

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

山内 友恵

目次

PartI

「線状 IgA 表皮水疱症の主な切断依存的エピトープは、XVII 型コラーゲンの 16 番目の非コラーゲンドメインと 15 番目のコラーゲンドメインの境界領域に形成される」

| | |
|----|----|
| 要旨 | 3 |
| 序論 | 5 |
| 結果 | 7 |
| 図 | 13 |
| 考察 | 21 |

PartII

「血清添加刺激による I 型 HD 解体時の XVII 型コラーゲンの観察」

| | |
|-------|----|
| 要旨 | 26 |
| 序論 | 27 |
| 結果 | 28 |
| 図 | 32 |
| 考察 | 38 |
| 材料と方法 | 40 |
| 謝辞 | 48 |
| 参考文献 | 49 |

Part I

線状 IgA 表皮水疱症の主な切断依存的エピトープは、XVII 型コラーゲンの 16 番目の非コラーゲンドメインと 15 番目のコラーゲンドメインの境界領域に形成される

要旨

XVII 型コラーゲンは、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) の主要構成タンパク質の一つである。分子量 180 kDa の II 型膜貫通型タンパク質である XVII 型コラーゲンは、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) のほぼ中央部で生じている。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 XVII 型コラーゲンを標的とする他の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いものと考えられた。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、NC16A ドメインの C 末端側の最大 22 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。これらの結果は、断片特異的なエピトープが、切断によって新たに露出した N 末端の A

ミノ酸残基を含んでいないことも示している。

本研究結果から、**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る、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し、より有効な **LAD** の診断方法の開発に寄与するとともに、**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解明する手がかりとなる可能性がある。

序論

表皮を含む重層上皮に分布するヘミデスモソームは、中間径線維が裏打ちする細胞-基質間の接着装置である[1]。ヘミデスモソームの主要な構成タンパク質のほとんどは何らかの自己免疫性表皮水疱症疾患の抗原タンパク質としても知られており、実際にそれらの内のいくつかは、患者血清を用いて初めて cDNA が単離されている[2, 3]。線状 IgA 表皮水疱症 (linear IgA bullous dermatosis: LAD) は、表皮基底膜部に IgA 自己抗体の線状な沈着が認められることにより診断される自己免疫性表皮水疱症の一種である[4]。表皮-基底膜間に生じる水疱の表皮側に IgA 自己抗体の沈着が認められるのが LAD 症例の多数を占める lamina lucida (透明帯) 型で、基底膜側に沈着を認めるのが少数派の lamina densa (稠密帯) 型である[4]。lamina lucida 型の自己抗原には、分子量 120kDa の LAD-1 と 97kDa の LABD97 が存在することが報告されている[4]。LAD-1 は角化細胞の培養上清から発見され[5]、LABD97 は表皮から抽出された[6]。これまでの研究により、これらは膜局在型のメタロプロテアーゼである ADAMs によって細胞膜表面で II 型膜タンパク質であるヒト XVII 型コラーゲンの細胞外部分が切断された結果、生じたものであることがわかっている[7, 8]。切断部に相当する LABD97 の N 末端として 531 番目のアラニンが[6]、120 kDa の LAD-1 では 524 番目のロイシンが同定されている[9]。これに加えて、最近、LAD-1 の質量分析により Asp513、Glu525、Gly526 が N 末端として新たに報告されている[10]。これらの N 末端として報告されているアミノ酸残基はいずれも細胞膜に最も近接した NC16A (non-collagenous 16 A) ドメインに含まれている。さらに、LABD97 では C 端部分が欠失していることもわかっている[6, 11, 12]。

興味深いことに、LAD 患者血清は LAD-1 および LABD97 とは反応するが、全長の XVII 型コラーゲンとは反応しない[5, 13, 14]。このことは同じく XVII 型コラーゲンを主要な抗原とする自己免疫性表皮水疱症である類天疱瘡 (bullous pemphigoid: BP) 患者血清とは対照的である。BP 患者血清は NC16A ドメインを主要抗原領域とし、全長の XVII 型コラーゲンとも良好な反応を示す[3, 15, 16]。この LAD 患者血清に特徴的な反応性は、細胞外部分の切断により露出または形成されるユニークなエピトープの存在を仮定すると説明できる[4, 5, 11]。したがって、このようなエピトープの性質を明らかにする研究は、LAD の病理のさらなる理解には欠かせないと考えられる。

これまでに、LAD 患者血清の認識する主要な抗原領域については、XVII 型コラーゲンの C15 (collagenous 15) ドメインに存在するとする報告がある一方で [14]、NC16A ドメインに存在するとする報告もあった [17, 18]。しかしながら、LAD 自己抗体が認識する切断依存的なエピトープについてのそれ以上の解析はこれまでになされていない。このような解析をおこなうにあたっての障害の一つに、LAD 患者血清に含まれる自己抗体が、多様なエピトープを認識するポリクローナルな性質を持つことがあげられる。

私たちの研究室ではウシ角膜から調製した単離ヘミデスモソーム画分をマウスに免疫することで、これまでに多数のモノクローナル抗体を作製して来た [19]。これらモノクローナル抗体の中に、ウシ XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片と免疫ブロット法、免疫沈降法、免疫蛍光組織染色法下で特異的に反応し、全長タンパク質とは反応しないモノクローナル抗体 1337 (MAb-1337) を見出した [11, 20, 21]。MAb-1337 は未変性および変性状態の切断された細胞外部分上のみ存在するエピトープを認識していると考えられる。

本研究の目的は、断片特異的な反応性を示す MAb-1337 と LAD 患者血清を用いて、XVII 型コラーゲン上の切断依存的なエピトープの性質を明らかにすることである。まず、より単純化したモデルとしてモノクローナル抗体 1337 を用いての解析をおこなった。その後、その結果にもとづき、ポリクローナルな性質をもつ LAD 血清の認識するエピトープの解析をおこなった。

結果

1337 モノクローナル抗体はプラスミン処理によるウシ XVII 型コラーゲン全長タンパク質の部分分解産物と反応した

先行研究により、120 kDa の XVII 型コラーゲン細胞外断片をプラスミン消化することによって 97 kDa の LABD97 が生ずることが報告されていた[12]。私は、MAb-1337 が切断によって直接的に惹起されるエピトープを認識しているのか、それとも切断後に付加される何らかの翻訳後修飾を含むエピトープを認識しているのかを決定するために、培養細胞の膜面分から可溶化されたウシ XVII 型コラーゲンの 180 kDa 全長タンパク質をプラスミンを用いて部分分解し、MAb-1337 との反応性を調べた。まず XVII 型コラーゲンの細胞外部分を認識する MAb-233 による免疫ブロットによって、180 kDa のウシ XVII 型コラーゲンが、160–80 kDa の範囲の断片にプラスミンにより分解されていることを確かめた (Fig. 1B 左)。MAb-1337 は 0.1 unit/ml プラスミン処理により生じた 120 kDa 断片と 0.5 unit/ml プラスミン処理による 120–80 kDa 断片とのみ反応し、全長の 180 kDa および 160–130 kDa の分解産物とは反応しなかった。これらの結果は、MAb-1337 が切断によって直接的に露出または形成されるエピトープを認識していることを示している。

1337 モノクローナル抗体はウシ NC16A ドメイン中のアミノ酸残基を認識している

MAb-1337 は、細胞の培養上清から調製したウシ XVII 型コラーゲン由来の 120 kDa 断片とは反応したが、ヒト XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片とは反応しなかった[11] (Fig. 2B)。この MAb-1337 のウシ XVII 型コラーゲンタンパク質に対する特異的な反応性を利用して、MAb-1337 のエピトープの位置をウシ-ヒトのキメラ XVII 型コラーゲン組換えタンパク質を用いて解析した (Fig. 2A and B)。3種類のキメラ XVII 型コラーゲンをコードするコンストラクトを作製した。BBH はウシ NC16 ドメインと C15 ドメイン (アミノ酸配列 1–798 番) をヒトの NC15 ドメインから NC1 ドメインまで (793–1497 番) に融合したキメラタンパク質 ; HHB はヒト NC16 ドメインと C15 ドメイン (アミノ酸配列 1–792 番) をウシの NC15 ドメインから NC1 ドメインまで (799–1485 番) に融合したキメラタンパク質 ; HBB はヒト NC16 ドメインを (アミノ酸配列 1–566 番) をウシの C15 ドメインから NC1 ドメインまで (577–1485 番) に融

合したキメラタンパク質である。アミノ酸番号は GenBank に登録されたウシ XVII 型コラーゲン (AB900156) とヒト XVII 型コラーゲン (AB900157) の cDNA 配列に依拠した。

3 種のキメラタンパク質をそれぞれコードする pEBMulti プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクトし、安定発現株を得た。これらの HeLa 細胞の培養上清を硫酸沈殿法により濃縮したところ、強制発現させた BBH、HHB、HBB の各キメラ組換え XVII 型コラーゲンの細胞外部分が 120 kDa 断片として検出されたので、以下の免疫ブロット実験に用いた。ヒトとウシ両方の XVII 型コラーゲン細胞外部分と交差するモノクローナル抗体 233 (MAb-233) は 3 種のキメラ組換えポリペプチドに対して同等の反応を示した。このことはブロット膜上にほぼ同量の組換えポリペプチドが存在していることを示している。C 末端部分を認識するモノクローナル抗体 C34 (MAb-C34) はウシ XVII 型コラーゲンとは反応せず、キメラ 3 種の中では BBH 組換えタンパク質の細胞外断片のみに反応した。NC16A ドメインに対するポリクローナル抗体 (PAb-NC16A) はウシ XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片とは反応せず、3 種のキメラ組換えポリペプチドの中では HHB と HBB の 120 kDa 断片と反応した。そこで私たちは MAb-1337 のエピトープの場所を同定するために、異なる 3 種のウシ・ヒト XVII 型コラーゲンのキメラ組換えタンパク質 (BBH、HHB、HBB) との反応性を免疫ブロット法により調べた (Fig. 2B)。MAb-1337 は BBH の 120 kDa 断片とは反応したが、HHB と HBB の 120 kDa 断片とは反応しなかった。これらの結果は、MAb-1337 の認識するエピトープがウシ XVII 型コラーゲンの NC16A ドメイン中に存在するアミノ酸残基を含んでいることを示している。

MAb-1337 のエピトープはウシ NC16A ドメイン内の C 末端側 Leu546–Glu567 の配列中に存在する

MAb-1337 のエピトープの位置をさらに詳細に決定するため、私はまず、ウシ XVII 型コラーゲンの NC16A ドメインの C 端側半分と C15 ドメインの大半を含む大腸菌由来の組換えタンパク質 (Bo530+C15) を用いた免疫ブロットを行った (Fig. 3A と B)。

Bo530+C15 と HeLa 細胞の培養上清から調製したウシ XVII 型コラーゲンの 120 kDa 細胞外断片を含む試料を用いた免疫ブロットにより、それぞれに対する MAb-1337 の反応性を調べた (Fig. 3C)。PVDF 膜上に転写されたポリペプ

チド鎖をポンソーで染色すると、Bo530+C15 のバンドは強く検出され(矢尻)、その一方で培養上清の 120 kDa 断片は明瞭なバンドとして確認できなかつた。(矢印) (Fig. 3C 左)。この転写膜を MAb-1337 を用いて免疫ブロットすると予想したとおり、培養細胞由来の 120 kDa 断片とは強く反応した (Fig.3C 右)。しかしながら、意外なことに MAb-1337 は Bo530+C15 に対しても反応性を示した。Bo530+C15 の N 末端には TRX タグが結合しているため (Fig. 3B)、この結果は MAb1337 の XVII 型コラーゲン細胞外断片に対する特異的な反応には、切断によって新たに露出した N 末端のアミノ酸残基は関与していないことを示している。

この結果を受けて、私は NC16A ドメイン中の N 末端側や C 末端側のアミノ酸配列をさらに欠いた大腸菌由来の組替えタンパク質を使用した、より詳しい MAb-1337 のエピトープマッピング解析をおこなった (Fig. 3B)。その結果、MAb-1337 は Bo530+C15、Bo539+C15、BoNC16A-567、BoNC16A と反応した (Fig.3D)。Bo546+C15 は長時間露光した場合のみ、非常に弱くではあるが検出が確認された (データは示さない)。そこで、Bo530+C15、Bo546+C15、Bo558+C15 をそれぞれ含む大腸菌抽出液からの MAb-1337 を用いた免疫沈降をおこなった。その結果、MAb-1337 によって Bo530+C15 と Bo546+C15 は免疫沈降されたが、Bo558+C15 は免疫沈降されなかつた (Fig. 3E)。以上の結果は MAb-1337 が認識するエピトープの位置を NC16A ドメイン中にある C 末端側の 22 残基 (L546–E567) にまで限定することができた。したがって、切断依存的な構造変化が 22 残基の配列とその前後の近接する領域で生じていることがわかつた。

LAD 血清はプラスミン消化によって生じたヒト XVII 型コラーゲン全長タンパク質の部分分解産物と反応する

MAb-1337 を用いた実験結果に基づき、次に私は LAD 血清のエピトープの解析をおこなった。実験とその結果の解釈をできるだけ容易にするために、20 種の lamina-lucida 型の LAD 血清から、免疫ブロットにおいて、120 kDa 断片と強くかつ特異的に反応するものを選抜した。まず、DJM-1 細胞の濃縮した培養上清を用いた免疫ブロット法により、120 kDa のヒト XVII 型コラーゲン細胞外断片/LAD-1 と強く反応するものを 7 種選んだ (Fig. 4A)。次にこれら選抜した LAD 血清の 120 kDa 細胞外断片と全長 XVII 型コラーゲンタンパク質に対

する反応性を免疫ブロット法で調べた (Fig. 4B)。NC16A ドメインに対するポリクローナル抗体 (PAb-NC16A) と XVII 型コラーゲンの C 末端部分を認識するモノクローナル抗体 C34 (MAb-C34) のいずれもが、120 kDa 断片よりも全長 XVII 型コラーゲンとやや強く反応するようにそれぞれのアプライ量を調整した。その結果、7 種のうち 6 種 (LAD P1, P4, P10, P11, P14, P20) の LAD 患者血清は 120 kDa 断片のみと反応し全長タンパク質とは反応を示さないことがわかった。一方、LAD P8 は 180 kDa の全長タンパク質ともごく弱く反応した (Fig. 4B 矢じり)。この理由から、LAD P8 はこのあとの実験には使用しないこととした。

選抜した 6 種の LAD 血清とプラスミン処理によるヒト XVII 型コラーゲン全長タンパク質の部分分解産物との反応を調べた。PAb-NC16A による免疫ブロット反応によりプラスミン未処理の 180 kDa ポリペプチドが約 160–97 kDa の断片へと分解されているのがわかった (Fig. 4C NC16A)。MAb-C34 は、0.02 unit/ml のプラスミンを添加し 4 時間反応させた試料では、180 kDa に加え 160 と 130 kDa の断片を検出し、0.1 unit/ml のプラスミンで 4 時間反応させた場合は 120 kDa の断片をごく弱く検出した。MAb-C34 が 97 kDa 断片と反応しなかったのは、このモノクローナル抗体が XVII 型コラーゲンの C 末端部分を認識しているためである。LAD P10 は 0.1 unit/ml のプラスミンで 4 時間または 12 時間は処理した試料の 97 kDa 断片とのみ反応し、LAD P4 は 0.1 unit/ml のプラスミン添加し 4 時間処理した試料の 120 kDa と 97 kDa の断片、および 12 時間処理した試料の 97 kDa 断片とのみ反応した。これら以外の 4 種の LAD 血清も全て 180 kDa の全長タンパク質のプラスミン処理によって生じた 97 kDa 断片と反応した (Fig. 4D)。これらの結果は、MAb-1337 と同じく LAD 血清が切断によって直接的に露出または形成されるエピトープを認識することを示している。

