

学 位 論 文 題 名

ヒト皮膚における細胞膜骨格蛋白質の存在と分布

学位論文内容の要旨

膜骨格 (membrane skeleton) はいくつかの膜蛋白質からなり、膜脂質二重層を細胞質側から網目状に裏打ちしている。この構造は、微小管等の細胞骨格 (cytoskeleton) の範疇に含められるが、赤血球の場合、特に膜骨格と呼ぶ。これまで、赤血球は分離が容易であり細胞内小器官を含まないことから、細胞膜研究の格好のモデルとされてきた。赤血球の膜骨格はスペクトリン、4.1蛋白質、アクチンなどから成り、赤血球の形態保持や膜機能 (変形能や膜安定性) の維持に重要な役割を果たしている。スペクトリンは細長い繊維状蛋白質で、 α 鎖 (240kDa) と β 鎖 (220kDa) が自己会合して二重体となり、さらに頭部同士で結合して四量体を形成している。一方、スペクトリン二重体の尾部は4.1蛋白質 [a (80kDa) と b (78kDa)] とアクチン (43kDa) にそれぞれ結合して三者複合体を形成させている。又、スペクトリン β 鎖はアンキリン (210kDa) に結合し、アンキリンは他方では膜を貫通しているバンド3の細胞質ドメインとも結合している。

近年、赤血球以外の細胞で膜骨格に類似した蛋白質が発見され、赤血球膜骨格構造の普遍性が予想される。フォドリンは脳から精製された非赤血球スペクトリンであり、スペクトリン同様、 α 鎖 (240kDa) と β 鎖 (235kDa) から構成されている。赤血球膜骨格蛋白質やアンキリンに対する抗体を用いた免疫学的検討から、スペクトリン様蛋白質、4.1様蛋白質、アンキリン様蛋白質等が赤血球以外の多くの細胞に存在することが明らかとなった。

表皮細胞については、従来、細胞骨格 (マイクロフィラメント、ケラチン中間径フィラメント、微小管等) の存在と角化に伴う形態的及び生化学的变化については検討されている。又、表皮細胞を培養する場合、低 Ca^{2+} 濃度 (0.15 mM) では増殖するが分化せず、標準 Ca^{2+} 濃度 (1.2 - 2.0 mM) では分化することが知られている。更に、この Ca^{2+} スイッチによる分化に伴ってアクチンフィラメントの主な分布が細胞質から細胞膜へ変化することも観察されている。しかし、皮膚における表皮細胞や皮膚付属器官細胞における膜骨格蛋白質の存在や分布に関する検討はほとんど行われていない。本研究では、まず抗スペクトリン抗体、抗- β -フォドリン抗体 (非赤

血球スペクトリン), 抗4.1蛋白質抗体, 抗アンキリン抗体を用いて, ヒト皮膚におけるこれらの蛋白質の存在とその分布について免疫学的検討を行った。次いで培養ヒト表皮細胞を用いて Ca^{2+} スイッチによるこれらの膜骨格蛋白質の分布の変化について検討を行った。

抗スペクトリン抗体, 抗 β -フォドリン抗体を用いたイムノプロットの結果から, ヒト表皮には240kDa と235kDa のスペクトリン様蛋白質が存在し, これは脳からすでに精製されているフォドリンと同一の蛋白質と思われた。又, ヒト表皮には80kDa と78kDa の4.1様蛋白質, 210 kDa のアンキリン様蛋白質が存在することが明らかとなった。これらの抗体を用いた蛍光抗体法による免疫染色の結果から, スペクトリン様蛋白質(フォドリン)と4.1様蛋白質はヒト表皮細胞(特に基底細胞), エックリン汗腺及び汗管の細胞膜に沿って主に分布するが, 細胞質にも分布していた。一方, アンキリン様蛋白質はヒト表皮細胞の細胞膜に沿って存在するが, 基底細胞のみならず表皮細胞全層に広く分布していた。又, 核や細胞質にも認められた。以上の事実から, これらの細胞には赤血球膜骨格類似の構造があることが示唆された。

表皮細胞を低 Ca^{2+} 濃度 (0.15mM) の培地で培養し, 抗4.1蛋白質抗体を用いて染色すると細胞質に広汎な染色像がみられた。一方, 標準 Ca^{2+} 濃度 (1.85mM) の Ca^{2+} 存在下に培養すると(Ca^{2+} スイッチ), 細胞質のみならず細胞膜にも明らかな染色像が認められた。この場合, 同時に Rhodamine - phalloidin を用いてアクチンを染色すると(二重染色), 低 Ca^{2+} 濃度の条件では細胞質に広汎なアクチンフィラメントがみられたが, Ca^{2+} スイッチにより4.1蛋白質同様細胞膜にも明瞭な染色像が得られた。 Ca^{2+} 濃度の違いによる同様の細胞内分布の変化は抗 β -フォドリン抗体を用いた場合にも認められた。すなわち染色像は低 Ca^{2+} 濃度では細胞質に広汎に, 標準濃度では細胞膜と細胞質の両者にみられた。以上の事実から Ca^{2+} スイッチにより4.1様蛋白質とフォドリンがアクチンと同様に細胞質から細胞膜へ移行することが明らかとなった。これら膜骨格蛋白質が細胞質から細胞膜へ移行することはこれらの蛋白質や膜骨格構造が表皮細胞間の接着形成に何らかの重要な役割を果たしていることが推測される。

