

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	藤川 大基
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第582号
学位授与の日付	平成26年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Characterization of the human hair keratin-associated protein 2 ( <i>KRTAP2</i> ) gene family (ヒト毛ケラチン関連蛋白2ファミリーの解析)
論文審査委員	主査 教授 牛木 辰男 副査 准教授 三嶋 行雄 副査 教授 伊藤 雅章

### 博士論文の要旨

#### 背景・目的

毛髪の主要な構成蛋白は、毛ケラチンと毛ケラチン関連蛋白 (hair keratin-associated protein, KRTAP) であり、毛ケラチンと KRTAP が結合し合うことが強固な毛髪の形成に重要な役割を果たしていると推測されている。しかしながら、現在までこの両者の相互作用についての詳細な解析は行われていない。また、KRTAP の蛋白レベルでの特性や毛髪での発現パターンについてもほとんど明らかになっていない。KRTAP は多数の遺伝子ファミリーから構成されており、ヒトゲノム上に約 100 種類の KRTAP 遺伝子が同定されている。KRTAP 遺伝子の一部にはサイズの異なるさまざまな多型が存在することも知られている。今回、申請者らは、比較的可溶分画に移行すると予想された KRTAP2 ファミリーに着目し、その特性について解析を行った。

#### 方法

まず、日本人 100 人と白人 50 人の DNA を用いて PCR を行い、KRTAP2 遺伝子のサイズ多型の有無について解析した。

次に、ヒト毛髪から total RNA を抽出し、RT-PCR を行うことで、KRTAP2 遺伝子の mRNA レベルでの発現について解析した。

さらに、western blot (WB) 法と免疫染色法で、ヒト毛髪における KRTAP2 蛋白の発現について検討した。

最後に、in vitro での KRTAP2 蛋白の性質や KRTAP2 蛋白と毛ケラチンとの相互作用などについて解析するため、培養細胞 (HEK293T 細胞) や大腸菌に過剰発現させたそれぞれの蛋白を用いて WB 法、免疫沈降法、GST pull-down assay を施行した。

#### 結果・考察

KRTAP1、KRTAP4 遺伝子ファミリーには、遺伝子長の違いによるサイズ多型 (size polymorphism) が存在することが過去に報告されている。ヒト 17 番染色体上で、これら 2 つの遺伝子ファミリーの間に局在している KRTAP2 遺伝子ファミリーにも同様の多型が存在していると予想し、解析を行った。KRTAP2 遺伝子フ

ファミリーは、KRTAP2-1~2-4の4つの遺伝子で構成される。日本人100人と白人50人のDNAを解析した結果、KRTAP2-2遺伝子には2種類、KRTAP2-4遺伝子には3種類のサイズ多型がみられた。KRTAP2-2遺伝子の多型の一つは翻訳領域に15塩基の挿入がみられ、もう一つは同様の挿入に加え3'-非翻訳領域に配列の違いがみられた。KRTAP2-4遺伝子の多型はすべて3'-非翻訳領域の配列の違いであった。これら多型の頻度は民族間で違いがみられた。

次に、ヒト毛髪におけるKRTAP2遺伝子のmRNAレベルでの発現について解析した。ゲノムDNAでサイズ多型を有することが確認された被験者の毛髪からtotal RNAを抽出してRT-PCRを行ったところ、KRTAP2遺伝子はmRNAレベルで豊富に発現しており、KRTAP2-2とKRTAP2-4遺伝子のサイズ多型も反映して発現していることがわかった。

KRTAP2蛋白の毛髪での発現および局在を明らかにするために、抗KRTAP2抗体を用いてヒト毛髪から抽出した蛋白でのWBと、ヒト毛髪の凍結切片で免疫染色を施行した。WBにより、ヒト毛髪中に豊富にKRTAP2蛋白が発現していることが示され、免疫染色では、毛皮質の角化帯レベルに非常に強く特異的なシグナルが得られた。

続いてKRTAP2蛋白の特性を明らかにするために生化学的解析を行った。まず、培養細胞にKRTAP2-1蛋白を過剰発現させ回収した後、非還元下および還元下のそれぞれの条件で解析した結果、KRTAP2-1蛋白は互いに相互作用し合い、ダイマーやオリゴマーを形成していることが示唆された。また、免疫沈降法とGST pull-down assayで、KRTAP2-1蛋白同士の共沈が確認された。以上より、少なくともin vitroでは、KRTAP2-1蛋白同士が相互作用する性質を持つことが証明された。

上記に引き続き、in vitroにおけるKRTAP2蛋白と毛ケラチン蛋白との相互作用について解析した。まず、培養細胞に過剰発現させたkeratin 86 (K86)などの毛ケラチンとKRTAP2-1蛋白との免疫沈降を行い、共沈することが確認された。毛ケラチン以外にも、上皮系ケラチンであるK10、K71や、ケラチン以外の細胞骨格の構成成分である $\beta$ -actinとの免疫沈降も施行したが、どれも共沈はみられなかった。これらのことから、KRTAP2蛋白は毛ケラチンと特異的に強く結合する性質を持つと考えられた。

最後に、毛ケラチンのKRTAP2蛋白との結合部位について解析した。ケラチン蛋白は、head、rod、tailの3つの領域から構成される。K86の「head領域とrod領域」、「rod領域とtail領域」、「rod領域のみ」のように、それぞれ蛋白の一部のみを培養細胞に発現させ、KRTAP2-1蛋白との免疫沈降を施行すると、「head領域とrod領域」のみ全長のK86と同様にKRTAP2-1蛋白との共沈がみられた。また、K86のhead、rod、tail領域のそれぞれのGST融合蛋白を大腸菌に発現させ、培養細胞に過剰発現させたKRTAP2-1蛋白との間でpull down assayを施行したところ、head領域のみ共沈が確認された。これらのin vitroの解析結果より、KRTAP2蛋白と毛ケラチンとの結合には、毛ケラチンのhead領域が必須であることが示唆された。in vivoにおけるこれらの現象や、他のKRTAPファミリーが同様の性質を持つかについては更なる解析が必要であるが、今回の研究により得られた結果は、毛髪角化のメカニズムを明らかにするために重要な新知見である。

#### 審査結果の要旨

毛髪の主要な構成蛋白は、毛ケラチンと毛ケラチン関連蛋白 (KRTAP) であるが、毛髪形成におけるこれらの役割、および両者の相互作用については不明な点も多い。そこで、申請者らは、約100種類におよぶKRTAP遺伝子の中から、KRTAP2遺伝子ファミリーに着目し、その特性と毛髪形成における役割について検討した。

ヒト毛髪における KRTAP2 遺伝子は mRNA レベルで豊富に発現していた。また、KRTAP2 蛋白の毛髪での発現と局在を解析したところ、ヒト毛髪中に豊富に KRTAP2 蛋白が発現しており、特に毛皮質の角化帯レベルに認められた。生化学的に解析では、KRTAP2-1 蛋白同士が相互作用を持ち、ダイマーやオリゴマーを形成していることが示された。さらに、免疫沈降法により KRTAP2 蛋白が毛ケラチンと特異的に強く結合する性質を持つことが示され、一方で培養細胞を用いた解析から、KRTAP2 蛋白と毛ケラチンとの結合には、毛ケラチンの head 領域が必須であることが示された。

以上の結果は、KRTAP2 蛋白のホモポリマー形成およびケラチンとの結合性について新たな知見を与え、KRTAP2 蛋白が毛髪角化のメカニズムに重要な役割を果たすことを初めて示したもので、この点に本論文の学位論文としての価値を認める。