

正常犬とアトピー性皮膚炎罹患犬における
フィラグリン遺伝子に関する研究

2013年

岐阜大学大学院連合獣医研究科
(東京農工大学)

神 田 聡 子

目次

第1章. 緒言	1
図表	9
第2章. イヌのプロフィラグリン(Profilaggrin)のアミノ酸モチーフおよびドメイン解析	
1. 序論	12
2. 材料および方法	16
1) ゲノム DNA 配列	
2) DNA サンプル	
3) サザンブロット法	
4) PCR 法	
5) 塩基配列解析	
3. 結果	22
1) ゲノムデータベースに掲載されたイヌ <i>FLG</i> 遺伝子の相同性解析	
2) Dot matrix 法を用いたイヌ <i>FLG</i> 遺伝子内の反復配列の解析	
3) ヒト, マウス, イヌに由来する proFLG のアミノ酸ドメインおよびモチーフ解析	
4) サザンブロット法によるイヌ <i>FLG</i> 遺伝子中の反復配列数の解析	
5) イヌ <i>FLG</i> をコードする遺伝子の多様性に関する解析	
4. 考察	31
5. 小括	35
6. 図表	38
第3章. 抗イヌ FLG 抗血清の作製とイヌ皮膚における FLG の発現解析	
1. 序論	49
2. 材料および方法	51
1) 抗イヌ FLG 抗血清の作成	
2) イヌおよびマウス表皮からの蛋白抽出	
3) 組織染色および免疫組織化学染色	
4) ウェスタンブロット法	
3. 結果	55

1) 抗イヌ FLG 抗血清を用いた FLG のイヌ皮膚における組織学的局在の解析	
2) イヌ FLG の分子量の検討	
3) CAD の病変部皮膚における FLG の発現解析	
4. 考察	57
5. 小括	61
6. 図表	62

第 4 章. イヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列決定および遺伝子変異の検索

1. 序論	70
2. 材料および方法	72
1) DNA サンプル	
2) FLG repeat 領域外の塩基配列解析	
3) イヌ <i>FLG</i> 遺伝子ハプロタイプと CAD との association study	
4) FLG shotgun 法	
5) 次世代シーケンサー (Miseq) に用いる被検材料の調整	
6) 解析ソフト	
3. 結果	77
1) FLG Repeat 領域外の塩基配列解析	
2) イヌ <i>FLG</i> 遺伝子のハプロタイプと CAD との association study	
3) FLG shotgun 法を用いたイヌ <i>FLG</i> 遺伝子の塩基配列解析	
4) 次世代シーケンサーを用いたイヌ <i>FLG</i> 遺伝子変異の検索	
4. 考察	83
5. 小括	85
6. 図表	88

第 5 章. 総括

参考文献	111
謝辞	126

Abbreviation list

AD; atopic dermatitis; アトピー性皮膚炎

CAD; canine atopic dermatitis; イヌアトピー性皮膚炎

CRNN; Cornulin

EDC; epidermal differential complex

FLG; filaggrin; フィラグリン

FLG2; Filaggrin2; フィラグリン 2

HRNN; hornerin; ホルネリン

H & E; haematoxylin and eosin; ヘマトキシリン・エオジン染色

ORF; open reading frame; 翻訳領域

proFLG; profilaggrin; プロフィラグリン

RPTN; repetin

SNPs; single nucleotide polymorphisms; 一塩基多型

THH; trichohyalin; トリコヒアリン

WGS; whole genome shotgun; 全ゲノムショットガン

第1章 緒言

皮膚は動物の身体全体を覆い外界と接している臓器であり、生体内の水分や電解質の喪失を防ぐとともに、生体を外部環境から防御している。また、皮膚には柔軟性、可塑性、強靱性が備えられ、外形を保持し運動を可能にするなど生体に必須である様々な機能を担っている。皮膚は最外層から表皮、真皮および皮下組織から成り立っている。表皮は皮膚の最外層に重層扁平上皮として存在し、組織学的に2-3細胞層から構成されているが、その厚さはイヌでは約0.1-0.5 mmである(1)。表皮の構成細胞のほとんどはケラチノサイト(約85%)であるが、その他にメラノサイト(約5%)、ランゲルハンス細胞(3-8%)、メルケル細胞(約2%)が存在する。表皮の主な構成細胞であるケラチノサイトは、基底層で増殖した後に表層へと移動し、分化とともに有棘層および顆粒層へと形態を変化させる(1)。顆粒層のケラチノサイトは最終的に脱

