

## 学 位 論 文 要 旨

研究題目 Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice  
(トランスグルタミナーゼ 1 に R142C 変異をノックインしたマウスでは角層バリアと生後の生存が障害される)

兵庫医科大学大学院医学研究科

先端医学専攻 分子病態制御系

皮膚病態制御学 (指導教授 山西清文 )

氏 名 中川 登

研究目的：トランスグルタミナーゼ (TG) は、タンパクのグルタミン残基とリシン残基の間に架橋結合反応を触媒する酵素で、タンパク間の共有結合形成を介して、生体の種々な機能に関わっている。TG アイソザイムのなかで、トランスグルタミナーゼ 1 (TG1) は表皮の顆粒層で発現し、細胞膜に移行してロリクリンなどのタンパクを重合し、角層細胞辺縁に強固な周辺帯 (コーニファイドエンベロープ) (CE) を形成するために必須の酵素である。また、TG1 をコードする遺伝子 TGM1 の変異は常染色体劣性魚鱗癬の発症に関わり、とりわけ R143C 変異は、重症の葉状魚鱗癬の表現型を示すことが報告されている。本研究では、TG1 の R143C 変異に相当する変異 R142C を持つマウスを作出し、この TG1 変異が皮膚のバリア構造・機能に及ぼす影響を調べた。

研究方法：129/SVJ マウス TG1 遺伝子 (*Tgm1*) の exon 3 に存在するアルギニンをコードする CGT をシステインをコードする TGT に置換した配列と、loxP を両側に持つネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*) を intron 3 にもつターゲティングベクターを構築し、ES 細胞に導入後 G418 共存下で培養し、相同組換えを起こしたクローンを選別した。この ES 細胞を集合キメラ法により胚盤胞期まで培養し、偽妊娠マウスに移植してキメラマウスを作成した。雄キメラを雌 C57BL/6 と交配し、この変異と *neo* 遺伝子をもつマウス *Tgm1*<sup>+R142Cfloxed</sup>/*neo* を樹立後、CAG-cre トランスジェニックマウスと交配して *neo* を除き、R142C 変異をヘテロに持つ *Tgm1*<sup>+R142C</sup> を樹立した。

結果：*Tgm1*<sup>+R142C</sup> マウス同士を交配し、R142C 変異をホモに持つ *Tgm1*<sup>R142C/R142C</sup> を作成した。*Tgm1*<sup>R142C/R142C</sup> は生育せず、生後数時間程度で死亡した。出生直前の 19.5 dpc の変異マウス皮膚において、定量的 RT-PCR では *Tgm1* の発現は野生型、*Tgm1*<sup>+R142C</sup>

と同程度であったが、TG1 タンパクの発現量は著しく低下していた。培養表皮角化細胞における TG1 活性も細胞質、細胞膜ともに *Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> では野生型に比して著しく低かった。*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> の HE 染色像では顆粒層の肥厚がみられ、TG1 抗体を用いた蛍光抗体法では TG1 の発現低下、in situ TG アッセイでも顆粒層細胞辺縁における TG 活性の低下が観察された。基質となるロリクリンは野生型では細胞辺縁に局在するが、*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> では細胞内に顆粒状に局在した。電顕では *Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> において角層の著しい肥厚と周辺帯の形成不全、角層細胞内に異常な顆粒の存在、不規則な角層細胞間層板構造、CE に架橋するリピッドエンベロープ (CLE) の形成不全が観察された。角層バリア機能に関して、*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> では CE は壊れやすく、トルイジンブルーの皮膚透過性が亢進し、経表皮水分蒸散量 (TEWL) が著しく増加していた。生きた 19.5 dpc マウスの角層細胞間脂質の分子配向を X 線小角散乱を用いて解析したところ、野生型角層では 13 nm 間隔の周期的な脂質分子の配向をしめす回折像がみられたが、*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> 角層ではそのパターンは消失していた。

考察： TG1 に R143C 変異をもつヒトの先天性魚鱗癬は生存可能であるが、予想に反し、R143C に対応する変異をもつマウス *Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> は生後すぐに死亡し、皮膚の形態および機能的にも、以前松木らが作成した *Tgml* ノックアウトマウスに酷似した表現型であった。皮膚における *Tgml* 遺伝子の発現は野生型と同程度であるが、皮膚抽出液および組織切片上で TG1 タンパクは減少し、組織切片上の TG 活性の減弱と培養角化細胞における酵素活性の低下が特徴的であった。その原因として、R142C 変異がマウス TG1 の立体構造に影響し、酵素の活性部位の機能が低下した可能性と、変異 TG1 の分解が亢進している可能性が考えられる。*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> の皮膚バリア機能については、トルイジンブルーの透過性亢進と TEWL の著しい増加から、outside-inside バリア、inside-outside バリアの両方が障害されていると推測される。CE アッセイおよび電顕所見に示されるように CE が不完全で、TG1 の基質となるロリクリンが表皮顆粒層から角層の細胞辺縁に分布せず、細胞質内に異常な局在を示すこと、CE に架橋する脂質層 (CLE) の欠如、不規則な角層細胞間層板構造の所見から、TG1 活性の減少によって CE が失われ、それを土台として形成される角層細胞間脂質層によるシール機能が障害された結果と思われる。今回の研究では、Spring-8 で作られるマイクロビーム X 線を用いて、世界で初めて生きたマウス角層の X 線回折像を得ることができた。*Tgml*<sup>R142C/R142C</sup> の角層からは正常の角層で観察される 13 nm 間隔の周期的な回折パターンがみられず、電顕所見と併せて考えると、恐らくは、生きたマウスの角層でも角層細胞間脂質分子の配向が不規則になっていると想像される。