

原

著

Differential display 法を用いた 新規ケラチン mK 6 irs の同定

新潟大学医学部皮膚科学教室（主任：伊藤雅章教授）

澤 田 壮 平

Identification of a Novel Keratin mK 6 irs
Using a Differential Display

Souhei SAWADA

*Department of Dermatology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Masaaki ITO)*

During the hair growth cycle, several families of keratin proteins are synthesized sequentially. To investigate the gene expression of different stages of hair cycle is the clue to understand the mechanism of cell differentiation or proliferation. Differential display method is one of the useful strategy to study the gene expression because of its ability to compare multiple RNA populations simultaneously. As a result, I isolated a hitherto unknown gene. The novel gene encodes 2193 nucleotide sequence includes the entire coding region for a protein of 524 amino acids. Northern analysis showed that the transcript detected during the anagen phase is expressed only in skin, but not in other tissues. By screening the Genbank, the deduced amino acid sequence exhibits the highly homology with type II cytokeratins and the secondary structure constitutes the keratin intermediate filaments. In addition, the short regions at the extremities of the rod domain, called the helix initiation motif and the helix termination motif, which specifically conserved among the cytokeratin families are also presents. Moreover, the amino acid composition revealed glycine-rich but low cysteine content in head and tail domains, exclude the possibility of its character as a hair keratin family. By immuno-

Reprint requests to: Souhei SAWADA,
Department of Dermatology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951-8520, JAPAN.

別刷請求先： 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部皮膚科学教室 澤田壮平

histochemistry, the mK6irs expression occurs at inner root sheath in the late-anagen phase, predominantly in the Huxley's and Henle's layer of mouse hair follicles.

Key words: differential display, keratin intermediate filament, inner root sheath
ディフェレンシャルディスプレイ法, ケラチン中間径線維, 内毛根鞘

は じ め に

毛は成長期, 退行期, および休止期という毛周期を繰り返しており, 成長期にのみその産生が認められる. 毛周期の長さは動物種により異なり, また同一種でもその部位により大きく異なることによって部位特有の毛の長さが定められている. ヒト頭毛では成長期が数年, 退行期は1~2週, 休止期は数ヶ月あり, 各毛器官は独立してその毛包独自の毛周期を繰り返している (mosaic pattern). 一方, ラットやマウスなどでは毛周期が一致しており (synchronized pattern), 毛の成長期は波状に現れ全身皮膚を通じて前方から後方へ, 腹側から背側へ移動する. 毛は中心部の毛幹とそれを取り囲む毛包から成り, 何層もの細胞層が同心円状に配列した上皮組織である. 毛包は内毛根鞘と外毛根鞘から成り, さらに内毛根鞘は内側から内毛根鞘小皮, ハックスレー層, およびヘンレ層に分けられる. 内毛根鞘の外側を外毛根鞘が囲むが, その最内層の1層は外毛根鞘最内層と呼ばれ, 特異な細胞分化を示す¹⁾. 毛は毛根下端的の毛乳頭で細胞分裂が行われ, 毛包口へ向かって上昇しながら角化する²⁾. 内毛根鞘の角化はヘンレ層で最も早く始まり, 鞘小皮, ついでハックスレー層が最後となる. 内毛根鞘の主な機能は毛包内毛幹の輪郭をつけることにあって考えられている. すなわち, 毛包内で角化して形成される構造物として発育しつつある毛幹はその形成期間中, 内毛根鞘内を通り輪郭が形成される. 内毛根鞘はまた毛幹を毛包内に定着させる機能もあると考えられている³⁾.

毛組織を構成する細胞内には細胞骨格としてその形態や機能を司るケラチン中間径線維から成る蛋白質が豊富に含まれている. 中間径線維は微小管 (太さ24nm), 微小線維 (太さ6 nm) とともに細胞骨格の1つで, α -ヘリックス構造を基本とする太さ10nm の線維である. ケラチン蛋白は450~500個のアミノ酸残基からなり, 中央部の α -ヘリックス構造をとる rod domain とその両端部の非 α -ヘリックス構造をとる head domain, tail domain の3つの domain に分けられる. rod domain はさらに1A, 1B, 2A, 2B からなる4つの subdomain に細分化され, これら subdomain

は非ヘリックス構造をとる L1, L1/2, L2 の3つのリンカー領域によってそれぞれ結合され1本鎖を形成している.