核した後、角層を形成し、皮表から脱落する。この一連の過程は皮膚の“ターンオーバー”と呼ばれている。

哺乳類の角層は生体の防御に重要な機能であるバリア機能を有し、物理学的、化学的ならびに生物学的な刺激から生体を防御するとともに、生体内の水分を蒸散させないように保持するという役割を有している (2)。角層は角質細胞ならびにそれらの間を埋める細胞間脂質 (セラミド, 脂肪酸, コレステロール) から構成されている (Figure 1)。

フィラグリン (filaggrin: FLG) やケラチンなどの角層内タンパク, 角質細胞を裏打ちする周辺帯 (cornified cell envelope) と細胞間脂質の関係はレンガとモルタルに例えられており, 角質細胞というレンガの隙間を埋めるようにモルタルに相当する細胞間脂質が存在している(3)。角質細胞ではケラチンと FLG が角層の骨格を作り, それらを支えるように周囲をロリクリン, インボルクリン, small proline-rich protein

(SPRs) が取り囲んで周辺帯を形成する。インボルクリンと細胞間脂質とは共有結合することが知られている(4)。

FLG は顆粒細胞のケラトヒアリン顆粒において、前駆体物質であるプロフィラグリン (profilaggrin: proFLG) として合成される。proFLG は角化の過程で脱リン酸化やチロシンキナーゼなどのタンパク分解酵素で分解されて機能性タンパクである FLG となる。この FLG が角質細胞においてケラチン線維を凝集し整列させる役割を果たすことが知られている(5~7)。やがて FLG はピロリドンカルボキシル酸やウロカニン酸などの吸水性アミノ酸に分解され、これらは天然保湿因子として皮膚の保湿や紫外線からの生体防御に関わっている(2) (Figure 2)。

一部の皮膚疾患では、角層の形成異常による皮膚バリア機能の低下が病態に関与すると考えられている。例えばヒトの尋常性魚鱗癬は皮膚の乾燥と過剰な鱗屑を主体とする疾患であるが、電子顕微鏡による観察でケラトヒアリン顆粒の減少および角層の形成異常が認められることが証明されている(7)。近年の研究では、本症に罹患した患

者において *FLG* 遺伝子の変異に起因して *FLG* の発現低下がみられることが明らかになった(8)。また皮膚の乾燥や過剰な鱗屑を主徴とする *flaky tail* マウスにおいても、*Flg* 遺伝子の変異により *FLG* の発現低下がみられることが証明されている(9)。さらに *Flg* 遺伝子ノックアウトマウスでは、角層の脆弱性や角層の透過性が上昇するとともに、抗原による経皮感作により野生型マウスよりも血清 *IgE* 抗体価が上昇したとともに、ハプテンを塗布したことによるアレルギー性接触性皮膚炎様の症状が認められたことが報告されている(10)。

ヒトでは尋常性魚鱗癬に罹患した患者の多くがアトピー性皮膚炎 (*atopic dermatitis*: AD) を合併することは従来から知られていた。そこでアイルランド、日本、シンガポールなどの様々な国と地域で AD 患者における *FLG* 遺伝子の変異を調べたところ、症例の約 25-47%で同遺伝子に変異が認められた(11~13)。これに対し健康人では、*FLG* 遺伝子の変異は約 7%の個体で認められたのみであった(11)。現在で

は *FLG* 遺伝子変異により角層に形成異常が生じ、環境中アレルゲンによる経皮感作が容易になることが、AD の発症に関与しているのではないかと考えられている(9, 10)。

イヌの AD (canine atopic dermatitis: CAD) は遺伝的な素因を有し、慢性の炎症と瘙痒を伴う皮膚疾患と定義されている。CAD は多因子性疾患であると考えられており(14)、その背景には遺伝的素因や皮膚バリア機能異常、免疫異常、環境要因などが存在すると考えられている(15~18)。CAD ではウエスト・ハイランド・ホワイトテリア、ラブラドル・レトリバーや柴犬など、特定の犬種での発生率が高いことから、遺伝的素因の関与が疑われている。また CAD の症例では慢性・反復性の瘙痒ならびに搔破行動に起因する皮膚炎が認められること、ならびに血清中において抗原特異的な IgE 抗体価の上昇がみられるなど、ヒト AD との類似点も多いと考えられている(19, 20)。CAD の発生率は地域と診断基準により異なるが米国では 3.3-27%、英国では 5%と報告されており(18)、小動物臨床の現場では比較的遭遇する機会の多いイヌの皮膚疾患である。また、ヒトでは生活の近代化に伴い細菌や寄生虫への暴露が減

