

学 位 論 文 題 名

Changing pattern of deiminated proteins
in developing human epidermis

(ヒト表皮発生における脱イミノ化蛋白の発現パターンの変化)

学位論文内容の要旨

背景: Peptidylarginine deiminase (PAD)は、蛋白のア르기ニン残基をシトルリン残基に変換するカルシウム依存性の酵素であり、多臓器にわたる分布が認められている。PAD によりア르기ニン残基がシトルリン残基へ変換されると、蛋白質は正の電荷を失うため、その構造や機能に大きな変化をもたらす。しかしその働きはまだ明らかになっていないことが多い。PAD は現在のところI~Vまで5つの subtype が知られているが、そのうちヒト表皮に発現が認められているのは type I である。PAD による酵素反応は脱イミノ化と呼ばれ、表皮においては角化における翻訳後修飾の最も重要な反応の一つである。すなわち、角化の最終段階においてケラチン線維の結合や分解がPADの働きによって行われることにより、正常なケラチンパターンが形成され、皮膚のバリア機能を担っていると推察されている。この反応は非可逆的であるため、その働きは厳密に調節される必要がある。ヒト表皮では、PADにより脱イミノ化された蛋白は角層に局限しており、PADの主な基質はケラチン1であり、その他にフィラグリンとケラチン10も基質となることが知られている。

研究の目的: ヒト胎児の発生過程においてPADによる脱イミノ化がいつ、どのように起こり、その基質が何であるかを明らかにすることにより、表皮の発生過程におけるPADの役割について推察する。

実験の方法: 胎生 49 日~163 日の胎児皮膚、成人の皮膚、培養表皮細胞、および培養表皮細胞シートを用いて、脱イミノ化蛋白と、PADの基質となるケラチン 1/10、フィラグリンの局在を免疫組織学的、および免疫電顕を用いて調べた。PADの酵素反応産物である脱イミノ化蛋白の検出には、ケラチン1の V subdomain に存在するシトルリン残基のみを検出する anti-citrulline peptide antibody (ACP)と、アミノ酸配列に関係なくシトルリン残基を検出する anti-chemically modified citrulline antibody (AMC)の 2 種類の抗体を用いた。

結果: 胎生 49 日、57 日の、二層からなる表皮では、AMC が胎児皮膚である periderm に陽性であったが、ACP は陰性であった。胎生 88 日、96 日、108 日の重層化した表皮では、ACP、AMC ともに periderm と intermediate cell layer に陽性であった。periderm が退行し、角化が始まる胎生 163 日には、ACP と AMC は成人皮膚と同様に、角層のみに局限し

て認められた。PADの基質であるケラチン 1/10 は、胎生 108 日の皮膚で intermediate cell layer に局在していた。胎生 163 日には、ケラチン 1/10 は基底層より表層の細胞全体に陽性だったが、脱イミノ化蛋白は角層のみに局在していた。フィラグリンは胎生 108 日の時点では発現しておらず、胎生 163 日には脱イミノ化蛋白と同じく、角層に局在していた。胎生 163 日でのケラチン1、フィラグリン、脱イミノ化蛋白の局在は成人皮膚での発現パターンと同様であった。ACP を用いた免疫電顕では、periderm および intermediate cell layer の細胞質内の中間径フィラメントネットワークが immunogold で標識された。培地を用いた培養表皮細胞では、低カルシウムの培地ではケラチン1、脱イミノ化蛋白とも発現が見られず、高カルシウムの培地ではケラチン1は発現していたが、脱イミノ化蛋白は発現していなかった。線維芽細胞を feeder layer として用いた培養表皮シートでは ACP が角層にあたる最上層で陽性であった。

考察: PAD は表皮分化の初期の段階ですでに活性を持ち、脱イミノ化蛋白が形成されていることが明らかになった。ただし、表皮が二層の時点では、ケラチン1またはフィラグリンはまだ発現しておらず、それ以外の蛋白が基質となっていると推測された。まだ角化の始まっていない periderm に脱イミノ化蛋白が存在する意義は不明であるが、角化に重要な蛋白であるインボルクリンやロリクリンも periderm に発現していることが報告されており、periderm の退行と、角化には何らかの共通点があることが推測される。重層化が始まりケラチン1が表皮細胞に発現する頃にはケラチン1と脱イミノ化蛋白の局在は免疫組織学的に intermediate cell layer で一致しており、免疫電顕でもケラチン線維上に脱イミノ化蛋白の存在が確認されたことより、この時期におけるPADの基質はケラチン 1/10 またはそれに類似した構造をもつ蛋白であり、角化の準備段階であると考えられる。胎生 163 日頃には、表皮は形態学的にも成人と同様の構造を示しているが、脱イミノ化蛋白、ケラチン 1/10、フィラグリンの発現パターンも成人と同じであり、この頃にはほぼ成人と同様の角化が行われていると考えた。

