



表皮細胞におけるエピプラキンの機能（助成研究報告）

藤原，作平

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 22:102-103

(Issue Date)

2006-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81007937>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007937>



表皮細胞におけるエピプラキンの機能

大分大学医学部皮膚科 藤 原 作 平 (50年卒)

1. 緒言

エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された分子量55kDaの分子であるが、表皮細胞内に局在する。構造上の特徴として、他のプラキン分子のカルボキシ末端に見られるBドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたり見いだされ、特にカルボキシ末端にはほぼ完全に保存された5回の繰り返し構造が存在している¹⁾。プラキン分子は細胞骨格結合蛋白と呼ばれ、その中のデスモプラキンやプレクチンは中間径フィラメントと相互作用することは、すでに明らかになっていたが、新たな分子であるエピプラキンと中間径フィラメントとの相互作用は不明であった。今回この相互作用を検討するために、Slot-blot AssaysとCell-Overlay Assaysによる実験を行った。

2. 実験

まずBドメイン、LinkerドメインとB+LinkerドメインのGST融合蛋白質を得た。Bドメイン自体は4.6回のリピートで構成されており、Bドメイン内のリピート数とケラチンとの相互作用を調べるために、1リピート、2リピート、3リピートを含むコンストラクトを作成し、GST融合蛋白質として発現させた。次にLinkerドメイン内にもリピート構造があるため、1リピート、2リピート、3リピートを含むコンストラクトを作成し、GST融合蛋白質として発現させた。これらのGST融合蛋白質を用いて、Slot-blot Assaysを行った。

さらに、これらのGST融合蛋白質と細胞全体との反応性を検討するために、培養HeLa細胞をメタノール固定後、GST融合蛋白質を加えインキュベート後に洗浄し、抗GST抗体を加え、さらに二次抗体を加えてCell-Overlay Assaysを行った。

3. 結果

Slot-blot Assaysの結果、Bドメイン、LinkerドメインとB+LinkerドメインのGST融合蛋白質の中、B+Linkerドメインとケラチンとの相互作用が一番強く、次いでGST-B、GST-Linkerの順であった。中間径フィラメントについては、ケラチン、ビメンチン、

デスミン順で弱くなった。Bドメイン内のリピート数を変化させた場合には、少なくとも、2ないし3リピートでGST-Bドメインとケラチンとの相互作用にはほぼ匹敵したため、GST-Bドメインとケラチンとの相互作用には少なくとも2ないし3つのリピートが必要であることが明らかになった。次にLinkerドメイン内のリピート数を変化させた場合にも、リピートの数が増すとともに相互作用が強くなった。

HeLa細胞を用いたCell-Overlay Assaysの結果、GST-Bドメインは、核周囲に顆粒状に分布し、一部にケラチンとの局在が認められた(図B)。GST-Linkerドメインは、細胞内に点状に分布し(図E)、GST-B+Linkerドメインは、GST-BとGST-Linkerドメインの中間的分布すなわち一部顆粒状、一部点状の分布がみられた(図H)。このことから、GST-Linkerドメインは、ケラチン以外の他の分子とも相互作用することが示唆された。

4. 考察

Slot-blot AssaysおよびCell-Overlay Assaysの結果、エピプラキンのBドメインは、ケラチンと結合し、Linkerドメインはケラチンとは弱く結合することに加えて、それ以外の細胞質蛋白質とも結合することが示唆された。Linkerドメインが、繰り返し配列をとることは、エピプラキンの特徴であり、今後その機能を探りたい。B+LinkerドメインあるいはBドメインがケラチンと結合することによって、エピプラキンが、数本のケラチンを束ねると我々は想定しており、今後この仮説も検証していきたい。

References

- 1) Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, et al (2001): Epiplakin, a novel member of the plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen: Structure and tissue localization, J Biol Chem, 276, 13340-13347
- 2) Wang W, Sumiyoshi H, Fujiwara S, et al (2006): Interactions between epiplakin and intermediate filaments. J Dermatol, in press