LAD 血清のヒト、ウシおよびウシ-ヒトキメラ XVII 型コラーゲン由来の 120 kDa 断片への反応性

選抜した 6 種の LAD 患者血清を用いてウシ XVII 型コラーゲン由来の 120 kDa 断片との交差性を調べた。ヒト 120 kDa 断片は DJM-1 細胞から、ウシ 120 kDa 断片はウシ XVII 型コラーゲンを安定発現する HeLa 細胞の培養上清からそれぞれ調製した。LAD P14 だけがヒトの 120 kDa 断片とのみ反応し、それ以

外の血清はすべてヒトとウシの切断された細胞外部分の両方と反応した (Fig. 5A)。

LAD P14 のヒトタンパク質に対する特異的な反応性を利用して、LAD P14 の主要な抗原領域を異なる 3 種のウシ-ヒトのキメラ XVII 型コラーゲン組換えタンパク質 (BBH、HHB、HBB) を用いて解析した (Fig. 5B)。LAD P14 は HHB の 120 kDa 断片とは強く反応し、HBB 断片とは弱く反応したが、BBH 断片とは全く反応しなかった。これらの結果は、LAD P14 が認識する断片特異的エピトープにはヒト C15 ドメイン中のアミノ酸残基が含まれていることを示している。

LAD 血清は NC16A ドメインと C15 ドメインの両方を含む組換えタンパク質とより選択的に反応する

Mab-1337 が NC16A ドメイン中の配列から形成されるエピトープを認識する一方で、LAD P14 の断片特異的反応には C15 ドメイン中のアミノ酸残基が重要であることが明らかとなった。そこで、LAD 血清が認識するエピトープの位置を決定するため、私は大腸菌を用いてヒト XVII 型コラーゲン組換えタンパク質を作製し、免疫ブロット実験をおこなった (Fig. 6A and B)。作製した大腸菌由来の組換えタンパク質は次の 3 種類である。HuNC16A+C15 は NC16A ドメイン (489-566 番) と C15 ドメインの一部 (567-718)、HuNC16A は NC16A ドメイン (489-566 番)、HuC15 は C15 ドメインの一部 (567-718 番) をそれぞれ含む。

6 種の LAD 血清のうち 5 種 (LAD P4、P10、P11、P14、P20) は HuNC16A+C15 と明瞭な反応性を示したが、LAD P1 のみは反応が認められなかった。HuNC16A に対しては 3 種の LAD 血清 (LAD P1、P14、P20) が弱く反応し、LAD P4、P10、P11 は反応しなかった。HuC15 に対しては LAD P20 が比較的是っきりとした反応性を示し、P4 と P11 は非常に弱く反応していた。一方 P10 と P14 は HuC15 とは反応しなかった。

これらの結果は LAD P4、P10、P11、P14 の主要なエピトープが NC16A ドメインと C15 ドメインの境界領域に位置していることを示している。一方、LAD P20 は HuNC16A+C15 と HuC15 とはほぼ同程度の反応性を示したが、HuNC16A とは反応しなかった。このことは LAD P20 の主要な抗原領域が C15 ドメイン中に存在していることを示している。LAD P1 は、より長時間の露出

後に HuNC16A+C15 と HuNC16A に対してかすかな反応性を示したが C15 とは反応が確認されなかった。このことから LAD P1 のエピトープが NC16A ドメイン中に存在している可能性が考えられた。

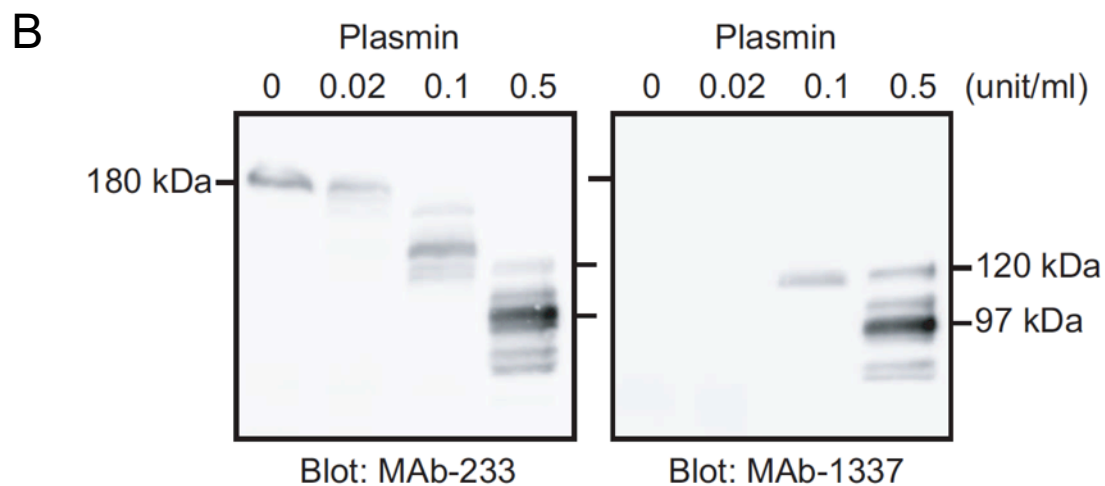
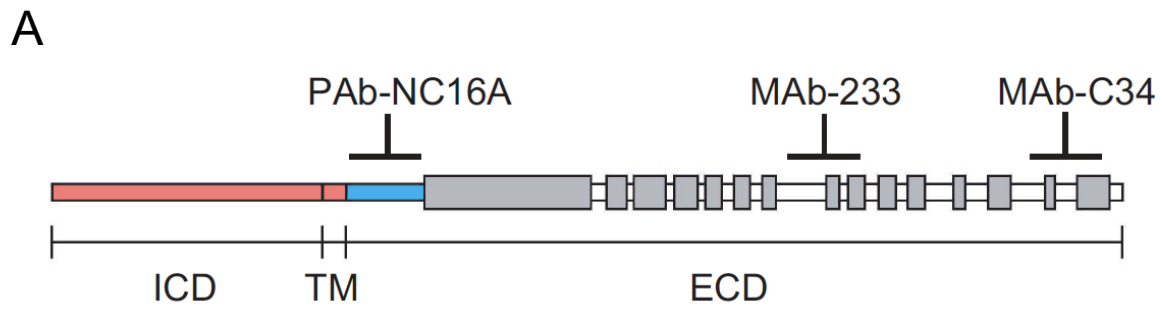


Fig. 1. ウシXVII型コラーゲン全長タンパク質のプラスミンによる限定分解産物をMAb-1337は認識した

A) 本研究で使用した抗体 (PAb-NC16A、MAb-233、MAb-C34) の抗原部位を示したヒトXVII型コラーゲンの模式図。

B) 外来性のウシXVII型コラーゲンを発現するHeLa細胞の細胞膜画分を図に示した濃度のプラスミンにより37°C、4時間、限定分解した。MAb-233は全長分子と分解産物の両方と反応したが、MAb-1337は120 kDaから80 kDaの範囲の分解産物とのみ反応した。

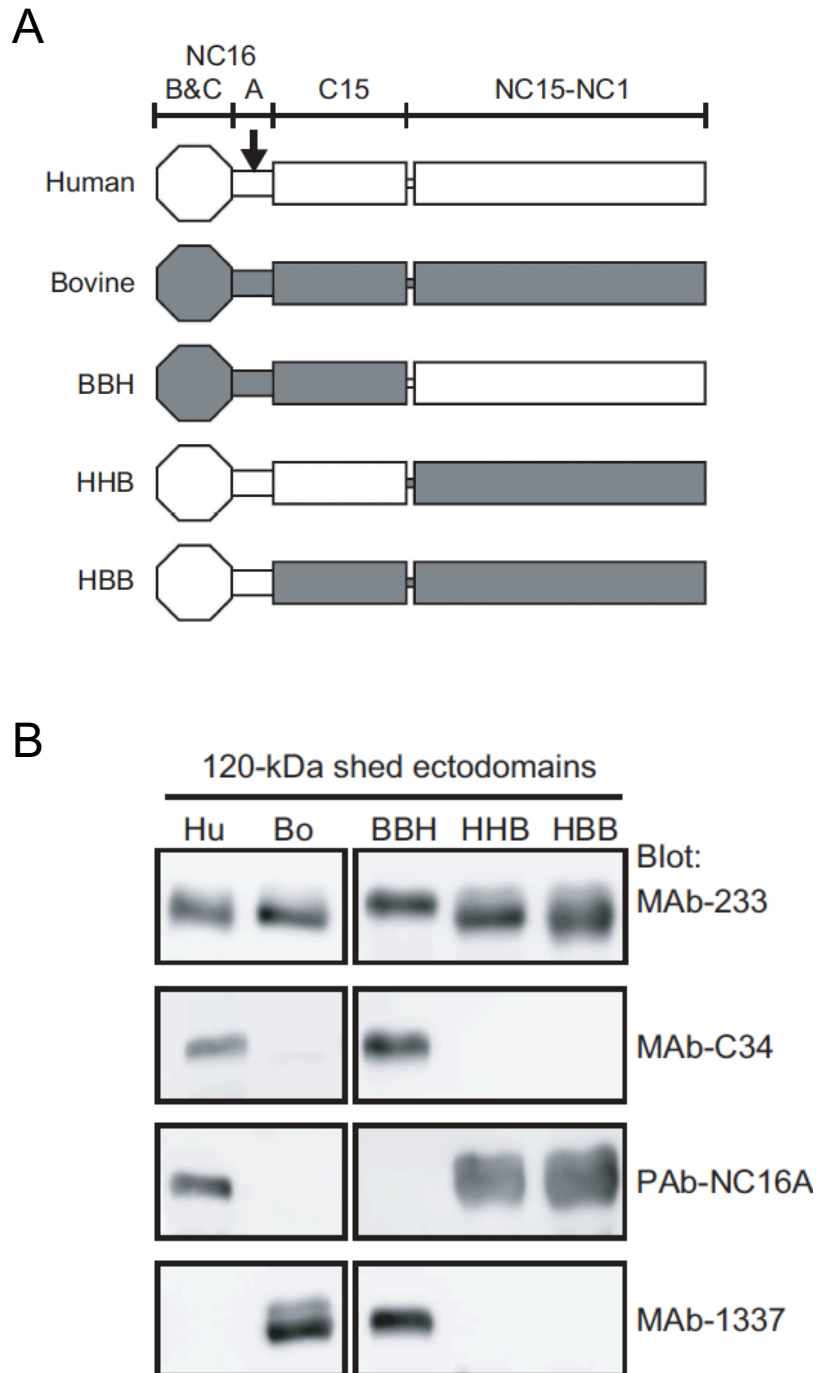


Fig. 2. MAb-1337の認識するエピトープにはウシNC16Aドメイン中のアミノ酸残基が含まれる
 A) 作製したウシ-ヒトのキメラXVII型コラーゲンの模式図。全長分子のNC16Aドメイン(矢印)においてプロテアーゼによる切断が起こり、細胞外部分が放出される。
 B) HeLa細胞の培養上清濃縮画分中に含まれるウシ-ヒトキメラXVII型コラーゲンBBH、HHB、HBBの120 kDa断片をMAb-233、MAb-C34、PAb-NC16A、MAb-1337で免疫ブロットした。ヒトXVII型コラーゲンとウシXVII型コラーゲンの120 kDa断片は、それぞれDJM-1細胞とHeLa細胞の培養上清から調製した。MAb-1337はHHB、HBBの断片とは反応せず、BBHの断片とのみ反応した。

A

Human NC16A AEEVRKLRVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGLHSDSQEELWMFVRKLLMMEQENGLR
 Bovine NC16A AEEVRKLRVEELEKMR-GRLSYNEKMERSSQDSVQGVAPRLGEGLGKSELDDYNLEDVWQFMKVRLMTEQENGLR

L524 (LAD-1)
 V530 E539 L546 E567

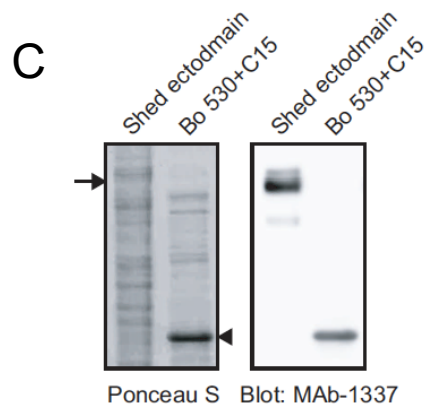
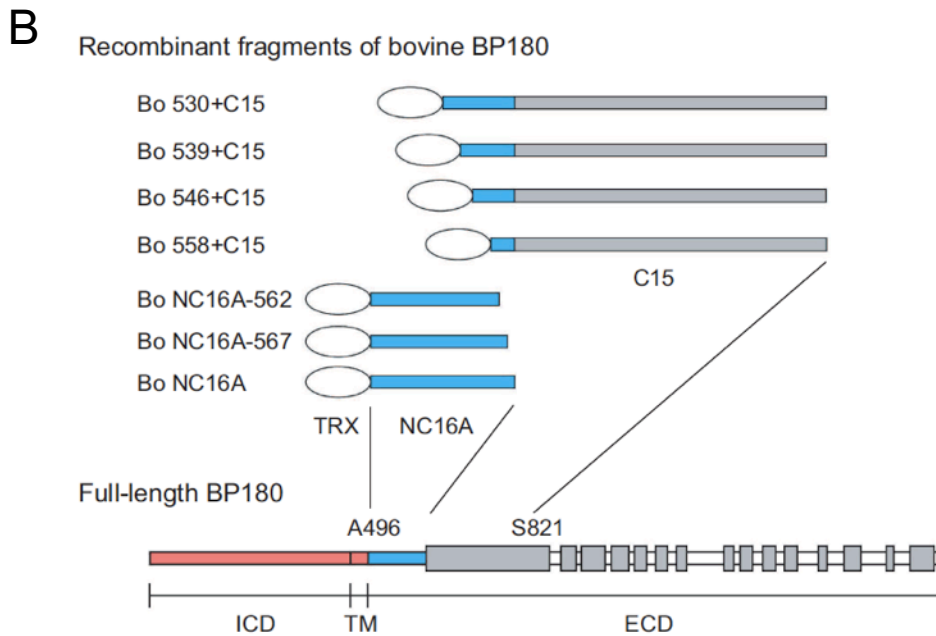
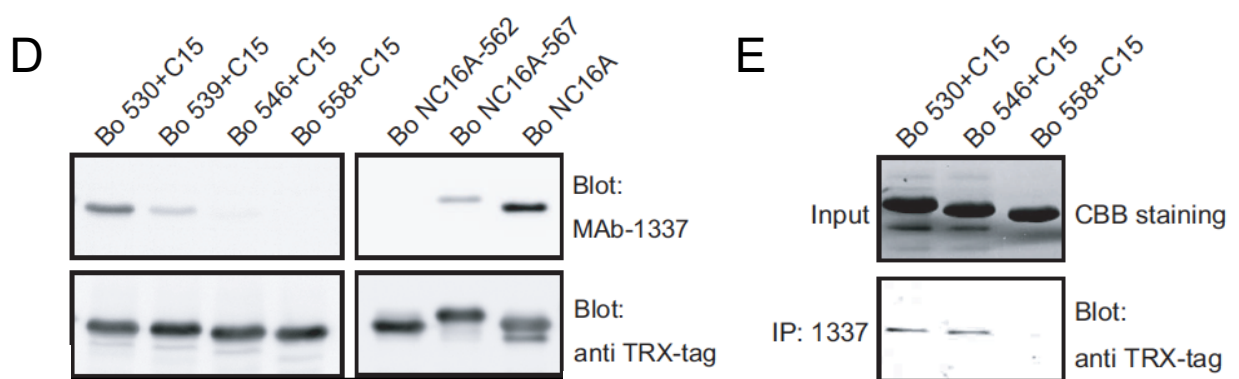