ケラチン中間径線維は, 酸性で分子量の小さいタイプIと塩基性で分子量の比較的大きいタイプIIケラチンが等モル比でペアーをなすヘテロダイマーのユニット構造をとり, ヒトではK9~19までのタイプIケラチンと, K1~8までのタイプIIケラチンの塩基配列が同定されている. これらのケラチンペアーは分化特異的に複合体を形成して発現される. 例えば, 表皮基底細胞ではK5/K14⁴⁾が発現され, その合成はケラチノサイトが分化するに従って down regulate され, 代わってK1/K10 (あるいはK11)⁵⁾が発現される. また, 角膜にはK3/K12⁶⁾⁷⁾が, 粘膜上皮にはK4/K13 (あるいはK15)⁸⁾⁹⁾がそれぞれ発現され, それぞれは厳密ではないものの組織特異性があることが報告されている.

これまでにヒトのケラチン蛋白は約30種類のサブタイプが存在し, それぞれのケラチンについてその分布が明らかにされてきたが, マウスに関しては約10種類のケラチンの塩基配列が同定されているに過ぎず, また, その局在についても十分な報告がなされていない. 今回私は differential display 法を用いて, マウス成長期毛に特異的に発現される未知のケラチン cDNA を同定し, さらにそのコードする蛋白質の毛包における局在を明らかにした.

材 料 と 方 法

1) RNA 抽出

生後21日, 24日および27日目のC57BL/6NCrj マウスより背部皮膚および各臓器を採取し, total RNA をグアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム法を利用して抽出した. 皮膚標本はそれぞれ休止期, 成長期初期, および成長期中期の毛周期にあることを光学顕微鏡により確認した.

2) RNA differential display 法

生後21日, 24日および27日目のマウス皮膚の total RNA を RNase-free DNase I (ペーリンガーマンハイム)を用いて10分間処理後, oligo (dT) プライマー

を用いて reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い、一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、10種類の P プライマーと9種類の oligo (dT) プライマーの中からそれぞれ任意に1つずつ選択し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (アマシャムファルマシアバイオテク) と Taq polymerase (クロンテック) を用いて polymerase chain reaction (PCR) を施行した。生成された PCR 産物は5%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離され、オートラジオグラフィーにて検出された。これにより多くの band が検出されたが、そのなかで他のレーンと比較して発現が増強している band から cDNA を回収し、上記と同様の条件による PCR で増幅後、pGE M-T easy (プロメガ) にサブクローニングした。automated sequencer (アマシャムファルマシアバイオテク) を用いて cDNA の塩基配列を解読後、BLAST 解析を利用して Genbank データベースを検索した。

3) 5' RACE 法

differential display により分離された cDNA の完全長塩基配列を同定するため、マウス成長期中期の皮膚 total RNA から Marathon cDNA Amplification キット (クロンテック) を用いて5'RACEを行った。PCR により増幅された cDNA は pBluescript にサブクローニングされ、automated sequencer (アマシャムファルマシアバイオテク) で塩基配列を決定した後、Genbank データベースを検索した。

4) ノーザンブロット

マウス背部皮膚および各臓器から抽出した total RNA 10 μ g を1.5%ホルムアミドゲルで電気泳動後、陽性荷電ナイロンフィルター Hybond N⁺ (アマシャムファルマシアバイオテク) に転写した。*mK6irs* cDNA の3' 非翻訳領域を制限酵素 *Apa* I (東洋紡) で分離後、Random Primed DNA Labeling Kit (ペーリンガー・マンハイム) を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (アマシャムファルマシアバイオテク) で標識し、プローブとして用いた。ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック) を用いてフィルターを68℃で1時間ハイブリダイズさせ、最終的に0.1 \times SSC で68℃、30分処理した。

5) 抗 *mK6irs* 抗体作製とウエスタンブロット

mK6irs のC末端における19アミノ酸残基 KDTLTKGSSLSTPSKKGGR (506-524) を合成ポリペプチドとして作製し、ウサギに免疫した。採取した抗血清

は上記の合成ポリペプチドでアフィニティ精製された。ウエスタンブロットのサンプルは、成長期後期のマウス皮膚を high salt buffer (1.5 M KCl, 10mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5 % Triton-X) 下でポリトロンホモジェナイザーにより粉碎し、15,000回転の遠心後、沈殿を lysis buffer (8 M Urea, 25mM 2-ME, 50mM Tris-HCl, pH 9.0) に溶解し、さらに35,000回転の遠心後の上清より得られた。これを10% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは10%スキムミルクを含む TBS-0.1 % Tween 20 でブロッキング後、20,000倍希釈の抗 *mK6irs* 抗体につづいて1,000倍希釈の抗ウサギ免疫グロブリンでそれぞれ室温で1時間反応させ、ECL ウエスタンブロットング検出システム (アマシャムファルマシアバイオテク) で検出した。