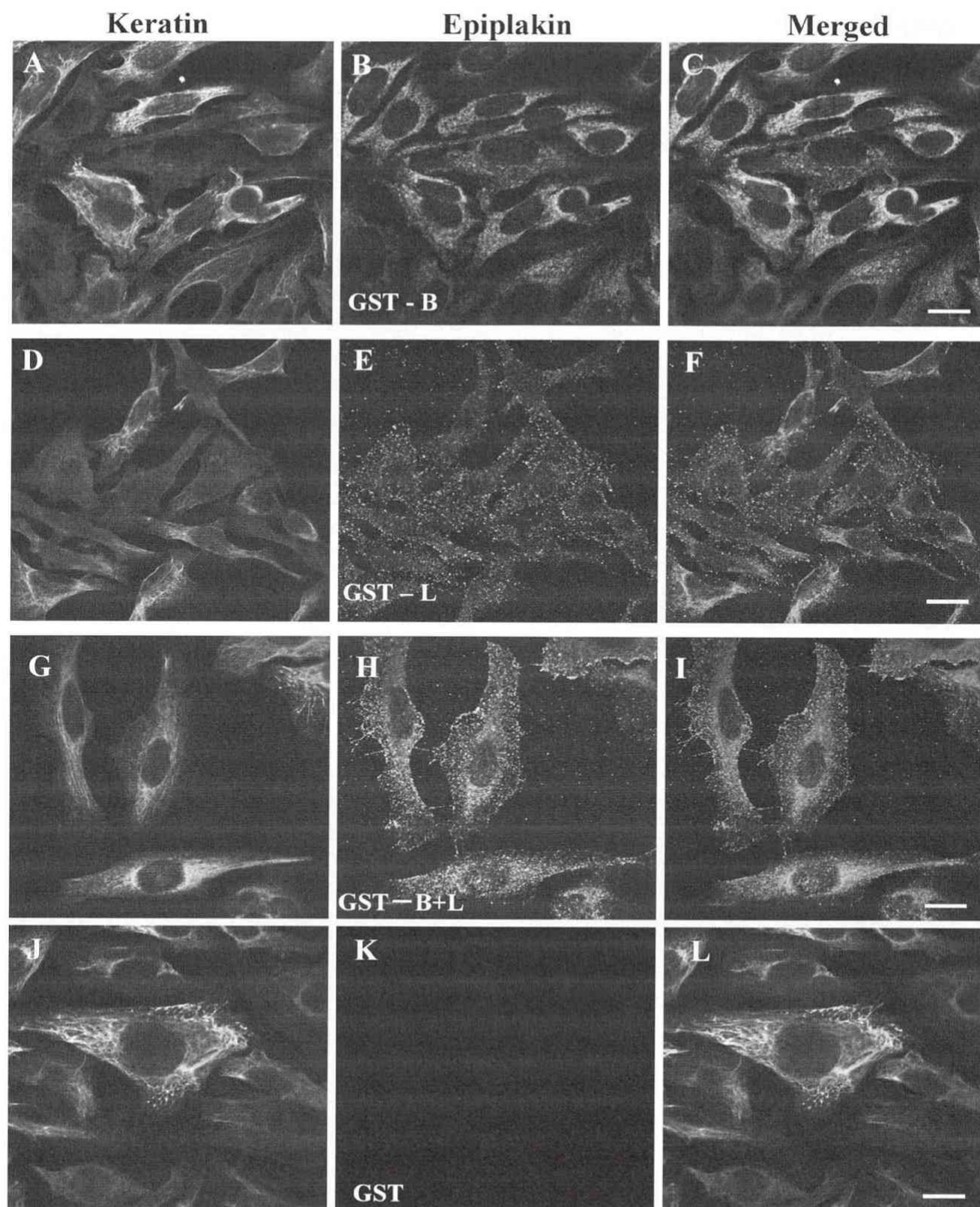


図 HeLa 細胞を用いた Cell-Overlay Assays