Fig. 3. MAb-1337のエピトープはNC16AドメインのC端側に位置するL546からE567の範囲のアミノ酸配列から形成される

A) ヒトXVII型コラーゲンとウシXVII型コラーゲンのNC16Aドメインのアミノ酸配列の比較。L524はヒトXVII型コラーゲン120 kDa細胞外断片(LAD-1)のN末端を示している。V530、E539、L546は作製した大腸菌組換えタンパク質(Bo530+C15、Bo539+C15、Bo546+C15)に含まれるウシXVII型コラーゲンアミノ酸配列のN末端を示し、E567(BoNC16A+567)はC末端を示している。

B) 作製したウシXVII型コラーゲンのNC16AまたはNC16AとC15を含む、大腸菌組換えタンパク質の模式図。N末端側にThioredoxin (TRX) タグが付加されている。

C) HeLa細胞から調製したウシXVII型コラーゲンの120 kDa断片と大腸菌組換えタンパク質Bo530+C15に対するMAb-1337の反応性の違いを免疫ブロットによって比較した。抗体反応前のPVDF膜をポンソー染色している。ポンソー染色では、大腸菌組み換えタンパク質のバンド(矢尻)は濃く明瞭に検出されるが、培養上清濃縮画分中の120 kDa断片に相当するバンド(矢印)はほとんど判別することができない。大腸菌組換えタンパク質Bo530+C15の分子量は約50 kDa。



D) 各種組換え融合タンパク質に対するMAb-1337の反応性を免疫ブロットにより調べた。TRXタグに対するモノクローナル抗体MAb-TRXによるブロットの結果は、ほぼ等量の組換えタンパク質が転写されていることを示している。BoNC16AがBoNC16A-567よりも速い移動度を示しているのは、おそらくC末端に付加した6×Hisタグが分解しているためではないかと考えている。

E) MAb-1337はBo530+C15とBo546+C15は免疫沈降できたが、Bo558+C15は免疫沈降しなかった。

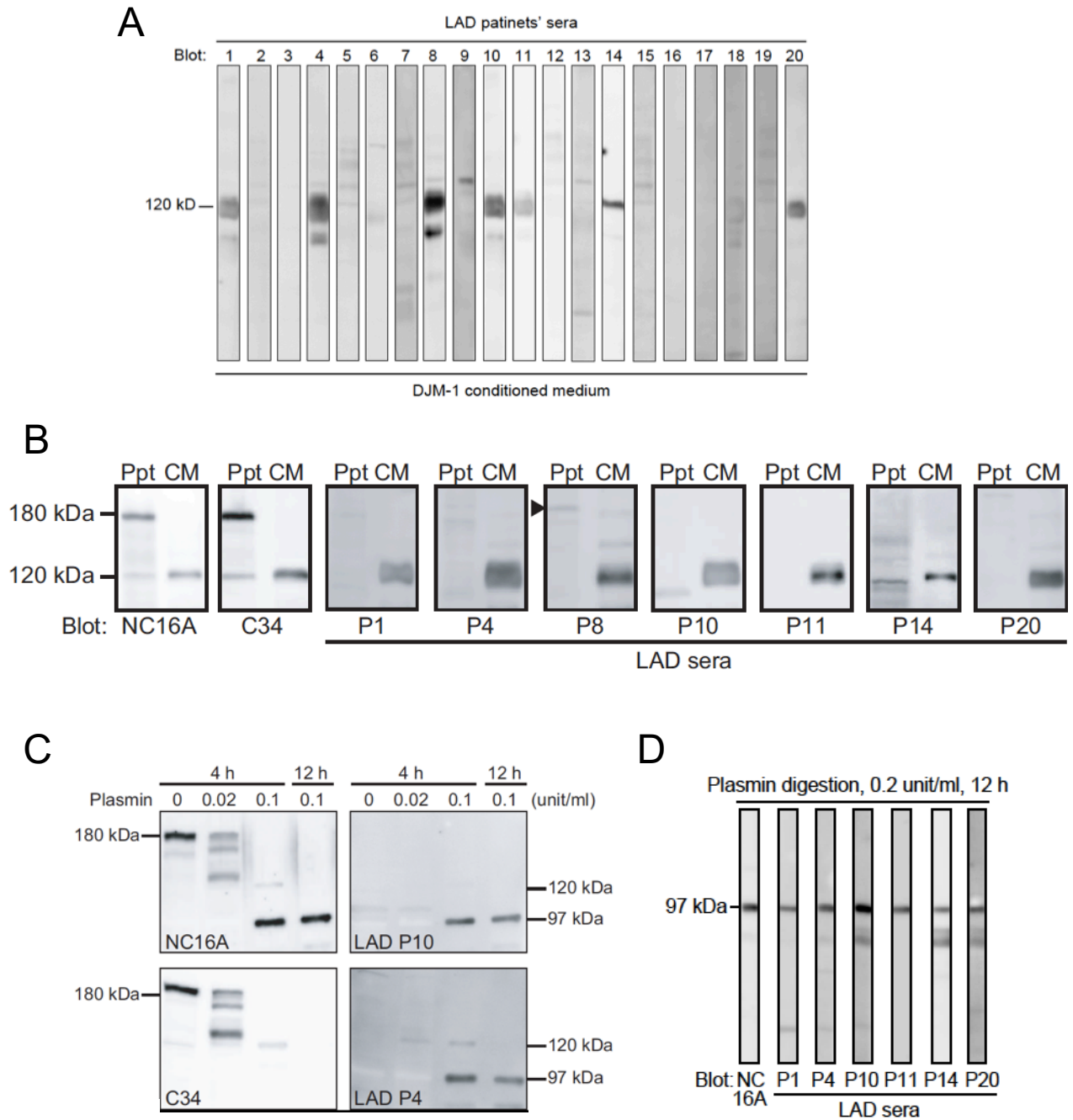


Fig. 4. LAD血清はヒトXVII型コラーゲン全長タンパク質のプラスミン分解産物と反応した

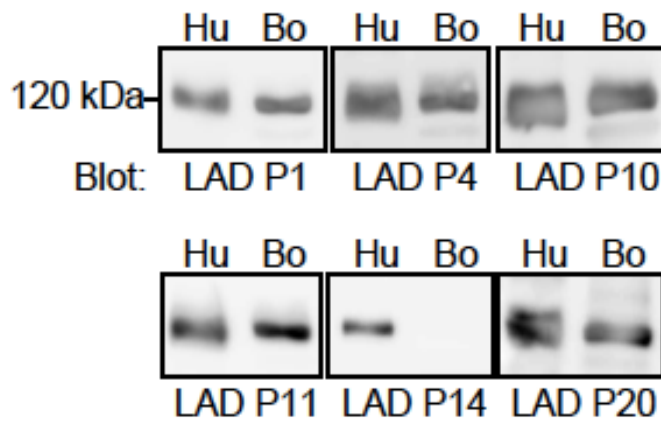
A) DJM-1細胞の培養上清濃縮画分中の120 kDa断片と20種のLAD血清の反応性を調べた。

B) 選抜した6種のLAD血清のXVII型コラーゲン全長ポリペプチドと120 kDa細胞外断片に対する反応性を免疫ブロット法により調べた。180 kDa全長タンパク質はDJM-1細胞のTriton-X不溶性沈殿画分(Ppt)に含まれ、120 kDa断片は培養上清濃縮画分(CM)に含まれる。P8以外の血清は、細胞外断片とのみ反応した。

C) ヒトXVII型コラーゲン全長タンパク質のプラスミン分解産物に対するLAD血清P4とP10の反応性を調べた。DJM-1細胞から調製した細胞膜画分を図に示した濃度のプラスミンで37°C、4時間または12時間限定分解し、PAb-NC16A、MAb-C34、LAD P4、LAD P10で免疫ブロットした。LAD P4とLAD P10は120 kDaと97 kDaの断片とのみ反応した。

D) LAD P1、LAD P11、LAD P14、LAD P20は、ヒトXVII型コラーゲン全長タンパク質のプラスミン限定分解によって生じた97 kDa断片と反応した。

A



B

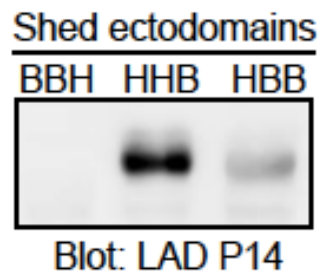
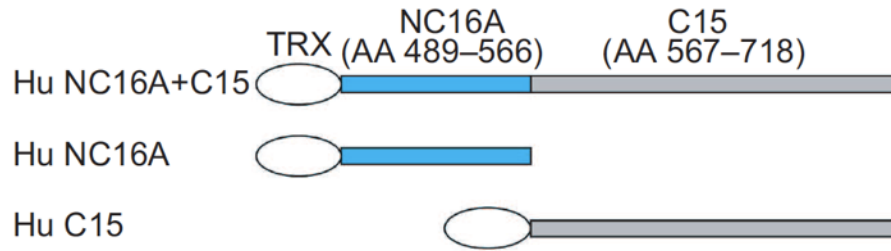


Fig. 5. ウシXVII型コラーゲンの細胞外断片に対するLAD血清の交差性

A) ヒトまたはウシXVII型コラーゲンの細胞外断片に対する選出した6例のLAD血清の交差性を免疫ブロットによって調べた。LAD P14のみがウシ120 kDa断片と反応しなかった。

B) 3種のウシの-ヒトキメラXVII型コラーゲン (BBH、HHB、HBB) の120 kDa断片を培養上清から調整し、LAD P14との反応性を免疫ブロットで調べた。

A



B

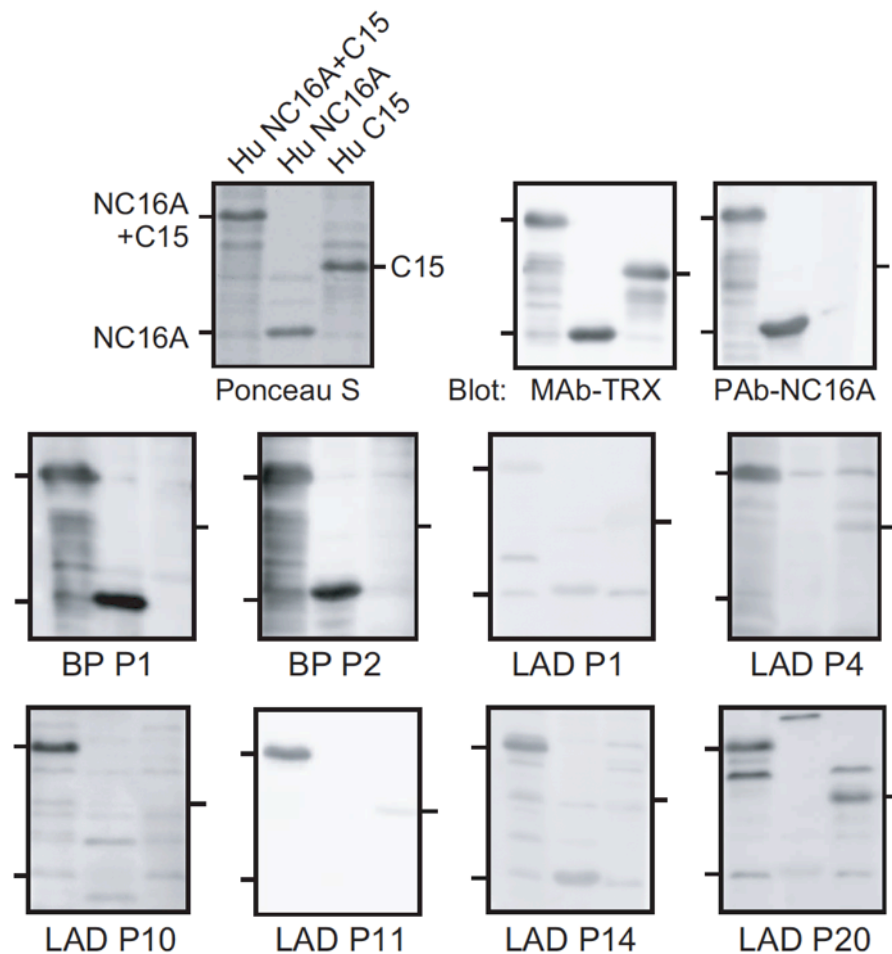


Fig. 6. LAD血清は主にNC16AとC15ドメインの境界領域を主要な抗原部位としていた

A) 免疫ブロット実験に用いたヒトNC16AドメインとC15ドメインを含む組換えタンパク質 (HuNC16A+C15)、ヒトNC16Aドメインのみを含む組換えタンパク質 (HuNC16A)、C15ドメインのみを含む組換えタンパク質 (HuC15) の模式図。N末端にはTRXタグが付加されている。

B) 大腸菌組換えタンパク質 (HuNC16A+C15、HuNC16A、HuC15) に対するLAD血清の反応性を免疫ブロットで調べた。MAb-TRXはTRXタグに対する抗体。PAb-NC16AはHuNC16A+C15とHuNC16Aに対して陽性反応を示した。類天疱瘡患者血清であるBP P1とBP P2も、HuNC16A+C15とHuNC16Aに対して陽性反応を示す一方で、HuC15とは反応しなかった。

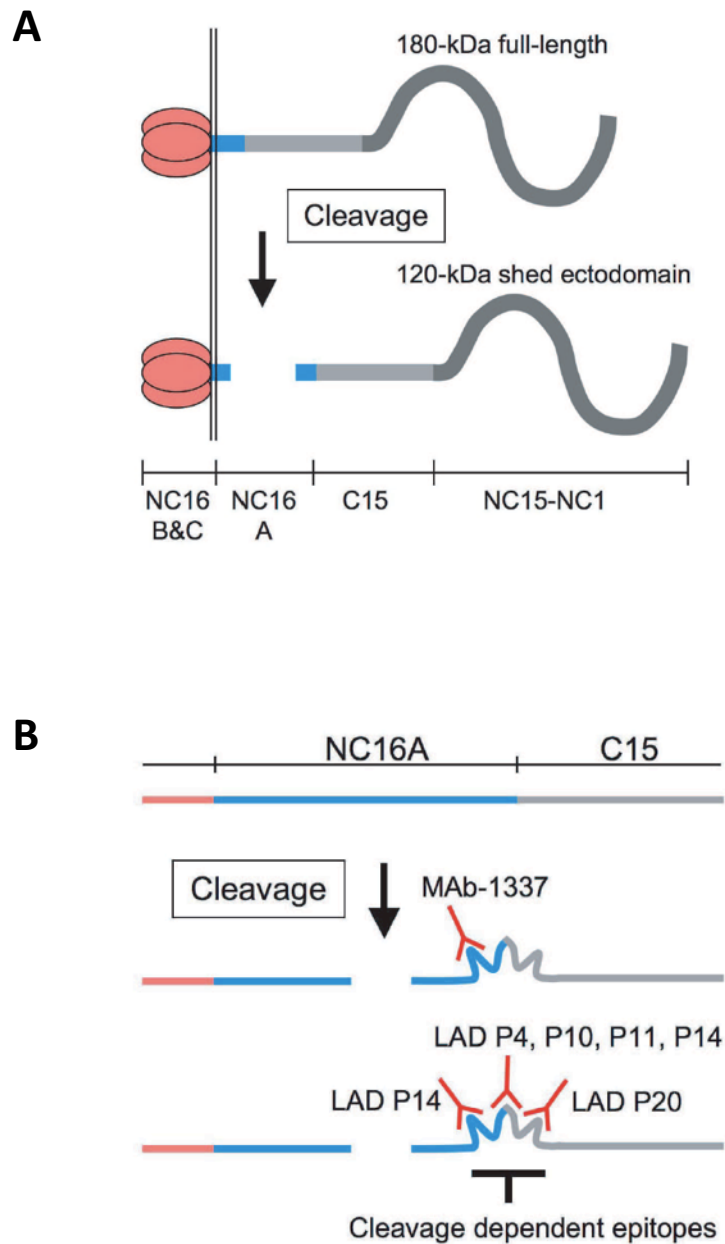


Fig. 7. XVII型コラーゲン上に形成される切断依存的なエピトープの模式図

A) XVII型コラーゲンは膜近傍の非コラーゲン領域であるNC16Aドメインでタンパク質分解的切断を受け、120 kDaの細胞外断片を生じる。

B) NC16Aドメイン中で起こる切断により、細胞外断片上のNC16AドメインとC15ドメインの境界領域付近に切断依存的エピトープが形成される。MAb-1337は、細胞外断片のNC16Aドメイン中に形成されるエピトープを認識する。LAD P4、P10、P11、P14血清中の自己抗体の主要なエピトープは、XVII型コラーゲンのNC16AドメインとC15ドメインの境界領域に存在する。LAD P20の認識する主要なエピトープはC15ドメインに位置する。LAD P14にはNC16Aドメイン中のアミノ酸残基からのみ形成されるエピトープを認識する自己抗体も含まれている。