6) 免疫組織化学

生後21日から42日目の BALB/cAnNCrj マウスより採取された背部皮膚を4%パラホルムアルデヒドで固定した後パラフィン包埋し、5 μ m 厚の切片を作製した。これらの切片を脱パラフィン後、6,400倍希釈の抗 *mK6irs* 抗体を用いて室温で2時間反応させた。洗浄後、ビオチン標識2次抗体 (ニチレイ) により室温で1時間インキュベートし、ジアミノベンチジンを基質として発色させた。

結 果

1. 成長期中期に特異的な発現を示す cDNA の分離およびその完全長塩基配列の同定

休止期 (生後21日)、成長期初期 (生後24日)、および成長期中期 (生後27日) のマウス背部皮膚から抽出された total RNA を differential display により解析した。約1000本の band が確認され、その中で成長期中期にのみ認められる band から cDNA を抽出した (図1)。この cDNA は約300塩基対からなり、3' 末端にポリ A 配列を含んでいた。したがって、5' 端領域を同定するために5' RACE 法を施行し全塩基配列を決定した。この完全長の cDNA は2193塩基対より構成され、52番目の ATG を開始コドンとして計524個のアミノ酸残基からなり、分子量57.4 KDa、等電点6.63の蛋白質をコードすることが予想された (図2)。

2. ノーザンブロット

differential display で分離された cDNA のマウス毛周期における発現を明らかにするため、ノーザンブ

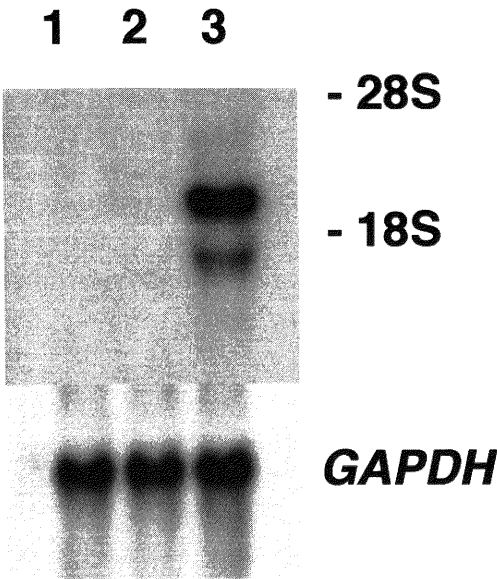


図 3 各毛周期における *mK6irs* mRNA の発現
マウス背部皮膚から抽出された total RNA を 1.5 %ホルムアミドゲルで電気泳動後、ナイロンフィルターに転写した、³²P 標識した *mK6irs* の 3' 非翻訳領域をプローブとしてハイブリダイズさせた。lane 1 : 休止期, lane 2 : 成長期初期, lane 3 : 成長期中期。成長期中期にのみ 1.8 kb と豊富な 2.2 kb の転写産物の発現を認める。

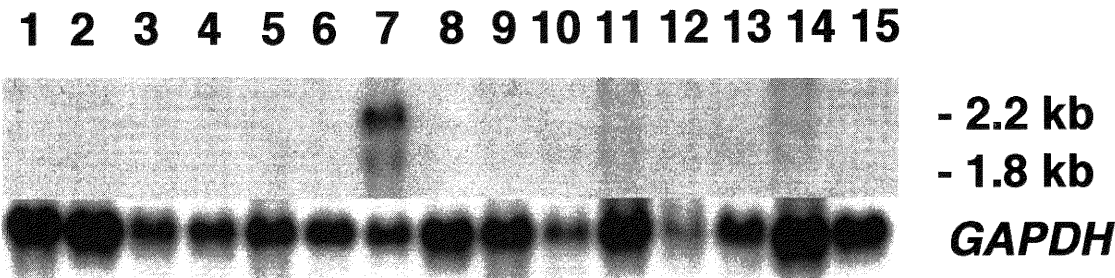


図 4 各組織における *mK6irs* mRNA の発現
1 : 脳, 2 : 舌, 3 : 食道, 4 : 前胃, 5 : 後胃, 6 : 小腸, 7 : 皮膚, 8 : 肝臓, 9 : 腎臓, 10 : 脾臓, 11 : 心臓, 12 : 肺, 13 : 胸腺, 14 : 筋肉, 15 : 目。皮膚にのみ 1.8 kb および 2.2 kb の転写産物の発現を認める。

表 1 *mK6irs* およびマウスタイプ I, タイプ II cytokeratin のアミノ酸配列の相同性 (%)