一般に, 細胞膜を裏打ちしている膜骨格の機能は細胞形態の保持, 膜安定性の維持, 膜貫通蛋白質の可動性の制御, 細胞接着の形成の他に, 分泌や吸収, エキソサイトーシスやエンドサイトーシス等の膜の動的変化を伴う機能に関与することも予想されており, エックリン汗腺細胞における汗の分泌に関わっている可能性もある。本研究において, ヒト皮膚における膜骨格蛋白質の存在と分布が明らかとなったが, 機能を解明するためには今後これらの蛋白質を精製し, 相互の結合やその調節について検討する必要があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大河原 章
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 武 市 紀 年

膜骨格 (membrane skeleton) はいくつかの膜蛋白質からなり、膜脂質二重層を細胞質側から網目状に裏打ちしている。赤血球の膜骨格はスペクトリン [α 鎖 (240kDa) と β 鎖 (220kDa)], 4.1蛋白質 [a (80kDa) と b (78kDa)], アクチン, アンキリン (210kDa) などから成り、赤血球の形態保持や膜機能(変形能や膜安定性)の維持に重要な役割を果たしている。

近年、赤血球以外の細胞で膜骨格蛋白質に類似した蛋白質が発見され、赤血球膜骨格構造の普遍性が予想される。フォドリンは脳から精製させた非赤血球スペクトリンでありスペクトリン同様、 α 鎖 (240kDa) と β 鎖 (235kDa) から構成されている。又、赤血球膜骨格蛋白質やアンキリンに対する抗体を用いた免疫学的検討から、スペクトリン様蛋白質、4.1様蛋白質、アンキリン様蛋白質等が赤血球以外の多くの細胞に存在することが明らかとなった。

表皮細胞については、従来、細胞骨格 (マイクロフィラメント, ケラチン中間径フィラメント, 微小管等) の存在と角化に伴う形態的及び生化学的变化については検討されている。しかし、皮膚における表皮細胞や皮膚付属器官細胞における膜骨格蛋白質の存在や分布に関する検討はほとんど行われていない。

著者は、いくつかのヒト膜骨格蛋白質に対する抗体を作成し、ヒト皮膚における膜骨格蛋白質の存在とその分布について免疫学的検討を行った。次いで培養ヒト表皮細胞を用いて Ca^{2+} スイッチによるこれらの膜骨格蛋白質の分布の変化についての検討を行った。

まずヒト赤血球からスペクトリン、4.1様蛋白質、アンキリンを Tyler 等の方法に従ってそれぞれ精製した。これらの精製蛋白質を用いてウサギを免疫し、アフィニティー精製抗体を作成した。これらの抗体と抗 β -フォドリン抗体をイムノブロット法と蛍光抗体法に使用した。

ヒト表皮細胞には、脳に存在するフォドリンと [α 鎖 (240kDa) と β 鎖 (235kDa)] と相同と思われるスペクトリン様蛋白質、4.1様蛋白質 (80kDa と 78kDa), さらにアンキリン様蛋白質 (210kDa) が存在することが明らかとなり、また、免疫染色の結果から、これらの蛋白質はヒト表皮細胞、エクリン汗腺及び汗管の細胞膜に沿って主に存在するが、細胞質にも分布していた。以上の事実から、これらの細胞には赤血球膜骨格類似の構造があることが示唆された。

又、培養ヒト表皮細胞において、 Ca^{2+} スイッチにより4.1蛋白質と β -フォドリンがアクチンと同様に細胞質から細胞膜へ移行することが明らかとなった。これらのことから膜骨格蛋白質がヒト表皮細胞における細胞接着に関与していることが示唆された。

口頭発表にあたって、葛巻教授から生理的条件下(in vivo)における in vitro での Ca^{2+} スイッチに相当する機構の存在と膜骨格蛋白質との関連について、武市教授からは皮膚疾患（陽性のものを含めた）にてこれらの膜骨格蛋白質の異常が解明されているものがあるか、阿部教授からは膜骨格蛋白質と重層扁平上皮における細胞接着との関わりとその分布についての質問があり、またその後の審査において副査の葛巻、武市教授から論文内容並びに関連領域について試問が行われたが、著者は概ね的確な応答をし得たと判定された。よって本論文は赤血球の膜骨格蛋白質やアンキリンに類似する蛋白質がヒト皮膚にも存在し、またこれらの膜骨格蛋白質はヒト表皮細胞間の接着形成に何らかの役割を果たしていることが推測される所見を得たことから、今後更に皮膚疾患との関わりについての検討など、この分野の研究に寄与するところ多大なものがあり、学術上有益な論文と認められ、学位を授与されるに値するものと判定された。