考察

LAD 血清と MAb-1337 が XVII 型コラーゲンの切断された細胞外部分とのみ特異的に反応することの説明としては次に挙げる三つの仮説が考えられた。一つ目は、XVII 型コラーゲンの細胞外部分が細胞表面で切断を受けたのちに何らかの翻訳後修飾を受け、LAD 血清や MAb-1337 はこの切断された細胞外部分の翻訳後修飾を含むエピトープを認識している可能性である[22, 23]。二つ目としては、切断によって新たに生じる N 末端のアミノ酸残基を含む新規エピトープを LAD 抗体や MAb-1337 が認識している可能性が考えられる。最近、切断された細胞外部分 (LAD-1) の N 末端の 9 残基と一致する合成ペプチドを免疫することで、120 kDa 断片特異的なポリクローナル抗体が得られることも報告されている[10]。三つ目として、NC16A ドメインでの切断依存的に細胞外断片の構造変化がおり、その結果、形成または露出されたエピトープを LAD 自己抗体と MAb-1337 が標的としている可能性である。

ヒトとウシ XVII 型コラーゲンのプラスミンによる部分消化実験の結果から、培養細胞の細胞膜面分中の全長タンパク質の分解断片に対しても、LAD 血清と MAb-1337 は特異的に反応することがわかった。このことから LAD 自己抗体や MAb-1337 が認識するエピトープは断片特異的に認められる何らかの翻訳後修飾を含むものではなく、NC16A ドメイン内で細胞外部分が切断されることによって直接的に形成されるエピトープであることがわかった。

また、ヒト XVII 型コラーゲンの断片とのみ反応する LAD P14 血清は、HBB キメラの 120 kDa 断片と強く反応する一方で、HBB キメラの断片とはごく弱くしか反応しなかった。これら 2 種類のキメラの断片のどちらも N 末端のアミノ酸残基とその近接する配列は、ヒトの NC16A ドメインに由来することから同一であると考えられる。このことから、LAD P14 血清の認識する主要な断片特異的なエピトープは、切断によって新たに生じた N 末端のアミノ酸残基を含まないものと考えられる。さらに、MAb-1337 は N 末端に TRX タグが付加された大腸菌の組換えタンパク質とも反応しており、新規の N 末端アミノ酸残基をエピトープに含まないのは明らかである。同様に、非常に高い断片特異的反応性を示す LAD 血清の多くも、N 末端に TRX タグが付加された大腸菌の組換えタンパク質と陽性反応を示したことから、新規の N 末端アミノ酸残基をエピトープに含まないと考えられる。

これらの結果から、私は MAb-1337 と LAD 自己抗体の多くは、NC16A ドメ

イン中に起こる切断によって、切断面から離れた領域に引き起こされる構造変化の結果として形成または露出するエピトープを認識しているものと結論づけた。しかしながら、LAD 血清中の自己抗体はポリクローナルであることから、翻訳後修飾を含むエピトープや切断によって生じる新規 N 末端アミノ酸残基を含むエピトープを標的とする自己抗体が一部含まれている可能性も完全には排除できない。

私は当初、MAb-1337 が、N 末端側に TRX タグが付加された、つまり切断されていない大腸菌由来の XVII 型コラーゲン組換えタンパク質と陽性反応を示すことを予期していなかった。なぜならば、私たちは NC16A ドメイン中での切断が新規エピトープの形成に不可欠であると考えていたからである。しかし、免疫プロットの結果から、実際に MAb-1337 はいくつかの切断されていない大腸菌組換えタンパク質と反応し、MAb-1337 の抗原認識にタンパク質切断は必要条件ではないことが明らかとなった。ただし、この反応には、ほ乳類細胞由来の 120 kDa 断片に比べて、より多量の大腸菌組換えタンパク質が必要だった。このことから、PVDF 膜上に転写された大腸菌組換えタンパク質のうちのごく一部のみが MAb-1337 と反応するエピトープを形成する構造をとっており、その他のほとんどの組換えタンパク質では、そのようなエピトープは形成されていないものと考えられる。私は、全長 XVII 型コラーゲンの NC16A ドメイン中で起こる切断は、120 kDa の細胞部分断片に MAb-1337 の認識するエピトープをより効率よく形成させる役割を果たしているのではないかと考えている。

私は LAD 血清が大腸菌由来の組換えタンパク質と反応したのも、MAb-1337 の場合と同様の理由によると考えている。おそらく、LAD 自己抗体が認識する切断依存的エピトープは、転写された大腸菌組換えタンパク質 HuNC16A+C15 のごく一部でも形成されていて、本研究で主に使用した選抜された LAD 血清は、このようなエピトープと特異的に反応できたと考えられる。

図 7 は MAb-1337 と 5 種の LAD 血清のエピトープの位置を模式的に示したものである。表皮基底細胞において、XVII 型コラーゲンはその細胞外部分のコラーゲンドメインで 3 重らせん構造をとっており、一部の分子は膜近傍の NC16A ドメイン中での切断により、細胞外部分を遊離させる (Fig. 7A)。この切断後、MAb-1337 のエピトープは NC16A ドメインの C 末端側に位置する L546-E567 の範囲内において形成される。また、この切断は LAD 自己抗体によって認識される複数の切断依存的エピトープを NC16A ドメインと C15 ドメ

インの境界を中心とした領域に形成させる。特に LAD P4、P10、P11、P14 の主要なエピトープの形成には NC16A ドメインと C15 ドメインのそれぞれに含まれるアミノ酸残基の存在を必要とし、一方、LAD P20 のエピトープは C15 ドメイン中のアミノ酸残基からのみ形成されるものと考えられる (Fig. 7B)。

LAD P14 は今回使用した 6 種の LAD 血清のうち唯一、ウシとは交差しない LAD 血清である。そのため HeLa 細胞由来のウシ-ヒトキメラタンパク質を用いた実験をおこなうことができた。LAD P14 は、HBB キメラの断片よりも HHB キメラの断片とより強く反応し、ヒト C15 ドメイン中のアミノ酸残基が抗原認識において重要であることを示した。LAD P14 が反応する主要なエピトープはヒトとウシとの間で保存されていない C15 ドメイン中のアミノ酸残基を含んでいると考えられる。ところが、LAD P14 は大腸菌に発現させた組換えタンパク質 HuC15 とは反応しなかった。これらの結果は LAD P14 血清中の自己抗体の多くが認識するエピトープは NC16A ドメインと C15 ドメインの両方のアミノ酸残基から形成されると考えることで説明できる。実際、LAD P14 は大腸菌組換えタンパク質の HuNC16A+C15 とは比較的強い反応性を示した。LAD P14 がキメラ HBB 断片や大腸菌組換えタンパク質 HuNC16A に対して示した比較的弱い反応性は、LAD P14 に含まれる自己抗体の一部には、NC16A ドメイン中の配列からのみ構成されるエピトープを認識しているものが存在することを示唆している。

6 種の LAD 血清のうち 5 種 (LAD P1、P4、P10、P11、P20) は、ウシ XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片とヒト XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片のどちらとも良好な反応性を示した。一方、MAb-1337 は、ウシ XVII 型コラーゲンとのみ反応し、ヒトとは反応しない。MAb-1337 のエピトープを含む NC16A ドメインは、異なる種間の XVII 型コラーゲンのアミノ酸配列において、もっとも保存されていない領域の一つである [24] (Fig. 3A)。私達の研究室で作製した PAb-NC16A もヒト 120 kDa 断片とのみ反応し、ウシ断片とはまったく交差反応を示さなかった。それに対して、コラーゲン繰り返し配列からなる C15 ドメインは、ヒトとウシの間で 90% の同一性を示すよく保存された領域である。さらに NC16A ドメインのなかでも C15 ドメインと接続する 10 アミノ酸残基はウシとヒトでは完全に同一となっている (Fig. 3A)。LAD エピトープを含む領域に高度に保存されたアミノ酸配列が存在することは、LAD 血清がウシ XVII 型コラーゲンの 120 kDa 細胞外断片と高い交差性を示したこととよく一致する。

本研究の実験結果は、少なくとも 6 種の LAD 血清の内の 4 種 (LAD P4、P10、P11、P14) の主要な切断存的エピトープは、NC16A ドメインと C15 ドメインの境界領域に存在することを明らかにした。しかしながら、MAb-1337 の認識するような NC16A ドメイン中のアミノ酸残基のみから形成される切断依存的エピトープ[17, 18]や LAD P20 が認識するような C15 ドメイン中のアミノ酸残基だけからなる切断依存的エピトープ[14] (Fig. 6B) も存在するものと考えられる。

結論として、XVII 型コラーゲンの NC16A ドメイン中におこる切断により NC16A ドメインの C 端部分と C15 ドメインの N 端部分を含む境界領域に構造変化がおこり、その結果、MAb-1337 と LAD 血清が認識する断片特異的エピトープが新たに形成されることがわかった。NC16A ドメインは XVII 型コラーゲンにおいて最も自己抗原性の高い部位として知られてきた[3, 15, 16, 24]。しかし、なぜ NC16A ドメインが自己抗原性の高い部位となっているのかはわかっていない。今回の研究結果は、NC16A ドメイン中での切断によって NC16A ドメインと C15 ドメインの境界領域に新規エピトープが形成されることを示した。このような新規エピトープの形成が、遺伝的要因や環境的要因とともに XVII 型コラーゲンを標的とする自己免疫性表皮水疱症の発症要因の一つとなっている可能性も考えられる。実際に、LAD だけでなく水疱性類天疱瘡 (BP) 患者血清にも断片特異的な反応性を示す自己抗体が含まれることも報告されている[21]。

類天疱瘡など XVII 型コラーゲンとの自己免疫反応が疑われる場合の診断方法として、類天疱瘡の主要な抗原部位である NC16A ドメインを含む組換えタンパク質を用いた ELISA や免疫ブロットがある[17, 25]。しかし、今回の実験結果から、LAD 血清は、NC16A と C15 ドメインの両方を含む大腸菌組換えタンパク質と最も強く反応することがわかった。将来的には、表皮水疱症の診断には、NC16A ドメインだけでなく、さらに C15 ドメインの一部を付加したような基質を用いた ELISA 法や免疫ブロットが行われることが望ましいだろう。また、今後の病理学的解析に対する展望としては、今回同定した LAD 血清の多くが反応する NC16A ドメインと C15 ドメインの境界領域のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドを作成し、マウスに免疫することで自己抗体産生の惹起が可能なのかどうかを検証することがあげられる。また合成ペプチドをウサギに免疫して得た抗体をマウスに注入することで表皮疾患を再現できるのかを確かめるこ

とも切断依存的エピトープの病原性を証明する上で重要であると考えている。

Part II

血清添加刺激による I 型 HD 解体時の XVII 型コラーゲンの観察

要旨

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。HD は比較的安定な構造と考えられるが、表皮基底細胞の分裂時や創傷治癒時の細胞遊走の際には HD 構造は解体されなければならない。私は、XVII 型コラーゲンの細胞外部分が切断されることで、XVII 型コラーゲンがリガンドと解離し、HD の解体が促進されるのではないかと仮定し、以下の実験をおこなった。

無血清培地下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 $\beta 4$ 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 型コラーゲンの局在は細胞の基底面から細胞側面へと拡散していた。また、血清添加刺激により 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スポリンは、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、血清刺激により DJM-1 細胞に形成された HD が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。

序論

細胞-基質間接着構造である I 型ヘミデスモソーム (HD) は、細胞質ゾル側では中間径線維に裏打ちされ、細胞外では基底膜に結合することで、比較的大きな機械刺激にさらされる表皮など重層上皮組織に力学耐性を与えている[1, 26]。I 型 HD の主要な構成タンパク質にはプレクチン、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 、BP230、XVII 型コラーゲンがある (Fig. 8)。インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ と XVII 型コラーゲンは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。プレクチンと BP230 はプラキニンファミリーに属していて、膜貫通型タンパク質を中間径線維に結びつけるアンカータンパク質として機能している。

I 型 HD は界面活性剤に対する不溶性度も高く比較的安定な構造と考えられるが[19]、表皮基底細胞の分裂時や創傷治癒時には HD 構造は解体されなければならない[20, 26]。HD の解体の分子メカニズムについての研究は、HD の主要な膜貫通分子であるインテグリン $\beta 4$ サブユニットに注目しておこなわれてきた。これまでの研究により、プロテインキナーゼ C (PKC) 経路の活性化により、インテグリン $\beta 4$ サブユニットの細胞質部分がリン酸化され、プレクチンとの相互作用が弱まることで HD の形成と解体が制御され得ることがわかっている[26-30]。一方、HD のもう一つの主要膜貫通タンパク質である XVII 型コラーゲンの HD 解体時の制御については、ほとんど研究が行われていない。

XVII 型コラーゲンの細胞外部分は膜貫通型メタロプロテアーゼである ADAMs により、膜近傍の NC16A ドメイン中で切断されることがわかっている[7-9, 11]。しかし、これまでのところその生理学的意義はよくわかっていない。私は、XVII 型コラーゲンの細胞外部分が切断されることで、XVII 型コラーゲンがリガンドと解離し、HD の解体が促進されるのではないかと仮定し[20]、それを検証すべく本研究を計画した。私たちの研究室では、初代ケラチノサイト用無血清培地下でヒト扁平上皮癌由来の DJM-1 細胞を 10-14 日間長期培養することで成熟した HD を形成させる方法を確立している[31]。通常の培養細胞では BP230 は HD にはほとんど局在できず、また電子顕微鏡下で観察される電子密度の高い細胞質側 HD プラーク構造をつくることも稀であるが、この長期培養法を用いると表皮組織で観察される HD に近い構造が形成される。私は無血清培地下で長期培養した DJM-1 細胞を血清添加刺激することで、HD 解体を誘導し、その際の XVII 型コラーゲンの挙動に注目して解析をおこなった。