	<i>mK6irs</i>	タイプ II				タイプ I					
		<i>mK1</i>	<i>mK4</i>	<i>mK6</i>	<i>mK8</i>	<i>mK10</i>	<i>mK12</i>	<i>mK13</i>	<i>mK14</i>	<i>mK15</i>	<i>mK18</i>
<i>mK1</i>	49										
<i>mK4</i>	56	52									
<i>mK6</i>	55	54	59								
<i>mK8</i>	48	44	51	53							
<i>mK10</i>	26	36	30	31	30						
<i>mK12</i>	26	23	28	25	29	48					
<i>mK13</i>	28	25	29	26	29	51	51				
<i>mK14</i>	21	16	22	19	23	39	45	49			
<i>mK15</i>	28	25	30	28	29	50	51	72	51		
<i>mK18</i>	25	20	25	23	29	33	38	41	38	44	
<i>mK19</i>	23	19	25	22	27	43	47	61	49	59	44

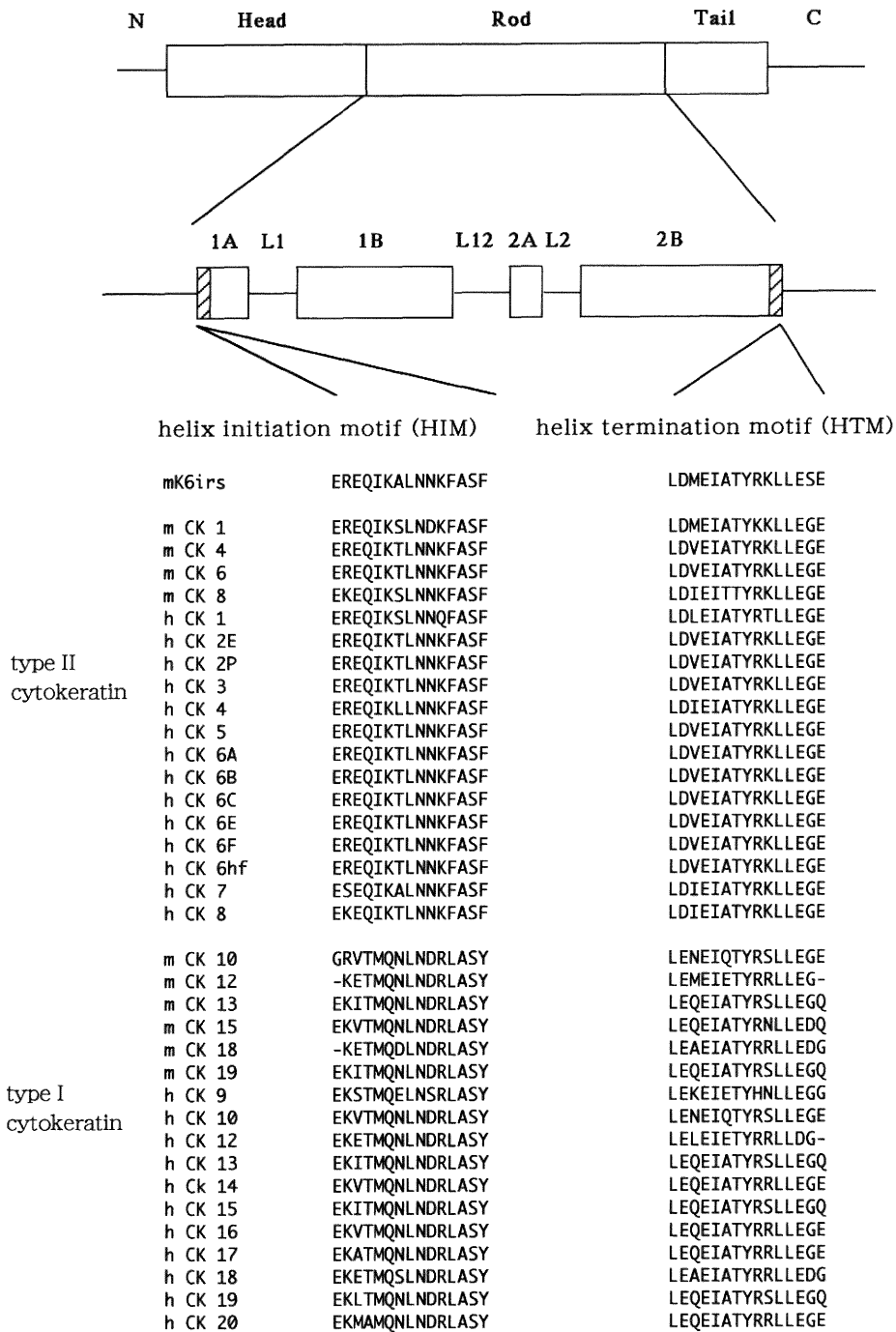


図5 ケラチン蛋白の二次構造および HIM, HTM のアミノ酸配列

rod domain の両末端部分に位置する helix initiation motif (HIM) および helix termination motif (HTM) を斜線で示す。これらの領域はケラチン蛋白に認められる共通配列であるが、mK 6 irs はタイプⅡの HIM, HTM とほぼ一致する。m: mouse, h: human, CK: cytokeratin

