皮水疱症の自己抗体の反応性と比べてユニークな特徴となっている。しかし、この LAD 自己抗体によって認識される切断依存的なエピトープの性質や位置については、これまでよくわかっていなかった。当研究室では、ウシ角膜から単離した HD 画分をマウスに免疫することで多数のマウスモノクローナル抗体を作製して来たが、その中に LAD 自己抗体と非常によく似た断片特異的な反応性を示すモノクローナル抗体 1337 を見出した。そこで本研究では、単一のエピトープを認識するモノクローナルな性質をもつ 1337 抗体とポリクローナルな LAD 血清を比較対照しつつ、この断片特異的なエピトープの位置と性質を解明することを第一の目的とした。

まず、全長 XVII 型コラーゲンをプラスミンにより限定分解し、生じた分解断片との反応性を調べた。その結果、MAb-1337 と 6 種の LAD 血清のいずれも、これらの分解断片と陽性反応を示した。このことから、断片のみに特異的に付加される何らかの翻訳後修飾がエピトープ形成に関与している可能性はなくなった。次に、哺乳類細胞由来のウシヒトのキメラ組換え XVII 型コラーゲンタンパク質と、大腸菌由来の組換えタンパク質を用いた免疫ブロットにより、MAb-1337 と LAD 血清のエピトープの位置を決定した。その結果、MAb-1337 は、XVII 型コラーゲン細胞外部分の NC16A ドメインの C 末端側の最大 21 アミノ酸残基の配列から形成されるエピトープを認識していることが明らかとなった。

一方、6種のうち4種のLAD血清が認識する主要なエピトープはNC16AドメインとC15ドメイン(コラーゲンドメイン15)の境界領域に存在することがわかった。これらの結果からは、断片特異的な反応性を示す抗体が認識するエピトープは、NC16Aドメインのほぼ中央に位置する切断によって新たに露出したN末端のアミノ酸残基を含んでいないことも明らかとなった。

以上の結果から、XVII型コラーゲンの細胞外断片に存在する特異的エピトープは、切断依存的に誘導され、切断面からは離れた領域での構造変化によって形成されることがわかった。本研究の成果はLADの病理の一端を明らかにするとともに、XVII型コラーゲンのNC16Aドメインが示す高い自己抗原性と切断の関わりを明らかにする手がかりとなる可能性がある。

次に、私はXVII型コラーゲンの細胞外部分のsheddingがHD構造の制御とどのように関わりがあるのかを明らかにするため、培養細胞を血清刺激した際のHD解体に注目して実験をおこなった。

無血清培地で長期培養することでヒト扁平上皮癌由来のDJM-1細胞にHDを形成させ、その後、血清添加刺激することで、HDの解体を誘導した。血清添加24時間後には、HDが比較的小さな点状の構造へと解体されるのが、インテグリン β 4サブユニットに対する抗体染色により観察された。この時、XVII型コラーゲンの細胞外部分の切断は促進されていた。しかし、メタロプロテアーゼ阻害剤の添加によりXVII型コラーゲンの切断を抑制しても、ヘミデスモソームの解体には影響しなかった。一方、PKC阻害剤であるスタウロsporinは、血清刺激によるHD解体をほぼ完全に抑制することができた。

以上の実験結果から血清刺激によるDJM-1細胞のHD解体にXVII型コラーゲンの切断は関与しないことが明らかとなった。しかし、今回、DJM-1細胞に形成されたHDが血清刺激により解体されることに加え、PKCを介したリン酸化が解体には必須の役割を果たしていることが確かめられた。今後は、この実験系を使って、XVII型コラーゲンのリン酸化にも注目して、HDや細胞外マトリックスの解体の分子メカニズムを明らかにしていきたい。