

論文名 : Characterization of the human hair keratin-associated protein 2 (KRTAP2) gene family. (ヒト毛ケラチン関連蛋白 2 ファミリーの解析)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 藤川 大基

背景・目的

毛髪的主要な構成蛋白は、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 β -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。