上明らかであり、今回同定されたアミノ酸配列はタイプⅠケラチン (21-28%) に比べタイプⅡケラチン (48-56%) との相同性が高いことが示された。さらにこの配列はケラチン蛋白に共通して存在することが確認されている rod domain 両末端部の helix initiation motif (HIM) と helix termination motif (HTM) を有しており、タイプⅡケラチンの HIM, HTM とほぼ一致していた (図 5)。以上の所見は、この cDNA がケラチン蛋白をコードすることを強く示唆するものである。したがって、以下の免疫組織の結果と合わせてこの cDNA がコードする蛋白を mK 6 irs と命名した。

4. イムノブロットによる mK 6 irs の特異的反応の確認

mK 6 irs の C 末端19アミノ酸残基からなる合成ポリペプチドより、mK 6 irs に対する抗体を作製した。この抗体により成長期後期のマウス皮膚をサンプルとしたウエスタンブロットでは約57kDa に単一の band が検出され、これは mK 6 irs の予想分子量に一致していた。また、免疫前血清で band は認めなかった (図 6)。

5. 免疫染色による mK 6 irs の皮膚における分布

mK 6 irs のマウス皮膚における発現部位を明らかにするため、抗 mK 6 irs 抗体を用いて各毛周期の皮膚に対して免疫組織学的に検討した。mK 6 irs は休止期から成長期中期まで検出されなかったが、成長期後期では内毛根鞘の毛球部上部から毛峽部に至るまでその発現が認められた (図 7a)。mK 6 irs は毛球部上部では内毛根鞘のヘンレ層に、毛峽部ではハックスレー層に分布していた (図 7b, c)。横断面でも毛峽部のレベルではハックスレー層における分布を示したが (図 7e)、毛幹および外毛根鞘には染色像を認めず、免疫前血清では mK 6 irs は検出されなかった (図 7d, f)。

考 察

differential display 法は特定の細胞や組織に特異的に発現される遺伝子、あるいは発生学的に特定の分化段階において発現される遺伝子を分離するために非常に有効な方法である¹¹⁾。本法はディファレンシャルスクリーニングの中では比較的容易に短時間で結果が得られ、さらにいくつかのサンプルを同時に検討することが可能である。また、PCR を利用するために cDNA ライブラリーの作製が困難である微量な RNA サンプル間においても、発現量に差のある遺伝子を同定することが可能である。今回私はこの differential display 法を毛周期において異なる時期のマウス皮膚に施行し、その成長

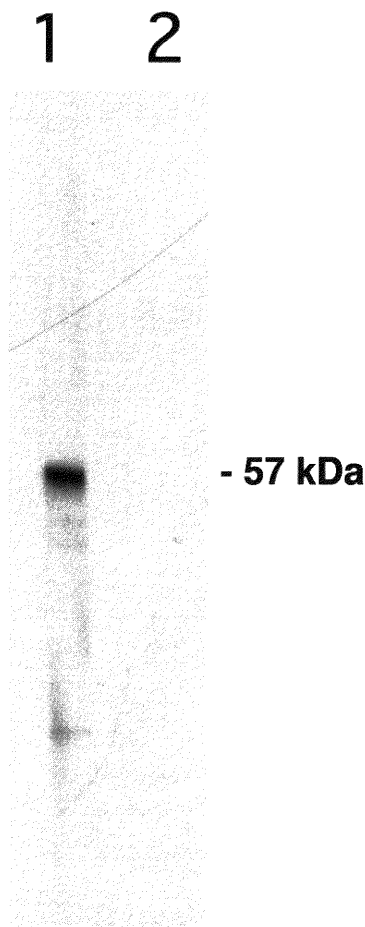


図 6 抗 mK 6 irs 抗体を用いたイムノブロット

成長期後期のマウス皮膚から抽出された蛋白を SDS-PAGE で分離し、抗 mK 6 irs 抗体を用いてイムノブロットを行った。57kDa に monospecific な反応を示す (1) が、免疫前血清を用いた negative control では反応を示さない (2)。

期中以降に発現が認められる cDNA を分離した。さらに、5'RACE 法により同定された完全長の cDNA 塩基配列の解析から、新規のケラチン蛋白をコードすることが判明した。