少ししたことが AD の発生が増加しているという仮説があり、この仮説がイヌでも当てはまるのではないかと推論されている。さらに、イヌでは過剰な洗浄や抗菌剤配合の洗浄剤の使用などにより皮膚バリア機能に傷害が与えられた結果、CAD の発症率が増加している可能性が推測されている(18)。

ヒトで *FLG* 遺伝子変異による角層異常が AD の発症と関連していることを考えると、ヒト AD との類似点が多い CAD でも *FLG* 遺伝子に変異が存在している可能性は否定できない。近年、ヒトで AD との関連が示唆されている 25 候補遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) が、CAD とも関連しているかについてゲノムワイド関連研究を用いた検索が行われた(21)。その結果、英国におけるラブラドール・レトリバーの症例では、*FLG* 遺伝子の非翻訳領域に SNP がみられ、かつこの SNP の保有率と CAD との相関が高いことが示された(21)。しかしイヌでは、*FLG* の発現分布や *FLG* 遺伝子の塩基配列についてはこれまで詳細に解析されておら

ず、ヒト AD のように発生要因と直接関わる *FLG* 遺伝子の変異は未だ報告されていない。

そこで本研究ではイヌ *FLG* 遺伝子変異がイヌでも AD の発症と関連しているかを解明することを目的に、今まで知られていなかったイヌ *FLG* 遺伝子ならびにイヌ皮膚における *FLG* の解析をおこなった。まず、第 2 章においてイヌ *FLG* 遺伝子塩基配列から予想される pro*FLG* のドメイン解析を行い、過去に報告されているヒトやマウスの相同配列との比較を行った。

第 3 章では第 2 章で得られた pro*FLG* のアミノ酸配列情報をもとにイヌ *FLG* を認識する抗イヌ *FLG* 抗血清を作製し、イヌ皮膚における *FLG* の組織学的分布を解析した。また、前述の抗血清を用いて、イヌ皮膚からの抽出タンパクを基質としたウエスタンブロット法を行い、イヌ *FLG* の分子量を特定した。さらにこの抗血清を用い、CAD の症例における *FLG* の発現変化を免疫組織化学染色により評価した。

第4章ではイヌ *FLG* 遺伝子変異と CAD の関係を明らかにするために、イヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、イヌ *FLG* 遺伝子には3種類のハプロタイプが存在することを見いだしたことから、CAD に罹患した柴犬と健常な柴犬を対象とし、保有するハプロタイプのアレル頻度を元に“association study”を行った。さらにヒトで用いられている *FLG* shotgun 法、ならびに次世代シーケンサーを用いて *FLG* repeat の内部配列を詳細に解析するとともに、CAD 症例において *FLG* 遺伝子変異が同定できるか解析を試みた。

