

氏名(本籍)	菅野実穂(福島県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 756号
学位授与日付	平成 20年 3月 25日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	p120-catenin is a Novel-Desmoglein 3 Interacting Partner: Identification of the p120-catenin Association Site of Desmoglein 3
審査委員	(主査) 教授 北島康雄 (副査) 教授 國貞隆弘 教授 中川敏幸

### 論文内容の要旨

#### 【背景】

p120-catenin(p120ctn)はカテニンファミリーに属し、カドヘリンの細胞内ドメインにアルマジロリピートを介して結合するタンパク質で、カドヘリンを膜表面に安定化し、Adherens Junction (AJ)の細胞接着を調節している。我々はAJが表皮細胞の細胞間接着に重要な役割を果たすデスモソームと構造が類似していることに着目し、デスモソームの構成成分で、カドヘリンと同じ膜貫通型タンパク質であるDesmoglein(Dsg)にp120ctnが結合し、細胞間結合を調節している可能性があるかと仮説をたてた。

#### 【目的】

我々は、上記仮説を証明し、デスモソームにおけるp120ctnの機能を明らかにするために以下の研究を行った。

#### 【方法】

- 1) Dsg3とp120ctnの結合の検討: 内因性のDsg3とp120ctnの結合を証明するため、正常表皮細胞の細胞抽出液を用いた抗Dsg3抗体による免疫沈降物を抗p120ctn抗体でウエスタンブロットした。次にHEK293細胞に共発現させたp120ctn-HAとwild type Dsg3-Flagの結合性を免疫沈降ウエスタンブロット法にて検討した。さらに結合様式が直接か間接かを検討するために、精製したDsg3-Flagとp120ctn-GSTをin vitroで作用させ、免疫沈降ウエスタンブロット法で検討した。
- 2) Dsg3とp120ctnの細胞内局在の検討: 正常表皮細胞と有棘細胞癌由来細胞株(DJM-1細胞)を抗p120ctn抗体と抗Dsg3抗体、もしくはデスモソームのマーカーである抗デスモブラキン抗体で二重染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。DJM-1細胞に発現させたリコンビナントDsg3-Flagと、内因性p120ctnの局在も同様に検討した。
- 3) Dsg3のp120ctn結合部位の同定: Dsg3のp120ctn結合部位を同定するため以下に示す様に変異Dsg3-Flagを作成した。AA1-810Dsg3: 1/3のIntracellular cadherin-typical sequence(ICS)領域が欠失, AA1-761Dsg3: 2/3のICS領域が欠失, AA1-714Dsg3: ICS領域全体が欠失, AA1-641Dsg3: ほぼ全ての細胞内領域が欠失, Δ641-714: 641番目から714番目のIntracellular Anchor(IA)領域が欠失。Tagを認識する抗体を用いた免疫沈降ウエスタンブロット法でmutant Dsg3-Flagとp120ctn-HAの結合性を検討した。
- 4) p120ctnの機能解析: Dsg3に対してp120ctnの結合がDsg3の細胞内局在に与える影響を検討するために、DJM-1細胞に発現させた変異Dsg3-Flagと内因性p120ctnの局在を二重染色し、共焦

点顕微鏡で観察した。

さらに、p120ctn 結合部位欠損変異 Dsg3-Flag の細胞内動態を検討するために、Dsg3 $\Delta$ 641-714 を COS7 細胞に発現させ 4°C でビオチンラベル後、37°C 一定時間培養した。回収した細胞可溶成分に含まれるビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで沈降し、抗 Flag 抗体によるウェスタンブロット法にて検討した。

#### 【結果】

- 1) Dsg3 と p120ctn の結合性および結合様式: 内因性の Dsg3 と p120ctn および HEK293 細胞に遺伝子導入により共発現させた Dsg3 と p120ctn は結合した。精製した Dsg3-Flag と p120ctn-GST の *in vitro* での結合はみられず、Dsg3 と p120ctn の結合は他の分子を介した間接的な結合である可能性が示唆された。
- 2) Dsg3 と p120ctn の細胞内局在: 内因性およびリコンビナントタンパク質ともに p120ctn と Dsg3 は、細胞間の接着部位に共局在していた。しかしながら、p120ctn はデスモソームのマーカーであるデスマブラキンは完全には共局在しなかった。
- 3) Dsg3 の p120ctn 結合部位の同定: p120ctn は、Dsg3 の細胞内領域 IA ドメインを含む 641-714AA を欠損した mutant Dsg3 と結合しなかった。この結果から、p120ctn の Dsg3 結合部位は 641-714AA 領域に含まれることが示唆された。
- 4) p120ctn 結合部位の機能解析: 641-714AA 領域のない Dsg3 は細胞内で p120ctn と共局在しなくなり、細胞膜での発現が低下し細胞質に局在した。 $\Delta$ 641-714Dsg3 はビオチンラベルされ wild type Dsg3 に比べ短時間で分解された。

#### 【結論・考察】

p120ctn は、細胞膜上に発現しているがデスモソームに組み込まれていない Dsg3 の細胞内ドメインの 641-714AA 領域に間接的に結合する。また、Dsg3 の p120ctn 結合領域は、Dsg3 の細胞膜での発現に必要であり、その領域に結合する p120ctn がデスモソームに組み込まれる前の Dsg3 量を調節している可能性がある。これまでに我々は自己免疫性水疱症である天疱瘡で、自己抗体が Dsg3 に結合後、細胞膜に発現している Dsg3 が選択的に分解され、最終的に Dsg3 のないデスモソームが形成され、表皮細胞間接着力が低下することを見いだしている。このことは、細胞膜にプールされている Dsg3 が選択的に分解し減少することが、二次的に Dsg3 のないデスモソームを形成することを示している。

これらの知見から総合的に判断すると、p120ctn は細胞膜にプールされている Dsg3 を安定して発現させることにより、デスモソームに組み込まれる Dsg3 量を調節し、間接的に表皮細胞の細胞接着性を制御している可能性が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 菅野 実穂は、p120ctn がデスモソームカドヘリンである Dsg3 にも結合し、その分解を調節する働きがあることを明らかにした。本研究の成果は、デスモソームの調節機構解明の一助となり、細胞接着障害で生じる皮膚疾患の病態の解明に寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

p120-catenin is a Novel-Desmoglein 3 Interacting Partner: Identification of the p120-catenin Association Site of Desmoglein 3  
Experimental Cell Research (in press).