ケラチンはその発現部位に基づいて毛幹を構成する hair keratin とそれ以外の表皮を構成する cytokeratin

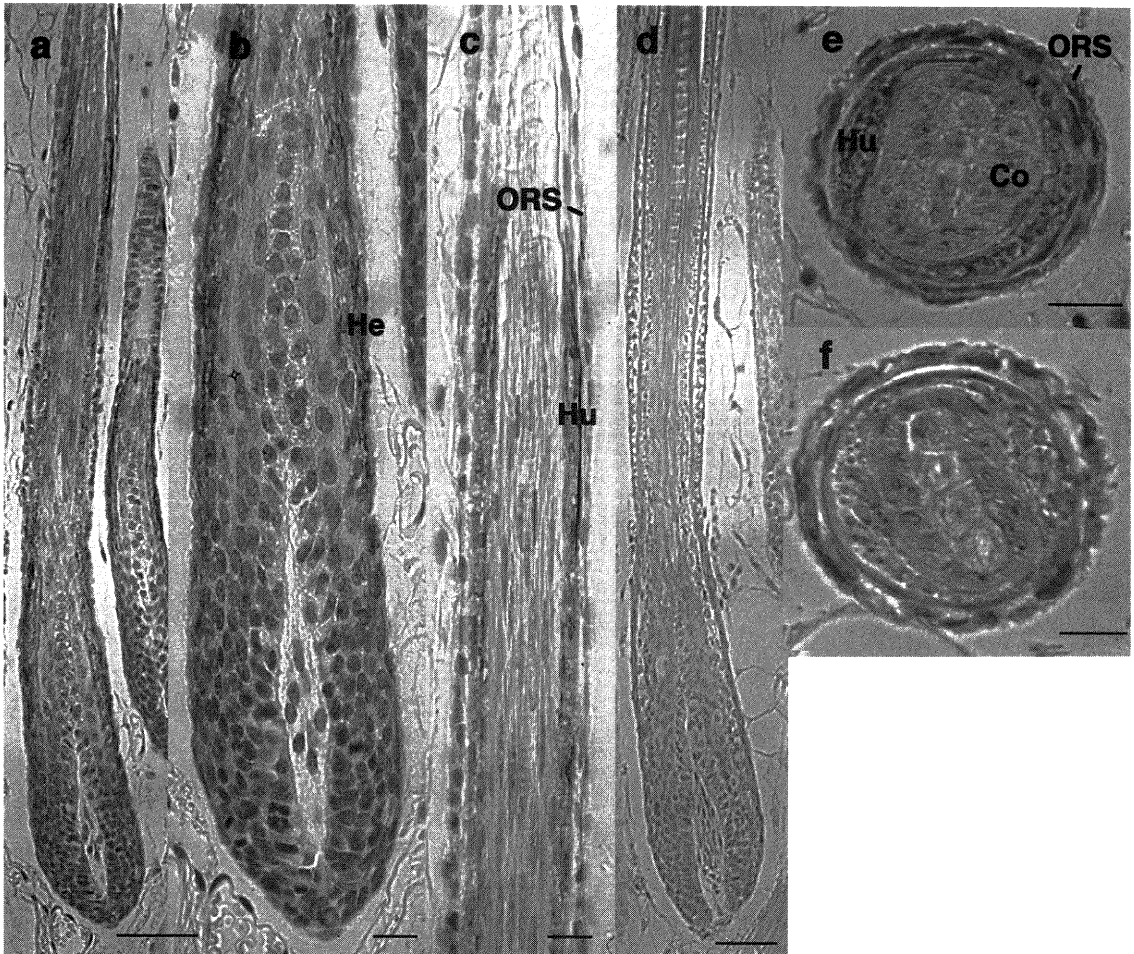


図7 抗 mK 6 irs 抗体を用いた免疫組織染色

成長期後期のマウス背部皮膚の毛包の縦断面 (a~d) と横断面 (e, f). 毛球部上部から毛峽部にかけて mK 6 irs の発現を認める (a). 毛球部上部のヘンレ層から始まり、角化帯のハックスレー層に至るまでその発現を認める (b, c). 横断面でも同様の所見を認めるが、毛幹および外毛根鞘には染色像を認めない (e). 免疫前血清を用いての negative control では縦断面 (d), 横断面 (f) とともに mK 6 irs は検出されない。

He: Henle's layer, Hu: Huxley's layer, ORS: outer root sheath, Co: cortex. Scale bars: (a, d): 100 μ m. (b, c, e, f): 50 μ m.

に分類されてきた。一方, Moll らはその生化学的特徴を利用してケラチンを二次元電気泳動により2つのタイプに分類し、酸性 (pH 4.9~5.4) で分子量が40~56.5 kDa と比較的小さいグループをタイプIケラチン、中性~塩基性 (pH 6.1~7.8) で分子量が53~68 kDa と大きいグループをタイプIIケラチンとした。さらにこれらのケラチンを分子量にしたがって番号を付け、

cytokeratin を11種類 (K 9~19) のタイプIと8種類 (K 1~8) のタイプIIとに分類した¹²⁾。同様に hair keratin も酸性のタイプIと塩基性のタイプIIに分類されている¹³⁾。一方, Hanukoglu らによりヒト表皮のタイプIIケラチンの cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、 α -ヘリックス構造からなる rod domain とその両端の非 α -ヘリックス構造からなる