結果

血清添加刺激による DJM-1 細胞のヘミデスモソームの解体は PKC 阻害剤によって抑制された

DJM-1 細胞の長期培養で使用する初代ケラチノサイト用無血清培地では、ケラチノサイトの分化を抑えるためにカルシウム濃度も $60 \mu\text{M}$ と非常に低くなっている。まず、このような培地中で長期培養した DJM-1 細胞を血清添加刺激することで、I 型 HD が解体されるかどうかを調べた。その結果、血清添加 24 時間後には、インテグリン $\beta 4$ サブユニットに対する抗体染色によって観察される細胞底面の HD の斑点 (speckle) が、血清添加しなかった場合に比べて明らかに小さくなることがわかった (Fig. 9A)。また蛍光抗体写真の HD の斑点のサイズを Image J で測定したところ、100 ピクセル以上の大きなサイズの斑点が血清添加から 24 時間後には大きく減少していることが示された (Fig. 9B)。したがって無血清培地下の長期培養で形成された HD は血清添加によって解体が促進されることがわかった。

次に、観察された HD の解体が PKC 経路の活性化を介したもののなかをどうかを確かめるために、PKC 阻害剤であるスタウロスポリンを添加し、血清添加 24 時間後の HD 斑点をインテグリン $\beta 4$ サブユニットに対する蛍光抗体染色で観察した。その結果、スタウロスポリンの添加による HD 解体の劇的な抑制が観察された (Fig. 10A)。血清刺激時においては、100 ピクセル以上の大きなサイズの斑点が大きく減少するのに対して、スタウロスポリン添加すると、血清刺激をしない場合とほぼ同様に、検出される斑点の約 50% が 100 ピクセル以上の大きなサイズを維持していた (Fig. 10B)。

血清添加後に XVII 型コラーゲンは基底側から細胞膜側面へと局在が変化した

次に血清添加 24 時間後の XVII 型コラーゲンの局在を観察した (Fig. 11A)。抗体染色には XVII 型コラーゲンの細胞外部分の C 末端側を認識する C414 抗体を用いている。共焦点顕微鏡下にて観察したところ、X-Y 平面では、血清刺激をしない場合 (cont) や血清刺激とともにスタウロスポリンを添加した場合 (FBS+Sta) では、ほとんどの染色は基底側の斑点状のパターンとして観察された。一方、血清添加した場合 (FBS) は、基底側だけでなく細胞周囲に XVII 型コラーゲンの局在が観察された。このとき、XVII 型コラーゲンの局在を X-Z 平面で観察すると、血清刺激した細胞では、基底面の HD 斑点から細胞膜側面

へと主要な局在位置が変化しているのがわかった。免疫ブロットにおいても、コントロールと比較して血清刺激した細胞では、不溶性の XVII 型コラーゲンが減少する一方で、可溶性の XVII 型コラーゲンは増加していた (Fig. 11B)。この血清添加による可溶性 XVII 型コラーゲンの増加はスタウロスポリンを添加した場合には、抑制されていた。

血清添加刺激により XVII 型コラーゲンの細胞外部分の切断は促進されたが、切断の抑制はヘミデスモソームの解体に影響しなかった

XVII 型コラーゲンの細胞内部分を認識する 1A8C 抗体を用いて血清添加刺激 24 時間後の HD 斑点を観察したところ、細胞外部分を認識する C414 抗体でも検出された斑点状の染色パターンに加え、多くは細胞質ゾルに由来すると思われる拡散した染色が観察された (Fig. 12A)。そこで、1A8C 抗体を用いた免疫ブロットをおこなった (Fig. 12B)。その結果、血清刺激 24 時間後の細胞では、血清刺激をおこなわなかった細胞に比べて、約 2 倍量の 60 kDa のポリペプチドが検出された。これは、120 kDa の細胞外断片が切り離されたのちに、細胞に残された膜貫通部分と細胞質部分からなる N 末側の断片に相当する [16]。このことから血清添加刺激後に、XVII 型コラーゲンの細胞外部分の切断が促進されていることがわかった。

この XVII 型コラーゲンの切断が HD 解体に関わる現象なのかどうかを明らかにするため、血清刺激時に、ADAMs の活性を阻害するバチマスタットを添加し、HD 解体への影響を調べた (Fig. 13A-D)。まず、使用した 10 μ M のバチマスタットが、通常培養時の DJM-1 細胞の培養上清中の XVII 型コラーゲンの 120 kDa 断片の量を著しく減少させるのに十分な濃度であることを確かめた (Fig. 13A)。次に、HD を形成させた DJM-1 細胞を血清刺激し、10 μ M のバチマスタットが HD 解体を阻害するかどうかを細胞の蛍光抗体染色により調べた (Fig. 13B)。その結果、バチマスタットを添加しても、HD 解体はほとんど抑制されないことが観察された。このとき、全細胞抽出液の免疫ブロットでは、血清刺激 24 時間後に検出される 60 kDa 断片の量は、10 μ M バチマスタット添加により減少しており (Fig. 13C)、同様に、ELISA 法によって検出された培養上清中の XVII 型コラーゲン細胞外断片の量も血清のみを添加した場合に比べると、バチマスタット添加によって大きく減少することが確認された (Fig. 13D)。これらの結果は、XVII 型コラーゲンの細胞外部分の切断が抑制されても、HD

の解体にはほとんど影響していないことを示している。

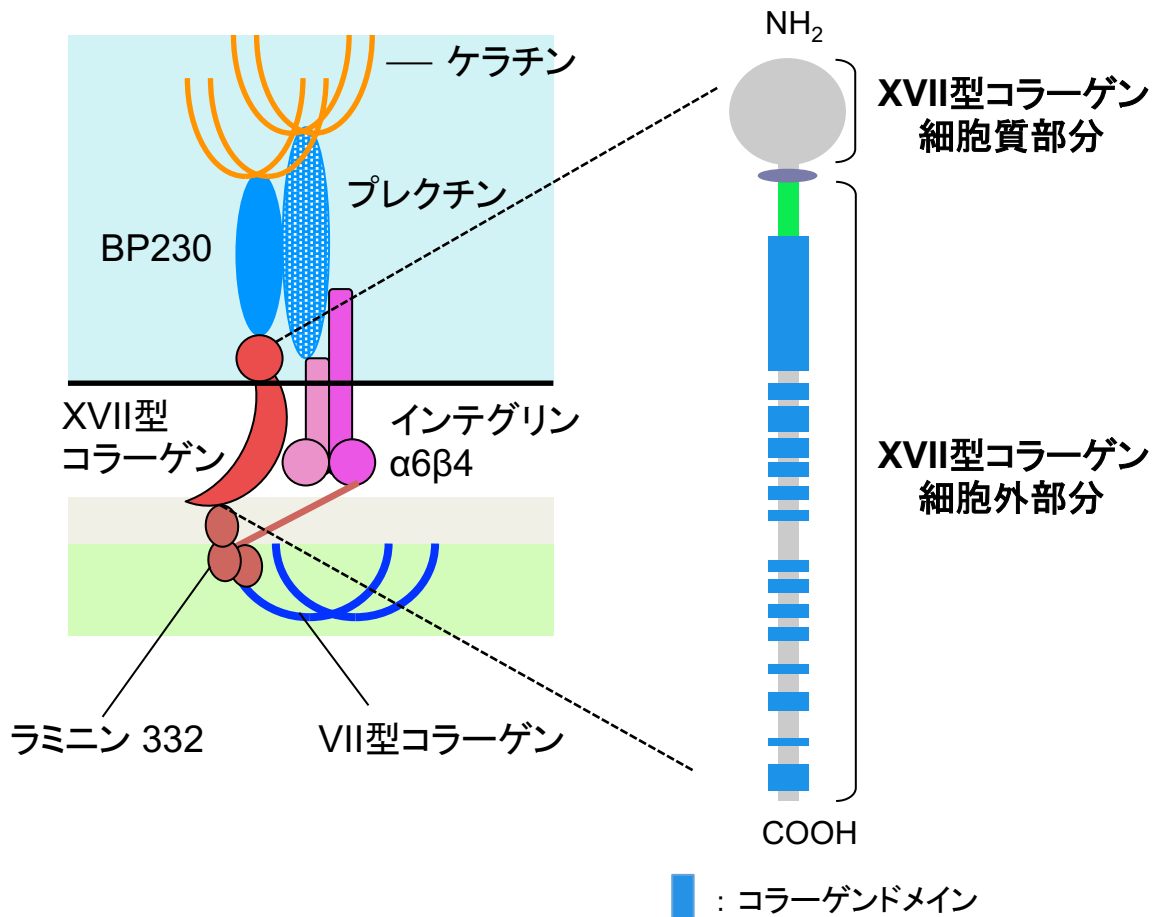


Fig. 8. I型ヘミデスモソーム(左)とXVII型コラーゲン(右)の模式図

I型ヘミデスモソーム(HD)はプレクチン、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 、BP230、XVII型コラーゲンから構成されている。プラーキンファミリーに属するプレクチンとBP230は細胞内でケラチンと結合している。ラミニン 332はインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ とXVII型コラーゲンの細胞外リガンドとして報告されている基底膜分子である。VII型コラーゲンもまた、HDの基底膜中のリガンドタンパク質であると考えられている。XVII型コラーゲンは、180 kDaのII型の膜貫通分子でN端側から順に、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞外部分を持つ。細胞外部分にはヒトの場合15個に分断されたコラーゲンドメインを持つ。

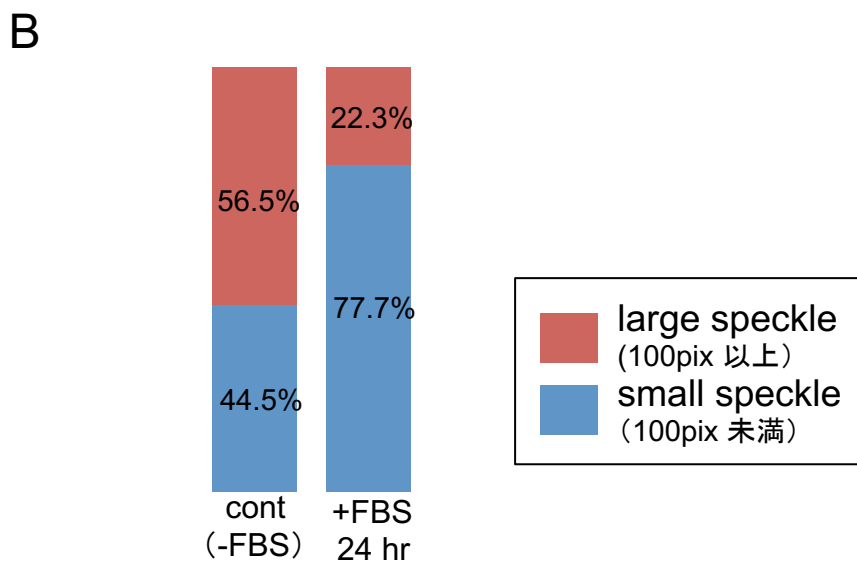
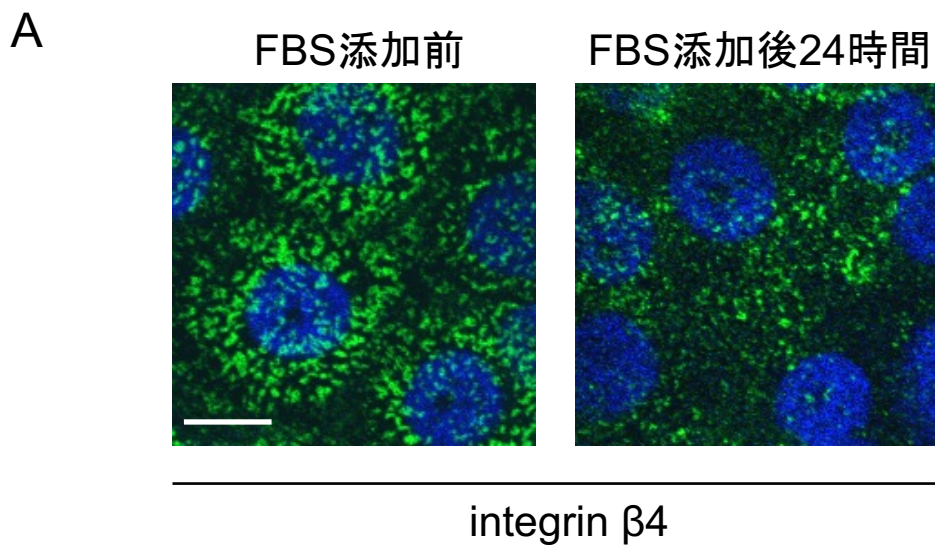
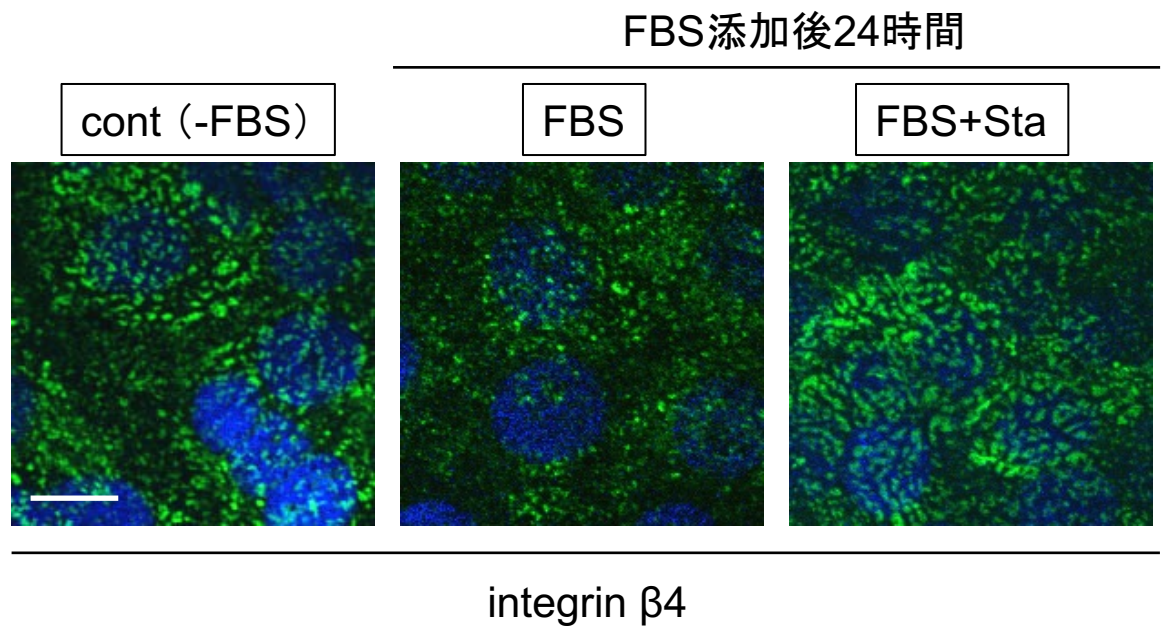


Fig. 9. I型ヘミデスモソーム(HD)は血清添加刺激によって解体された

A) 無血清培地下での培養によりDJM-1細胞に形成させたI型HDの血清添加刺激後の変化を、インテグリン β 4サブユニットに対する蛍光抗体染色法で観察した。血清刺激前の細胞では、HDを示す比較的大きな斑点が多数観察された。一方で血清を含む培地への交換から24時間後にはHDはより小さな斑点となっているのが観察された。スケールバー: 10 μ m

B) Aの写真のHDの斑点をImageJを用いて、100ピクセル以上の斑点 (large speckle) と100ピクセル以下の斑点 (small speckle) に区別してそれぞれ測定した。血清刺激24時間後では、100ピクセル以上の大きな斑点は著しく減少していた。

