



Title	Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes
Author(s)	花川, 靖
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42754
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	花川 靖
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15890 号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes (デスマゾームカドヘリンのドミナントネガティブ変異体の表皮細胞接着に対する影響の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 邦彦
	(副査) 教授 金田 安史 教授 竹田 潤二

論文内容の要旨

目的

表皮ケラチノサイトの接着機構は、その構築を保つために重要な働きをしていると考えられている。尋常性天疱瘡は接着機構が自己免疫により破綻し、全身に水疱を形成する疾患であるが、その抗原として同定されたデスマグレイン3(Dsg3)は、カドヘリンと同様の構造を持つことが報告されている。カドヘリンはカルシウム依存性の細胞接着因子であり、形態学的また発生学的に重要な制御因子であることが知られている。表皮細胞間接着装置の一つであるアドヘレンスジャンクション(AJ)には、古典的カドヘリンに分類されるE-カドヘリン(Ecad)、P-カドヘリンが局在している。また、デスマゾーム(DS)にはデスマゾームカドヘリンであるDsg、デスマコリン(Dsc)が局在しており細胞間の接着に重要な役割を持っていると考えられているが、それぞれの機能および相互関係はほとんど未知である。

この研究の目的はCre/loxP系を導入した、アデノウイルスベクターによりEcad、Dsg、Dsc変異体DNAをケラチノサイトに導入し、ドミナントネガティブ効果を起こし、表皮ケラチノサイトの接着に与える影響を観察し接着機構のメカニズムを解析することにある。

方法

1. アデノウイルスベクター(Ax)の作製

E-カドヘリン、デスマグレイン3、デスマコリン3の細胞外部を一部欠失させたcDNA(ECadΔEC、Dsg3ΔEC、Dsc3ΔEC)をPCR法にて作成後、loxP配列を2つ持つコスミドカセットに組み込み相同組換えによりウィルスを分離した。Cre酵素を発現するAxは東京大学斎藤泉博士により供与された。

2. Ax感染によるケラチノサイトへの変異体導入及び解析

上記方法にて作成した変異体を組み込んだAxを、ケラチノサイトであるHaCaT細胞に二重感染し、変異体発現に伴う変化をEcad、Dsg3、Dscあるいは裏打ち蛋白であるカテニン、デスマプラキン(DP)、また細胞骨格であるケラチンを染色し正常細胞と比較した。更にEcadを発現しAJのみを形成するLEC5 cellに変異体を導入し細胞間接着に対する影響をβ-カテニンの染色、cell aggregation assay法を行い解析した。加えて免疫沈降法によりそれぞれの変異体に共沈する蛋白を調べた。

成績

当初それぞれの mutant を直接発現する Ax の作製を試みたが非常に困難であり 293 細胞への mutant の toxicity の可能性があった。しかし、Cre/loxP 系を導入することにより間接的に発現する Ax の作製は可能であった。変異体を組み込んだ Ax と Cre 発現 Ax を同時感染したところほぼ 100% の細胞が変異体蛋白を発現していた。コントロール細胞には Ax の細胞毒性は認めなかった。DP はコントロール細胞では細胞間に線状・点状に染まるのに対し、Dsg3ΔEC、Dsc3ΔEC、EcadΔEC、では細胞質に染色され細胞間にはほとんど認められなかった。Dsg3、Dsc はコントロールでは細胞間に線状に強く染まるが、Dsg3ΔEC、Dsc3ΔEC、EcadΔEC では細胞間にはほとんど認められなかった。Ecad はコントロール、Dsg3ΔEC では細胞間に線状に強く染まるが、Dsc3ΔEC では減弱し EcadΔEC では細胞間にはほとんど認められなかった。 β -カテニンを AJ のマーカーとして、細胞骨格であるケラチンを DS のマーカーとして二重染色したところ Dsg3ΔEC により DS の破壊が、EcadΔEC あるいは Dsc3ΔEC では AJ と DS の両方の破壊が認められた。

更に変異体を Ecad を発現し AJ のみを形成する LEC5 cell に感染させ、AJ への影響を調べた。Dsc3ΔEC の発現により β -catenin は細胞間ではなく細胞質にび漫性に染まった。また、cell aggregation assay 法により Dsc3ΔEC は cell aggregates の形成を抑制し、Dsc3ΔEC が AJ の形成を直接抑制していることがわかった。また免疫沈降法により Dsc3ΔEC は β -カテニンと共に沈することがわかった。この結合は wild type-Dsc にも認められた。

総括

Dsg3ΔEC により DS のみの破壊が、EcadΔEC あるいは Dsc3ΔEC では AJ と DS の両方の破壊が認められた。デスマコリンはデスマゾームカドヘリンであり DS を形成することがわかっている。しかし、今回 Dsc のドミナントネガティブ効果が AJ にも及ぶことがわかった。この結果からデスマコリンが AJ の構成蛋白と関連して機能していることが考えられる。DS の形成にまず AJ の形成が必要であるという過去の報告と併せて考えるとデスマコリンは AJ から DS への伝達蛋白として橋渡しの働きをしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

花川 靖氏は表皮ケラチノサイトの細胞接着装置を担う 2 つの装置、すなわちアドヘレンスジャンクション (AJ) とデスマゾーム (DS) の形成について classic cadherin、desmosomal cadherin の機能検討に焦点を置いて解析を行っている。ドミナントネガティブ効果を期待して細胞外ドメインを欠失した E-cadherin、desmoglein3、desmocollin3 の変異体 (E-cadΔEC、Dsg3ΔEC、Dsc3ΔEC) を構築しこれらの変異体を発現する組換えアデノウイルスベクター (Ad) を Cre-loxP 系を応用して作製した。ケラチノサイトである HaCaT 細胞に後これらの変異体を発現させて解析を行ったところ免疫染色にて E-cadΔEC は AJ、DS の両方を、Dsg3ΔEC は DS のみを破壊することがわかった。そして Dsc3ΔEC は AJ、DS の両方を破壊した。LEC5 cell を用いることにより Dsc3ΔEC は AJ に直接働いていることを確認し、免疫沈降法により Dsc3ΔEC は AJ の裏打ち蛋白である β -catenin と結合していることを見いだした。更に native desmocollin も β -catenin と結合していることを見いだした。これらの結果と過去の AJ の形成が DS の形成に必須であるという報告と併せて desmocollin が AJ の形成後 DS の形成への橋渡しをしている可能性を提示した。この論文は細胞接着装置の形成のメカニズムの解明に貢献するものであり、学位論文に値するものと考える。