head domain, tail domain の3つの domain に大別され、さらに rod domain 内の特定の位置に β シート (あるいは β ターン) 構造が存在することから rod domain が4つの subdomain に分類されることが解析された¹⁴⁾。また、現在までに40種類以上のケラチンの塩基配列がヒトおよびマウスで同定されているが、アミノ酸組成上 hair keratin はその head および tail domain にシステイン残基 (9–22%) が豊富であるのに対して、cytokeratin は同領域にグリシン残基 (2–57%) とセリン残基 (5–44%) を豊富に含有していることが示された。今回分離されたケラチンはそのアミノ酸組成から head と tail の両 domain にグリシンとセリン残基を多く含み、かつシステイン残基に乏しいことから cytokeratin のメンバーであると考えられる。さらに、このケラチンの予想等電点6.63とイムノプロットによる分子量57KDa という所見はタイプII cytokeratin であることを示唆する。

現在まで報告されているヒトおよびマウス cytokeratin のアミノ酸配列の解析から、タイプIケラチンおよびタイプIIケラチンはそれぞれ同じグループ内のケラチンとは高い相同性を示す (33–72%) のに対して、異なるタイプ間 (タイプIとタイプII) ではその相同性が低い (16–36%) ことが判明した (表1)。一方、ケラチン蛋白は rod domain 両末端部に約20個のアミノ酸残基からなる HIM および HTM と呼ばれる共通配列を含んでいる。これらの配列はヒトとマウスの種間で非常によく保たれており、ケラチン線維間の結合に関わる領域であることが知られている。臨床的にも同領域の点突然変異は先天性表皮水疱症や捻転毛などの先天性皮膚疾患の原因となることが報告されている^{15)–17)}。この HIM および HTM はタイプI、タイプIIケラチンそれぞれのグループ内でさらに相同性の高いアミノ酸配列を持つことが確認されている。今回分離されたケラチンはアミノ酸配列上タイプIIケラチンのグループと明らかに高い相同性を示し、さらにその HIM および HTM はタイプIIのそれとほぼ一致していた (図5)。したがって、これらの所見からこのケラチンはタイプIIケラチンに所属すると考えられる。

ヒトとマウスの間で orthologous なケラチンのアミノ酸配列は rod domain だけではなく、head と tail の両 domain においても80–90%と非常に高い相同性を持つことが解析上明らかとなった。これらヒトおよびマウスの既知のタイプII cytokeratin と今回分離したケラチンとの相同性は、rod domain に限局し

て比較した場合、ヒト K3, K4, K5, K6a–c, 6e, 6f (70%) とが最も高値を示した。さらに、head domain に限局した場合、ヒト K4, K6a, 6b, 6f, 6hf (45–48%) とが最も高く、同様に tail domain でも、ヒト K4, K6a, 6b, 6c, 6f, 6hf (35–36%) との相同性が最も高値であった。

今回分離されたケラチンはアミノ酸配列において K4 と K6 に最も高い相同性を示したが、K4 は粘膜上皮固有のケラチンであり、舌、食道、および前胃に発現し、皮膚には存在しないことがウエスタンブロットにより判明している¹⁸⁾。一方、K6 はウエスタンブロット、免疫組織、および *in situ* ハイブリダイゼーションにより毛包に発現することが確認されている¹⁹⁾。最近、外毛根鞘最内層に発現する新たなヒトケラチンが同定された。そのアミノ酸配列はタイプII cytokeratin の K5 と K6 の双方に高い相同性を示したが、最終的にウエスタンブロットの所見からこのケラチンは K6 の isoform と判断され、K6hf とされた²⁰⁾。ヒト K6 の isoform としては K6a から 6f の6種類がすでに同定されていたが、K6hf 遺伝子はこれらとクラスターを形成していることが後に判明し、この所見はその命名が妥当であることを示した。

今回分離されたケラチンは皮膚に特異的に発現することがノーザンブロットにより確認された。さらに、その抗体を利用した免疫組織の所見から毛包を構成する内毛根鞘に分布することが判明した。したがってこれら一連の所見はこのケラチンが K6 の isoform である可能性を強く示唆し、これを mK6irs と命名した。本研究は今後、このケラチンにおけるヒト homologue の同定およびその脱毛性疾患における関連についてさらに解析を進める上での基盤となるものと考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり御校閲を賜りました伊藤雅章教授、直接御指導頂きました青木宣明助手、写真を作製して頂きました今井隆郎技官、技術的なアドバイスをしていただいた遺伝子実験施設の阿部貴子先生、桑野良三先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Ito, M.: Biologic roles of the innermost cell layer of the outer root sheath in human anagen hair follicle: further electron microscopic study. Arch Dermatol Res., 281: 254–259, 1989.