A



B

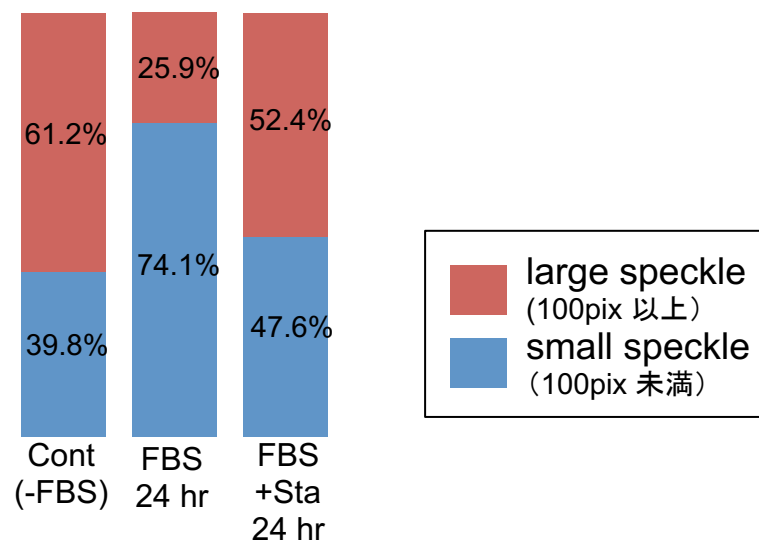


Fig. 10 血清添加刺激によるI型ヘミデスモソームの解体はPKC阻害剤によって抑制された

A) 無血清培地でI型HDを形成させたDJM-1細胞に血清刺激を加えた場合(FBS)と血清刺激と同時にPKC阻害剤であるスタウロスポリン(100 nM)を添加した場合(FBS+Sta)の24時間後をインテグリン β 4に対する蛍光抗体染色により比較、観察した。コントロールの細胞は無血清培地への交換から24時間後に観察した(cont)。スケールバー: 10 μ m

B) スタウロスポリンを加えた場合、血清刺激24時間後に観察される大きな斑点の減少が抑制されていた。

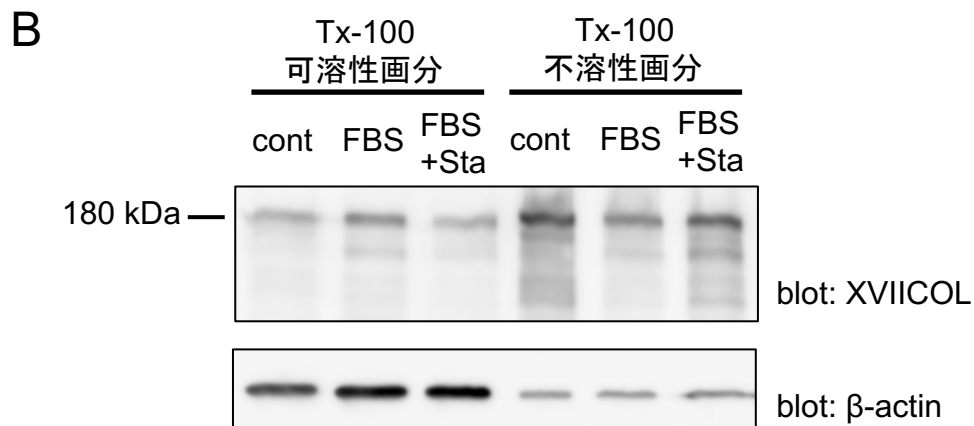
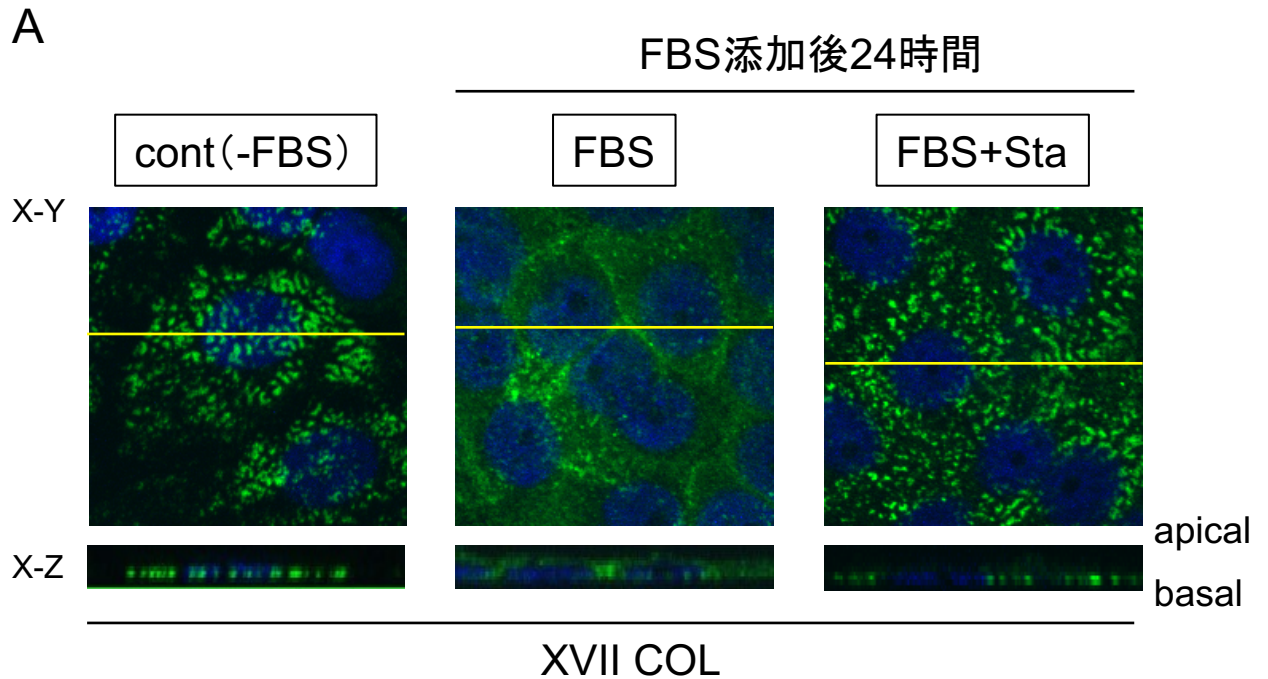


Fig. 11. 血清刺激後にXVII型コラーゲンは基底側から細胞側面へと局在が変化した

A) インテグリン β 4の場合と同様に、XVII型コラーゲンに対する蛍光抗体染色でも、血清添加刺激24時間後には、I型HDを示す大きな斑点状の染色(cont)が減少し、より小さな斑点が多数を占めるようになるのが観察され(FBS)、この変化はスタウロスポリンにより抑制された(FBS+Sta)。一方、インテグリン β 4とは異なる点として、血清刺激後には、XVII型コラーゲンの局在が細胞側面にも観察されるようになっていた(FBS, X-Z)。スケールバー: 10 μ m

B) HD形成条件で培養したDJM-1細胞を、無血清培地で24時間培養した場合(cont)、10%血清を含む培地で24時間培養した場合(FBS)、10%血清に加えてスタウロスポリンを添加した培地で24時間培養した場合(FBS-Sta)、のそれぞれからTriton-X可溶性画分と不溶性画分を調製した。各画分中のXVII型コラーゲンを免疫ブロット法により検出した。血清刺激した細胞(FBS)では、Triton-X可溶性のXVII型コラーゲンが増加していた。ローディングコントロールを β -アクチンで示した。

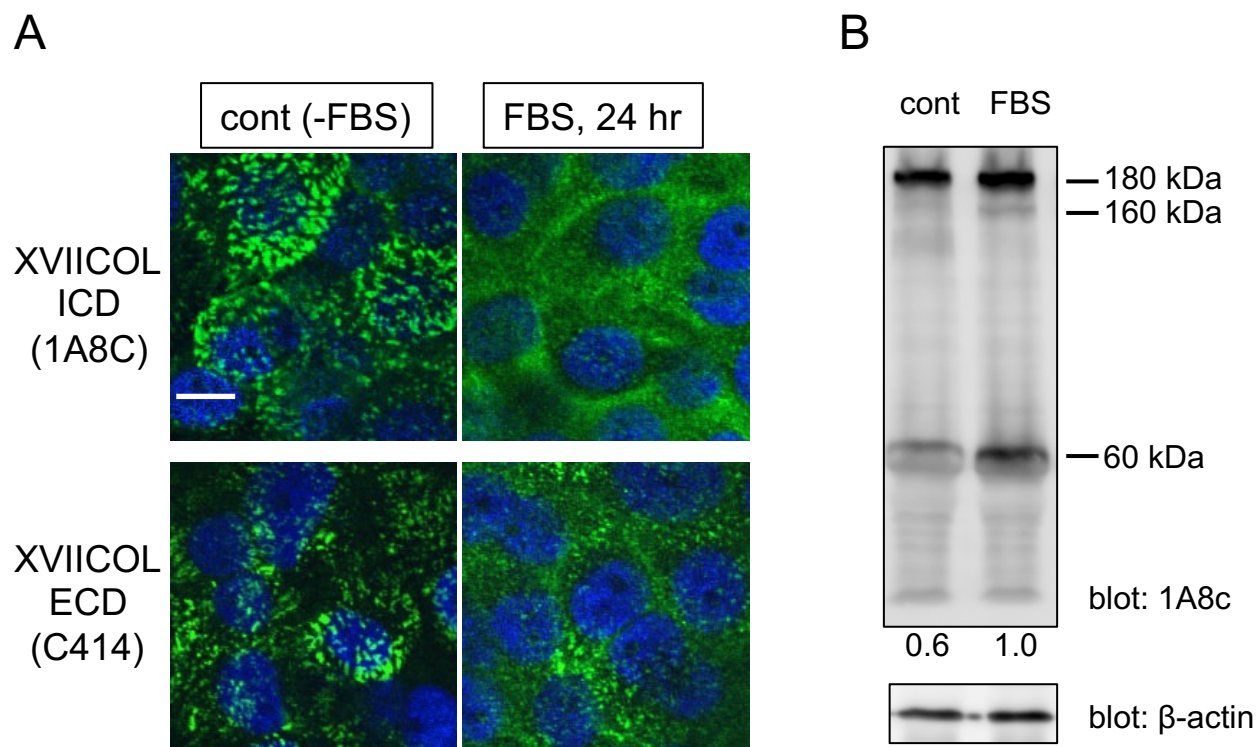


Fig. 12. 血清刺激によるHD解体時にXVII型コラーゲンの60 kDaの細胞内断片が検出された
 A) 血清刺激した細胞をXVII型コラーゲンの細胞内ドメイン(XVIIICOL ICD)に対する抗体(1A8c)で染色すると、細胞質ゾル中に由来すると思われる染色が観察された。一方、XVII型コラーゲン細胞外ドメイン(XVIIICOL ECD)に対する抗体(C414)では、血清刺激後には細かい斑点のみが観察され、細胞質への拡散した染色は観察されなかった。スケールバー: 10 μ m
 B) 血清刺激24時間後のDJM-1細胞から調製した全細胞抽出液をXVII型コラーゲンの細胞内ドメインに対する抗体(1A8C)で免疫ブロットした。血清刺激した細胞(FBS)では、血清刺激しなかった細胞(cont)よりも、多くの約60 kDaの細胞内断片が検出された。ローディングコントロールを β -アクチンで示した。1A8cによるblotの下の数値は、60 kDaのバンドの相対強度を示している。Image JでXVII型コラーゲン60 kDa細胞内断片のバンド強度を測定し、それぞれの値をアクチンのバンド強度で補正した。

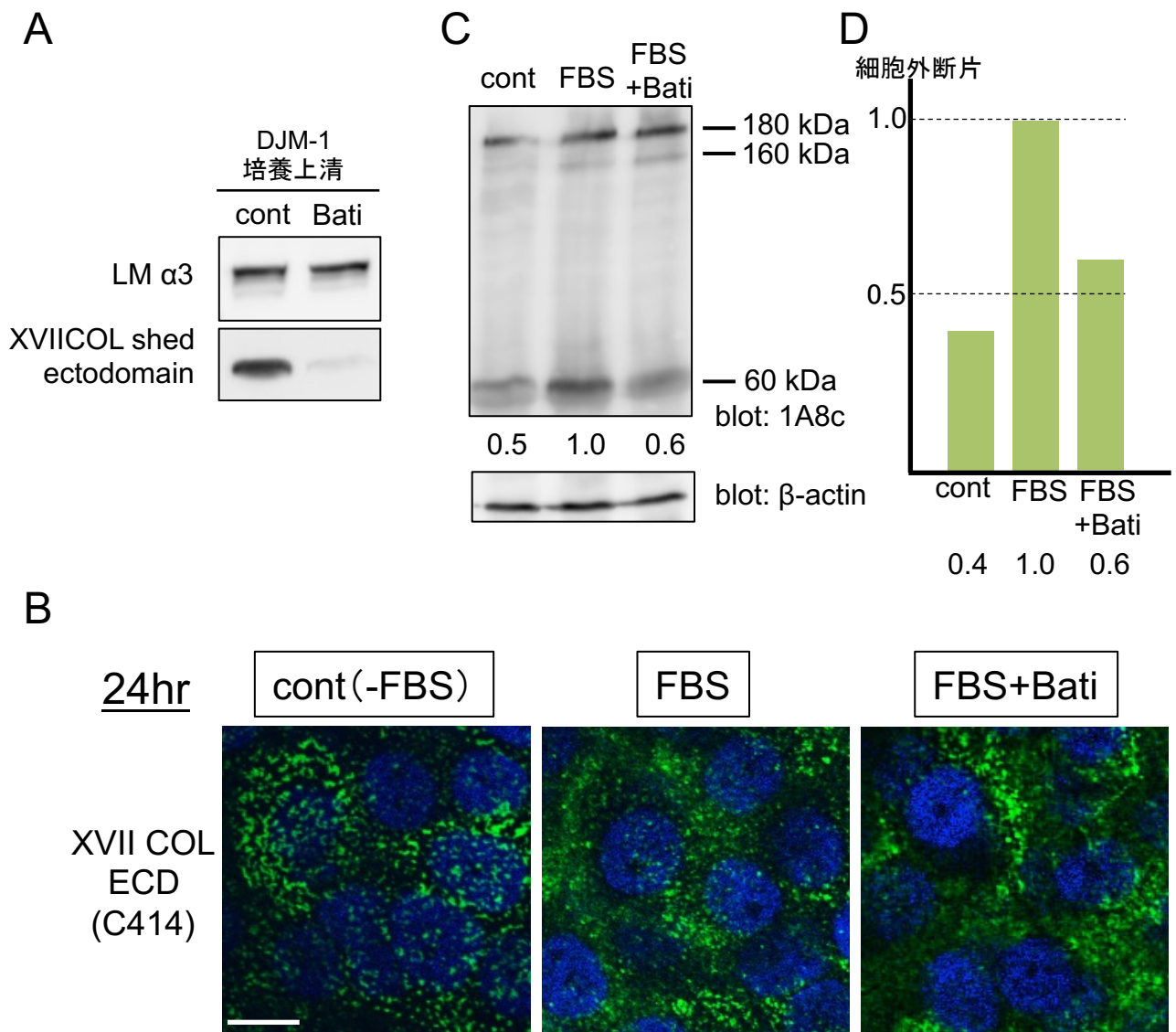


Fig. 13. 血清刺激によりXVII型コラーゲンの細胞外部分の切断は促進されたが、MMP阻害剤による切断の抑制はHDの解体に影響しなかった

A) Eagle's MEM+10% FBS で培養したDJM-1細胞に最終濃度10 μ M バチマスタット(Bati)を添加すると、培養上清に放出されるXVII型コラーゲンの細胞外断片の量が著しく減少した。培養上清濃縮画分をXVII型コラーゲン細胞外ドメインに対する抗体(233)とでラミニン α 3鎖に対する抗体(BM515)で免疫ブロットした。