結論: PADによる脱イミノ化は、ヒト胎児皮膚発生の過程で表皮の各層において整然と行われており、表皮の分化とともに変化し次第に成人と同様の発現パターンとなっていた。成人皮膚での角化に対応する過程が、退行する過程の periderm で起こっており、PAD による脱イミノ化が表皮の分化の過程における重要な役割を担っているであろうと考えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 水 上 尚 典

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Changing pattern of deiminated proteins in developing human epidermis

(ヒト表皮発生における脱イミノ化蛋白の発現パターンの変化)

Peptidylarginine deiminase (PAD)は、蛋白のアルギニン残基をシトルリン残基に変換するカルシウム依存性の酵素である。PADによりアルギニン残基がシトルリン残基へ変換されると蛋白質は正の電荷を失うため、その構造や機能に大きな変化をもたらす。PADによる酵素反応は脱イミノ化と呼ばれ、非可逆的な反応である。表皮において脱イミノ化は角化における翻訳後修飾の最も重要な反応の一つであると考えられている。すなわち、角化の最終段階において、ケラチン線維の結合や分解がPADの働きによって行われることにより正常なケラチンパターンが形成され、皮膚のバリア機能を担っていると推察される。ヒト表皮では、PADの主な基質はケラチン1であり、その他にフィラグリンとケラチン10も基質となることが知られている。成人皮膚ではPADにより脱イミノ化された蛋白は角層に局限して認められる。

本研究では、発生各段階の胎児皮膚を用いて、胎児皮膚においてPADによる脱イミノ化は起こっているのか、そしていつ、どの部分に、何を基質として起こっているのかについて検討した。PADの酵素反応産物である脱イミノ化蛋白の検出には、ケラチン1のV subdomainに存在するシトルリン残基のみを検出するanti-citrulline peptide antibody (ACP)と、アミノ酸配列に関係なくシトルリン残基を検出するanti-chemically modified citrulline antibody (AMC)の2種類の抗体を用いた。

その結果、胎生49日、57日の、二層からなる表皮では、AMCがperidermに陽性、ACPは陰性であった。胎生88日、96日、108日の重層化した表皮では、ACP、AMCともにperidermとintermediate cell layerに陽性であった。peridermが退行し、角化が始まる胎生163日にはACPとAMCは成人皮膚と同様に、角層のみに局限して認められた。PADの基質であるケラチン1/10は、periderm退縮前にはintermediate cell layerに局限し、periderm退縮後は成人と同様に基底細胞より上の細胞層に発現していた。フィラグリンはperiderm退縮後に初めて発現し、成人と同様角層とその直下の細胞に発現が認められた。免疫電顕ではintermediate cell layerのケラチン線維上に脱イミノ化蛋白を認めた。

PADは表皮分化の初期の段階ですでに活性を持ち、脱イミノ化蛋白が形成されていることが明らかになった。成人でPADの基質であるケラチン1/10やフィラグリンが発現していないperidermやintermediate cell layerにもPAD活性が認められる意義は不明であるが、角化に重

要な蛋白であるインボルクリンやロリクリンが periderm に発現していることが報告されており、また成人において PAD 活性は角層が形成される際にのみ活性が発現することから、periderm の退行と、角化には何らかの共通点があることが推測される。胎生 163 日頃には角化が始まり、脱イミノ化蛋白、ケラチン 1、フィラグリンの発現パターンも成人と同じであることから、脱イミノ化の観点から見て、この頃にはほぼ成人と同様の角化が行われていると考えた。

副査の水上尚典教授からは、胎児皮膚で intermediate cell layer に PAD 活性が見られることの意義、および PAD の異常により起こる疾患について、また、PAD の活性の観点からみた胎児皮膚の完成時期についての質問、副査の清水 宏教授からは ACP と AMC の染色法の違いとその意義に関する質問、主査の渡辺雅彦教授からは PAD が活性を示すカルシウム濃度に関する質問などがあったが、申請者は大概適切な回答をした。

この論文は、ヒト胎児皮膚の発生過程における PAD 活性を初めて明らかにした研究である点が高く評価され、今後、その働きについて明らかにしてゆくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。