- 2) **John, P.S.:** Hair follicle keratins. In: George E. Rogers and Barry C. Powell (eds.) *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools*. CRC press: Florida, pp105~116, 1994.
- 3) **Dawber, R.:** Hair science. In: R. Dawber and D.V. NESTE. (eds.) *Hair and Scalp Disorders: Common Presenting Signs, Differential Diagnosis and Treatment*. Martin Dunitz: London, pp 1~21, 1995.
- 4) **Mischke, D.:** The complexity of gene families involved in epithelial differentiation. *Keratin genes and the epidermal differentiation complex*. *Subcell Biochem.*, **31**: 71~104, 1998.
- 5) **Knapp, B., Rentrop, M., Schweizer, J. and Winter, H.:** Three cDNA sequences of mouse type I keratins. Cellular localization of the mRNAs in normal and hyperproliferative tissues. *J Biol Chem.*, **262**: 938~945, 1987.
- 6) **Liu, C.Y., Zhu, G., Converse, R., Kao, C.W., Nakamura, H., Tseng, S.C., Mui, M.M., Seyer, J., Justice, M.J., Stech, M.E., Hansen, G.M. and Kao, W.W.:** Characterization and chromosomal localization of the cornea-specific murine keratin gene Krt 1. 12. *J Biol Chem.*, **269**: 24627~24636, 1994.
- 7) **Liu, C.Y., Zhu, G., Westerhausen-Larson, A., Converse, R., Kao, C.W., Sun, T.T. and Kao, W.W.:** Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development. *Curr Eye Res.*, **12**: 963~974, 1993.
- 8) **Knapp, B., Rentrop, M., Schweizer, J. and Winter, H.:** Nonepidermal members of the keratin multi-gene family: cDNA sequences and in situ localization of the mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 751~763, 1986.
- 9) **Leube, R.E., Bader, B.L., Bosch, F.X., Zimbelmann, R., Achtstaetter, T. and Franke, W.W.:** Molecular characterization and expression of the stratification-related cytokeratins 4 and 15. *J Cell Biol.*, **106**: 1249~1261, 1988.
- 10) **Chou, P.Y. and Fasman, G.D.:** Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol.*, **47**: 45~148, 1978.
- 11) **Liang, P. and Pardee, A.B.:** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.*, **257**: 967~971, 1992.
- 12) **Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R.:** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.*, **31**: 11~24, 1982.
- 13) **Heid, H.W., Werner, E. and Franke, W.W.:** The complement of native alpha-keratin polypeptides of hair-forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. *Differentiation.*, **32**: 101~119, 1986.
- 14) **Hanukoglu, I. and Fuchs, E.:** The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. *Cell.*, **31**: 243~252, 1982.
- 15) **Rothnagel, J.A., Dominey, A.M., Dempsey, L.D., Longley, M.A., Greenhalgh, D.A., Gagne, T.A., Huber, M., Frenk, E., Hohl, D. and Roop, D.R.:** Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. *Science.*, **257**: 1128~1130, 1992.
- 16) **Rothnagel, J.A., Traupe, H., Wojcik, S., Huber, M., Hohl, D., Pittelkow, M.R., Saeki, H., Ishibashi, Y. and Roop, D.R.:** Mutations in the rod domain of keratin 2e in patients with ichthyosis bullosa of Siemens. *Nat Genet.*, **7**: 485~490, 1994.
- 17) **Bowden, P.E., Haley, J.L., Kinsky, A., Rothnagel, J.A., Jones, D.O. and Turner, R.J.:** Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita. *Nat Genet.*, **10**: 363~365, 1995.
- 18) **Schweizer, J., Rentrop, M., Nischt, R., Kinjo, M. and Winter, H.:** The intermediate filament system of the keratinizing mouse forestomach epithelium: coexpression of keratins of internal squamous epithelia and of epidermal keratins in differentiating cells. *Cell Tissue Res.*, **253**: 221~229, 1988.
- 19) **Stark, H.J., Breikreutz, D., Limat, A., Bowden, P. and Fusenig, N.E.:** Keratins of the human hair follicle: "hyperproliferative" keratins consistently expressed in outer root sheath cells in vivo and in vitro. *Differentiation.*, **35**: 236~248, 1987.
- 20) **Winter, H., Langbein, L., Praetzel, S., Jacobs, M., Rogers, M.A., Leigh, I.M., Tidman, N. and**

Schweizer, J.: A novel human type II cytokeratin, 955~962, 1998.
K 6 hf, specifically expressed in the companion
layer of the hair follicle. J Invest Dermatol., **111**:

(平成12年 7 月14日受付)