B) I型HDを形成したDJM-1細胞に血清刺激を加えた場合(FBS)と、血清と共に10 μ M バチマスタットを加えた場合(FBS+Bati)を蛍光抗体染色法により比較観察した。バチマスタットを添加しても、HDの解体にはほとんど影響がなかった。スケールバー:10 μ m

C) HD形成条件で培養したDJM-1細胞の全細胞抽出液をXVII型コラーゲン細胞内ドメインに対する抗体(1A8c)で免疫ブロットした。血清刺激した細胞(FBS)ではXVII型コラーゲンの60 kDa細胞内断片が増加し、バチマスタットを加えると減少した(FBS+Bati)。1A8cによるblotの下の数値は、60 kDaのバンドの相対強度を示している。

D) 血清添加刺激をおこなった細胞(FBS)と、血清と共にバチマスタットを加えてXVII型コラーゲンの切断抑制をおこなった細胞(FBS+Bati)のそれぞれで、培養液中に放出されたXVII型コラーゲンの細胞外断片の量をELISA法で測定した。コントロールには血清もバチマスタットも加えていない細胞の培養上清を用いた(cont)。血清添加した細胞の培養上清(FBS)の吸光度を1.0とした時の相対値をグラフの下に示した。

考察

私たちの研究室では、これまでに DJM-1 細胞を無血清培地下で長期培養することで成熟したヘミデスモソームを形成させ得ることを見出している[31]。本研究では、DJM-1 細胞の形成する HD が血清添加刺激により解体することを発見し、さらにその際の XVII 型コラーゲン分子の挙動を特に細胞外部分の切断に注目して調べた。

DJM-1 細胞の HD は、血清刺激から約 24 時間でより細かい点状の染色として観察される構造へと解体され、やや拡散しているようにも観察された。この血清刺激による HD 構造の解体は、PKC の阻害剤であるスタウロスポリンによってほぼ完全に抑制することができた。PKC 経路の活性化はインテグリン $\beta 4$ サブユニットの細胞質部分のリン酸化を通して HD の解体を引き起こすと考えられていることから[26-30]、私が観察した DJM-1 細胞の HD 解体にも同様の細胞内シグナル経路が働いている可能性は高いと考えられる。

細胞の蛍光抗体染色と免疫ブロット、ELISA 法を用いた実験の結果、血清刺激によって XVII 型コラーゲンの細胞外部分の切断は促進されることがわかった。メタロプロテアーゼ阻害剤であるバチマスタットの添加により、血清刺激による XVII 型コラーゲンの切断は抑制することができたが、HD 解体にはほとんど影響が認められなかった。このことから、少なくとも今回の DJM-1 細胞を用いた実験からは XVII 型コラーゲン細胞外部の切断と HD の解体を関係付けることはできなかった。私は XVII 型コラーゲンの切断は、基底膜中のリガンドであるマトリックス分子から解離するために必要なのではないかと考えていた[20]。XVII 型コラーゲンの基底膜リガンドとしてはラミニン 332 が最もよく知られている。ラミニン 332 は DJM-1 細胞でも豊富に分泌され、細胞の基底側に沈着している[31]。このことからラミニン 332 との相互作用の解離には XVII 型コラーゲンの切断は必要ないと考えられる。しかし、最近新たにリガンドの可能性があると報告された IV 型コラーゲンは[32]、DJM-1 細胞の基底側への沈着はほとんど認められない（平子、未発表データ）。また、VII 型コラーゲンは上皮基底膜での局在パターンが HD と非常によく一致することから[33]、HD の細胞外リガンドのひとつであると考えられているが、VII 型コラーゲンも DJM-1 細胞の基底側には沈着しない[34]。そのため、XVII 型コラーゲンの切断の機能的役割の検討は、このような培養上皮細胞では細胞外基質として沈着しない分子との関係においてもおこなっていく必要がある。

最近、ADAMsによる切断領域を欠損した切断抵抗性のXVII型コラーゲン変異体を発現するトランスジェニックマウスの作製が報告された[35]。このマウスでは、表皮組織の形態や分化には変化がなく、HD構造も野生型と変わらないが、基底膜が肥厚し、また創傷治癒速度が上昇することが観察されている。表皮基底細胞が創傷治癒時に移動するためには比較的安定な構造であるHDは、解体へと誘導されるものと考えられる[26]。したがって、このトランスジェニックマウスの表現型はXVII型コラーゲンの切断はHD解体の促進とは関係していないことを示唆するのかもしれない。一方、基底膜の肥厚については細胞外マトリックスとの相互作用制御にXVII型コラーゲンの切断が関与している可能性が考えられる。いまのところXVII型コラーゲンの切断の抑制が創傷治癒速度の上昇に結びつく分子メカニズムは全くわかっておらず、XVII型コラーゲンの細胞外部分の切断の機能的意味については依然として未解明の部分が多く残っている[7]。

今回、血清添加したDJM-1細胞の免疫ブロットでは、180 kDaと60 kDa断片に加えて160 kDaのポリペプチドも検出された (Fig. 12B and 13C)。先行研究から、XVII型コラーゲンの120 kDa断片をプラスミン処理することで、C末端部分を失った97 kDaの分子が生じることが報告されている[12]。今回検出した160 kDaポリペプチドはC414抗体によっては検出されないことから (山内、未発表データ)、約20 kDa相当のC末端部分を失った分子と考えられる。血清中にはプラスミノゲンが含まれることから、血清添加刺激時に何らかの理由によりプラスミノゲンが活性化されてプラスミンを生じ、その結果、XVII型コラーゲンのC端側の切断が起きた可能性が考えられる。

本研究では、血清刺激によりDJM-1細胞のHDを解体へと導くことができ、さらにPKC阻害剤であるスタウロsporinによってほぼ完全に解体を抑制できることがわかった。一方、少なくとも今回、私がおこなった実験条件下ではXVII型コラーゲンの切断はHD解体の促進には関与しないことが明らかとなった。これまで、HD解体のリン酸化による制御はほとんどインテグリン $\beta 4$ にのみ注目されておこなわれてきた[26-30]。しかし、PKC経路の活性化により、XVII型コラーゲンがリン酸化されるという報告も存在する[36]。今後は、XVII型コラーゲンの細胞外部分の切断だけでなく、リン酸化にも注目して、これらの現象がHD解体や基底膜形成にどのように影響し得るのかを解析していきたい。

材料と方法

抗体

一次抗体として以下の抗体を用いた。XVII型コラーゲンの細胞外部分を認識するマウスモノクローナル抗体 1337 (MAb-1337)、233 (MAb-233) と XVII型コラーゲンの細胞内部分を認識するマウスモノクローナル抗体 1A8C (MAb-1A8C) と、インテグリン β 4 の細胞質部分を認識するマウスモノクローナル抗体 1A3 (MAb-1A3) は、ウシ角膜から単離したヘミデスモソーム画分をマウスに免疫して作製した[19]。MAb-233 はヒト XVII 型コラーゲンの C 末端側 1118-1143 番目に渡る 26 残基のアミノ酸配列を認識している (Fig. 1A) [11, 37]。マウスモノクローナル抗体 C34 (MAb-C34) と C414 (MAb-C414) はヒト XVII 型コラーゲンの細胞外部分の C 末端領域 (1188-1497 番目) を含む GST 融合タンパク質を抗原として作製した。MAb-C34 は XVII 型コラーゲンの 120 kDa 細胞外断片と反応するが、97 kDa 断片とは反応しない (Fig. 4C)。したがって MAb-C34 のエピトープはヒト XVII 型コラーゲンの C 末端に存在していることが示された。PAb-NC16A はヒト XVII 型コラーゲンの NC16A ドメインに対して作製されたマウスポリクローナル抗体である (Fig. 1A) [11]。ヒト XVII 型コラーゲンのドメイン構造を MAb-233、MAb-C34、PAb-NC16A の抗原領域とともに Fig. 1A に示した。BM515 抗体は、ラミニン α 3 鎖に対するマウスモノクローナル抗体である[21]。チオレドキシシン (TRX) に対するマウスモノクローナル抗体 (MAb-TRX) は、TRX タグを付加した組替えタンパク質をマウスに免疫して作製した。Horseradish peroxidase を付加した抗マウス IgG 抗体は GE Healthcare (Little Chalfont, UK) から購入した。Horseradish peroxidase を付加した抗ヒト IgG および抗ヒト IgA 抗体は Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) から購入した。Alexsa488 標識マウス IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。核を染色するために用いた DAPI solution は同仁化学研究所 (熊本) から購入した。

LAD 血清

1 M NaCl 溶液中で正常ヒト皮膚を表皮側と真皮側に解離させた場合 (1 M NaCl-split skin) に、表皮側に IgA の沈着が認められる LAD 患者血清を 20 サンプル集めた。これらのサンプルは久留米大学医学部皮膚細胞生物学研究所の橋本隆教授により収集され、1 M NaCl-split skin を用いたスクリーニングも久

留米大学医学部皮膚科において実施された。LAD 血清は、久留米大学病院での診断のために来訪した患者から提供されたもので、ヘルシンキ宣言に従った形で、すべての患者へのインフォームドコンセントが得られている。

細胞の培養

ヒト扁平上皮がん由来株細胞 DJM-1 は岐阜大学の北島先生から分与して頂いた[38]。DJM-1 細胞は 20 ng/ ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich, MO, USA)、2mM グルタミン、10% FCS を加えた Eagle's minimum essential medium (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で培養した。ヒト子宮頸がん由来の株細胞 HeLa は 10% FCS を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, CA, USA) で培養した。

cDNA コンストラクトの作製

ウシ XVII 型コラーゲンをコードした cDNA を増幅するために、ウシ乳腺株細胞である BMGE+H 細胞から RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を精製した。RNA PCR Kit ver. 3.0 (Takara, Tokyo, Japan) を使用し、oligo dT-adaptor プライマーを用いて cDNA を合成した。ウシ XVII 型コラーゲンの全長 cDNA は FL_BovineBP180_Fw、FL_BovineBP180_Rv プライマーの組み合わせを用いて増幅した。ヒト XVII 型コラーゲンの cDNA 全長は DJM-1 細胞から調製した cDNA に対して FL_HumanBP180_Fw、FL_HumanBP180_Rv プライマーを用いて増幅した。PCR で増幅したウシまたはヒト XVII 型コラーゲンの cDNA は pT7Blue ベクターにクローニングし、ABI 3100 DNA シーケンサー (Applied Biosystems, CA, USA) で配列決定を行った。得られたウシおよびヒト XVII 型コラーゲンの cDNA 配列は GenBank にそれぞれ accession number AB900156 および AB900157 として登録した。

pT7BlueベクターにクローニングされたウシXVII型コラーゲンの全長配列をテンプレートとして、フォワードプライマーにBo530_Fw、Bo539_Fw、Bo546_Fw、Bo558_FwのいずれかとリバープライマーBoC15_Rvの組み合わせを用いてN末端側をそれぞれ部分的に欠いたウシNC16AドメインとC15ドメインを含むポリペプチド (Bo530+C15 (530–821)、Bo546+C15 (546–821)、Bo558+C15 (558–821)) をコードするcDNA配列を増幅した。また同様に、p

ライマー BoNC16A_Fw と BoNC16A_Rv を用いてウシ NC16A ドメイン (BoNC16A (496–572)) をコードする cDNA を増幅した。これらの増幅配列を SalI と NotI で制限酵素処理し、同様の処理をおこなった pET32b ベクターへサブクローニングした。C 末端側の配列をそれぞれ部分的に欠損したウシ NC16A ドメイン (BoNC16A-567 (AA 496–567) と BoNC16A-562 (AA 496–562)) をコードする cDNA は、ウシ NC16A ドメインを含む pET32b コンストラクトをテンプレートとし、プライマーとして pET32b_invFw と Bo567_invRv または Bo562_invRv を用いたインバース PCR により作製した。

ヒト NC16A+C15 ドメインとヒト C15 ドメインをコードする cDNA 配列を増幅するために、ヒト XVII 型コラーゲンの全長 cDNA をテンプレートとし、プライマーとして HuNC16A_Fw と HuC15_Rv または HuC15_Fw と HuC15_Rv の組み合わせで PCR を行った。増幅配列を SalI と NotI で制限酵素処理し、pET32b ベクターへ挿入した。しかし、これらの組換えタンパク質は発現しなかったため、C15 ドメインの C 末端側をコードする塩基配列を XhoI による制限酵素処理で除去し、HuNC16A+C15 (489–718) と HuC15 (567–718) の cDNA を含む pET32b コンストラクトを作製した。ヒト NC16A ドメイン (HuNC16A, 489–566) をコードする pET32b コンストラクトを増幅するため、HuNC16A+C15 の cDNA 配列を含む pET32b コンストラクトをテンプレートとし、プライマー pET32b_invFw2 と HuNC16A_invRv を用いてインバース PCR を行った。

上記の通りの方法で作製した各種の pET32b コンストラクトで Rosetta (DE3) 大腸菌株 (Novagen, Madison, WI, USA) を形質転換し、N 末端側に TRX タグが付加された組換えタンパク質を発現させた。これらの pET32b コンストラクト中の XVII 型コラーゲンの各断片をコードする塩基配列は ABI 3100 DNA シーケンサーによって解析をおこない、変異の無いことを確認した。

キメラ BBH (ウシ-ウシ-ヒト) と HHB (ヒト-ヒト-ウシ) XVII 型コラーゲン配列を作製するために、ウシとヒトの XVII 型コラーゲンの cDNA 配列上の相同な位置に存在する KpnI サイト (ヒト XVII 型コラーゲンの 2371–2376 塩基、ウシ XVII 型コラーゲンの 2389–2394 塩基) で切断し、ウシとヒトの配列を入れ替えた。キメラ HBB (ヒト-ウシ-ウシ) XVII 型コラーゲンをコードする cDNA 配列は、Overlap_Hu+BoBP180_Fw と Overlap_Hu+BoBP180_Rv プライマーを用いたオーバーラップ PCR により作製した [39]。これらのキメラ XVII 型コラーゲン cDNA 配列を pEBMulti-Puro (WAKO, Tokyo, Japan) にサブクローニングし、

HeLa細胞にトランスフェクション後、ピューロマイシン耐性により安定発現株を得た。

PCR反応に用いたプライマーの配列は表1にまとめて示す。

培養細胞へのトランスフェクション

pEBMulti プラスミドを Effectene reagent (Qiagen) を用いて HeLa 細胞へ導入した。外来性の XVII 型コラーゲンを安定的に発現する株細胞を得るために、導入後、終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ ピューロマイシンを含む培地で培養を開始し、 $5\mu\text{g/ml}$ へと段階的にピューロマイシン濃度を上げることで、耐性株を得た。このような HeLa 細胞の培養上清から XVII 型コラーゲン組換えタンパク質の切断された 120 kDa 細胞外部分を調製した。

培養細胞からの細胞膜画分と不溶性画分の調製

DJM-1細胞またはウシXVII型コラーゲンを安定発現するHeLa細胞から細胞膜画分と不溶性画分を調整した。細胞を抽出バッファー (50 mM NaCl、5 mM EDTA、20 mM Tris-HCl、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、5 mg/ml leupeptin and 5 mg/ml pepstatin A、pH 7.4) 中で、セルスクレイパーを用いて培養皿から剥がし、エッペンチューブに移した後、氷上で21G針のついたシリンジを使ってホモジェナイズした。氷中で30分静置後、細胞抽出液を4℃、30分、15000 rpmで遠心し、上清を除去した。残った沈殿に0.5% Triton X-100を含むlow salt buffer (150 mM NaCl、5 mM EDTA、20 mM Tris-HCl、pH 7.4) を加えて懸濁し、氷上で30分静置し抽出した。抽出後に同様にして遠心分離をおこないTriton X-100可溶性細胞膜画分 (上清) と不溶性画分 (沈殿) を得た。

細胞培養上清の濃縮

DJM-1細胞またはHeLa細胞の培養液を48時間おきに回収した。回収した培養液を2000 rpmで5分遠心して死細胞を除去した。上清に最終濃度33%となるように飽和硫酸溶液を加え、4℃下で3時間からオーバーナイトで攪拌した。その後、4℃、30分、12000 rpmで遠心し、沈殿を少量のPBSに溶かした。

プラスミンによる全長XVII型コラーゲンの限定分解

約400 ulの細胞膜画分を10 cmの培養皿2枚にコンフルエントの状態になっている培養細胞から調製した。この膜画分200 ulにプラスミン (Haematologic Technologies, Vermont, USA) を最終濃度0.02、0.1、0.5 unit/mlで添加し、37°Cで反応させた。消化反応は5×SDS sample bufferを加えることで停止した。

免疫ブロット

SDSゲル電気泳動後、セミドライ方式によりタンパク質をPVDF膜に転写した[40]。転写されたタンパク質の確認には脱色の用意なボンソーS染色液を用いた。その後、0.5%スキムミルクを含むTween-TBS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) で30分間またはオーバーナイトでブロッキングし、1次抗体と反応させた。Horseradish Peroxidase標識2次抗体が結合したポリペプチドのバンドはEzWestLumi (ATTO, Tokyo, Japan) で発光反応させ、LAS-4000mini化学発光撮影機 (Fuji Film, Tokyo, Japan)で検出し、撮影した。

免疫沈降

XVII型コラーゲンの組換えタンパク質を発現している大腸菌Rosetta (DE3) 株をPBS中で超音波破碎した。破碎液を20,000×gで30分間遠心し、その上清を免疫沈降に用いた。上清にMAb-TRXを含むハイブリドーマ上清を加え、室温で1時間インキュベートした。その後、抗マウスIg抗体を結合したアガロースビーズ (American Qualex, CA, USA) を加えてさらに1時間攪拌しつつインキュベートした。アガロースビーズをTween-TBSで4回洗浄し、遠心後に沈殿したビーズに4×SDS sample bufferを加え、懸濁後、2分間煮沸した。煮沸した試料を遠心し、上清にβ-メルカプトエタノールを加え還元し、免疫ブロット用の試料とした。

DJM-1 細胞のヘミデスモソーム形成の促進

DJM-1 細胞をコンフルエントになるまで、通常の培地 (400 ng/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich)、20 mM グルタミン、10% FCS を添加したダルベッコ変法メディウム (ニッスイ)) で培養する。その後、初代培養ケラチノサイト用の無血清培地 EpiLife (Gibco) 中で10日から14日間培養しHDを形成させた[31]。

血清添加刺激によるヘミデスモソームの解体の蛍光抗体染色法による観察

9 mm×9 mm のカバーガラスを敷き詰めた 3.5 cm 培養皿に DJM-1 細胞を HD 形成条件で培養し、10% FCS を加えた EpiLife 培地と交換することで血清添加刺激とした。添加刺激から 24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、0.5% Triton-X 100 を含む PBS 溶液で 5 分間氷上に静置後、−20℃のメタノールで 5 分間固定した。一次抗体を 1 時間反応させ、PBS 洗浄後に、二次抗体を 30 分間反応させた。その後、PBS 洗浄し、PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) で封入した。プロテインキナーゼ C 阻害剤として最終濃度 100 nM スタウロスポリンを使用した。また、ADAMs を抑制する場合は、マトリックスメタロプロテナーゼ阻害剤であるバチマスタットを最終濃度 10 μM で使用した。阻害剤は血清添加の 1 時間前に加えて前培養とし、さらに血清を含む培地にも阻害剤を添加し、無血清培地との交換に使用した。観察には共焦点顕微鏡 FV1000 (オリンパス) を用いた。

HD 斑点 (スペckル) の計測

1024×1024 pixel (72 dpi) の共焦点顕微鏡画像から 200×200 pixel の正方形を切り出し、これを 1 枚の画像とした。解像度の変更は行っていない。この画像に対して 2 値化処理を行い、Image J によって斑点サイズを測定した。

DJM-1 細胞からの Triton-X 100 可溶性、Triton-X 100 不溶性画分、全細胞抽出液の調製

DJM-1 細胞を HD 形成条件下で培養し、PBS で 2 回洗浄後、Triton-X 100 抽出液調製用緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.5% Triton-X) を加え培養皿からセルスレイパーを用いて細胞を剥がし、21G 針をつけたシリンジを用いてホモジェナイズした。氷上で 30 分静置後、4℃、15000 rpm、30 分遠心分離し上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。

DJM-1細胞をHD形成条件下で培養し、PBSで2回洗浄後、SDS sample buffer を添加後、培養皿の底をゴムベラで何度もこすることで、不溶性度の高い成熟したHDを可溶化させ、全細胞抽出液とした。

ELISA 法

XVII 型コラーゲン細胞外断片を認識するマウスモノクローナル抗体

(MAb-233) を 96 穴 ELISA 用プレート (住友ベークライト) に 1 ウェルあたり $2\mu\text{g}$ 加え 1 時間以上静置し、PBS 洗浄後 1% BSA でブロッキングした。PBS 洗浄後、DJM-1 細胞の培養上清を加え 1 時間以上静置した。PBS 洗浄後、XVII 型コラーゲン細胞外部分を認識するウサギポリクローナル抗体を 1 時間以上反応させ、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ウサギ IgG 抗体 (Jackson) を用い 1 時間以上反応させた。p-ニトロフェニルホスファートタブレット (SIGMA) を用いて発色反応をおこない、プレートリーダー (BIO-RAD Model 680) で吸光度 (波長 405 nm) を測定した。

表 1 使用したプライマー一覧

| <i>Full-length human and bovine BP180 coding regions</i> | |
|--|--|
| FL_BovineBP180_Fw | GGATCCACCATGGACATAACCCAGAAGAACAAACG |
| FL_BovineBP180_Rv | GATATCTTATGGCTTGACGGCAATG |
| FL_HumanBP180_Fw | AAGCTTGCCACCATGGATGTAACCAAGAAA |
| FL_HumanBP180_Rv | GCGGCCGCTCACGGCTTGACAGCAATAC |
| <i>pET32 constructs</i> | |
| Bo530_Fw | GTCGACGACGACGACAAGGTGCAGGGGGTTGCG |
| Bo539_Fw | GTCGACGACGACGACAAGGAAGGTTTAGGAAAATCTGA |
| Bo546_Fw | GTCGACGACGACGACAAGCTTGACGACTACAATCTGG |
| Bo558_Fw | GTCGACGACGACGACAAGATGAAGGTCAGGCTGATGAC |
| pET32b BoC15_Rv | GCGGCCGCCGACGATCCCTCTGAAGTC |
| BoNC16A_Fw | GTCGACGACGACGACAAGGCCGAGGAGGTGAGGAAACT |
| BoNC16A_Rv | GCGGCCGCTCGGAGATTTCCATTTTCCTG |
| pET32b_invFw | GCGGCCGCACTCGAGCACC |
| Bo567_invRV | TTCCTGTTCTGTCATCAGCC |
| Bo562_invRV | CAGCCTGACCTTCATGAATTG |
| HuNC16A_Fw | GTCGACGACGACGACAAGGCCGAGGAGGTGAGGAAG |
| HuC15_Fw | GTCGACGACGACGACAAGGGAAGCCCTGGCCCTAAAG |
| HuC15_Rv | GCGGCCGCCGATGACCCCTCCGAAG |
| pET32b_invFw2 | CACCACCACCACCTGAGAT |
| HuNC16A_invRv | TCGGAGATTTCCATTTTCCTGTTC |
| <i>HBB chimera</i> | |
| Overlap_Hu+BoBP180_Fw | GAAATCTCCGAGGAAGCCCTG |
| Overlap_Hu+BoBP180_Rv | CAGGGCTTCCTCGGAGATTTTC |

謝辞

本研究において、研究進行、学会発表、論文作成に至るすべての場面でご指導いただきました平子善章講師に深く御礼申し上げます。そして、本研究を行うにあたって、様々な場面で支えてくださりました名古屋大学細胞生物学グループ生体システム論講座の皆さまに心より感謝いたします。また、本研究に携わる機会を与えてくださいました、尾張部克志教授に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Walko G, Castañón MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res* 2015; 360: 363–378.
- [2] Turcan I, Jonkman MF. Blistering disease: insight from the hemidesmosome and other components of the dermal-epidermal junction. *Cell Tissue Res* 2015; 360: 545–569.
- [3] Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 99: 243–250.
- [4] Fortuna G, Marinkovich MP. Linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *Clin Dermatol* 2012; 30: 38-50.
- [5] Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 734-738.
- [6] Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ. The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 207-210.
- [7] Franzke CW, Tasanen K, Schäcke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee DC, Fahrenholz F, Bruckner-Tuderman L. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J* 2002; 21: 5026-5035.
- [8] Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Blobel CP. Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J Biochem* 2009; 35: 23386-23396.
- [9] Hirako Y, Nishizawa Y, Sitaru C, Opitz A, Marcus K, Meyer HE, Butt E, Owaribe K, Zillikens D. The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1554-1556.
- [10] Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke CW, Hofmann SC, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L. Ectodomain shedding generates Neoepitopes on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. *J Immunol* 2010; 185: 4938-4947.
- [11] Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K. Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* 1998; 273: 9711-9717.

- [12] Hofmann SC, Voith U, Schonau V, Sorokin L, Bruckner-Tuderman L, Franzke CW. Plasmin plays a role in the in vitro generation of the linear IgA dermatosis antigen LADB97. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1730-1739.
- [13] Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, Bruckner-Tuderman L. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* 2000; 156: 685-695.
- [14] Nie Z, Nagata Y, Joubeh S, Hirako Y, Owaribe K, Kitajima Y, Hashimoto T. IgA antibodies of linear IgA bullous dermatosis recognize the 15th collagenous domain of BP180. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 1164-1166.
- [15] Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 573-579.
- [16] I Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Shimizu H. Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 2201-2210.
- [17] Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM Jr, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 947-953.
- [18] Lin MS, Fu CL, Olague-Marchan M, Hacker MK, Zillikens D, Giudice GJ, Fairley JA. Autoimmune responses in patients with linear IgA bullous dermatosis: both autoantibodies and T lymphocytes recognize the NC16A domain of the BP180 molecule. *Clin Immunol* 2002; 102: 310-319.
- [19] Owaribe K, Nishizawa Y, Franke WW. Isolation and characterization of hemidesmosomes from bovine corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1991;192:622-30.
- [20] Hirako Y, Owaribe K. Hemidesmosomes and their unique transmembrane protein BP180. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 207-217.
- [21] Hirako Y, Yoshino K, Zillikens D, Owaribe K. Extracellular cleavage of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen and its involvement in hemidesmosomal disassembly. *J Biochem* 2003; 133: 197-206.
- [22] Zimina EP, Fritsch A, Schermer B, Bakulina AY, Bashkurov M, Benzing T, Bruckner-Tuderman L. Extracellular phosphorylation of collagen XVII by ecto-casein kinase 2 inhibits ectodomain shedding. *J Biol Chem* 2007; 282: 22737-22746.

- [23] Zimina EP, Hofmann SC, Fritsch A, Kern JS, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L. Bullous pemphigoid autoantibodies preferentially recognize phosphoepitopes in collagen XVII. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2736-2739.
- [24] Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480-2488.
- [25] Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 1997; 109: 679-683.
- [26] Litjens SH, Jose' M. de Pereda, Sonnenberg A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 376-383.
- [27] Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Margadant C, van Rheenen J, Sonnenberg A. Serine phosphorylation of the integrin β 4 subunit is necessary for epidermal growth factor receptor induced hemidesmosome disruption. *Mol Biol Cell* 2007; 207: 3512-3522.
- [28] Frijns E, Sachs N, Kreft M, Wilhelmsen K, Sonnenberg A. EGF-induced MAPK signaling inhibits hemidesmosome formation through phosphorylation of the integrin β 4. *J Biol Chem* 2010; 48: 37650-37662.
- [29] Kashyap T, Germain E, Roche M, Lyle S, Rabinovitz I. Role of β 4 integrin phosphorylation in human invasive squamous cell carcinoma: regulation of hemidesmosome stability modulates cell migration. *Lab Invest* 2011; 91: 1414-1426.
- [30] Frijns E, Kuikman I, Litjens S, Raspe M, Jalink K, Ports M, Wilhelmsen K, Sonnenberg A. Phosphorylation of threonine 1736 in the C-terminal tail of integrin β 4 contributes to hemidesmosome disassembly. *Mol Biol Cell* 2012; 23: 1475-1485.
- [31] Hirako Y, Yonemoto Y, Yamauchi T, Nishizawa Y, Kawamoto Y, Owaribe K. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 2014; 324: 172-182.
- [32] Nishie W, Kiritsi D, Nyström A, Hofmann SC, and Bruckner-Tuderman L. Dynamic Interactions of Epidermal Collagen XVII with the Extracellular Matrix Laminin 332 as a Major Binding Partner. *Am J Pathol* 2011; 179: 829-837.

- [33] Uematsu J, Nishizawa Y, Hirako Y, Kitamura K, Usukura J, Miyata T, Owaribe K. Both type-I hemidesmosomes and adherens-type junctions contribute to the cell–substratum adhesion system in myoepithelial cells. *Eur J Cell Biol* 2005; 84: 407-415.
- [34] Hayakawa T, Hirako Y, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Ishii N, Karashima T, Kaneda M, Oyu Y, Tateishi C, Sugawara K, Yonamine A, Shinkuma S, Shimizu H, Fukano H, Shimozato K, Nguyen NT, Marinkovich MP, Tsuruta D, Hashimoto T. Unique mouse monoclonal antibodies reactive with maturation-related epitopes on type VII collagen. *Exp Dermatol* 2017; doi: 10.1111, *in press*
- [35] Jacko'w J, Schlosser A, Sormunen R, Nyström A, Sitaru C, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Franzke CW. Generation of a Functional Non-Shedding Collagen XVII Mouse Model: Relevance of Collagen XVII Shedding in Wound Healing. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 516-525.
- [36] Kitajima Y, Owada MK, Fujisawa Y, Seishima M, Yaoita H, Hirako Y, Owaribe K. A hemidesmosomal transmembrane collagenous molecule, the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BPA II), is phosphorylated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in a human squamous cell carcinoma cell line (DJM-1). *Epithelial Cell Biol* 1995; 4: 70-75.
- [37] Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pità O, Owaribe K, Mastrogiacomo A, Sera F, Borradori L, Zambruno G. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 103-110.
- [38] Kitajima Y, Inoue S, Nagao S, Nagata K, Yaoita H, Nozawa Y. Biphasic effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the cell morphology of low calcium-grown human epidermal carcinoma cells: involvement of translocation and down regulation of protein kinase C. *Cancer Res* 1988; 48: 964-970.
- [39] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989; 77: 61-68.
- [40] Hirako Y, Usukura J, Nishizawa Y, Owaribe K. Demonstration of the molecular shape of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J Biol Chem* 1996; 271: 13739-13745.