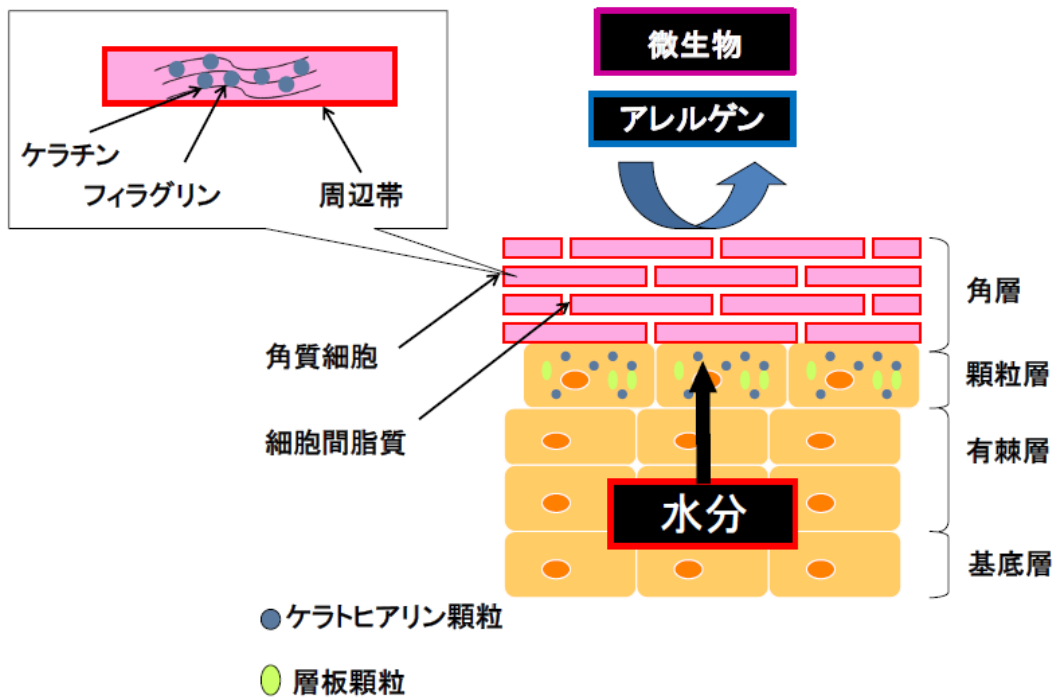


Figure 1. Schematic representation of the stratum corneum components and their

properties for cutaneous barrier function. Stratum corneum consists of

corneocytes and intercellular lipids, which act as enclosing barrier to prevent

invasion of microbes or allergens and evaporation of water from skin surface.

Corneocyte contains filaggrin, which aggregate keratins into tight bundles, and

cornified cell envelope.

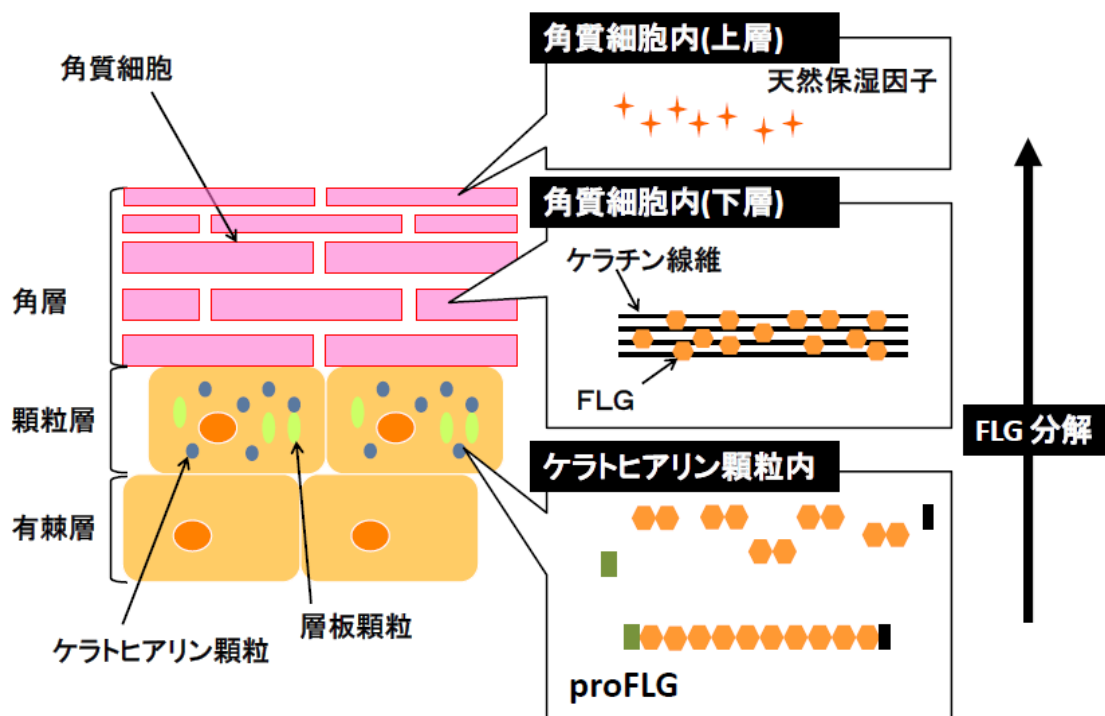


Figure 2. Production and processing of profilaggrin in the epidermis.

differentiation of proFLG. Profilaggrin (proFLG) is produced in keratohyalin granules of the stratum granulosum. During cornification, proFLG is degraded into functional protein filaggrin (FLG). The FLG aggregates keratin filaments into tight bundles in corneocytes. The FLG is further degraded into natural moisturizing

factors, which maintain skin hydration and prevent the skin from damages by ultraviolet, in the upper stratum corneum.

第2章 イヌプロフィラグリン(proFLG)のアミノ酸モチーフおよびドメイン解析

1. 序論

Epidermal differential complex (EDC) は複数の角層タンパクをコードする遺伝子を配列中に含む遺伝子群であり、それらの遺伝子の染色体上での位置関係が単孔類を除く哺乳動物の間で高度に保存されている。EDCに含まれる角層タンパクには、*FLG* 遺伝子の他にトリコヒアリン (trichohyalin: THH), repetin (RPTN), ホルネリン (hornerin: HRNN), cornulin (CRNN), フィラグリン 2 (filaggrin2: FLG2)などをコードする遺伝子などがある。これらのタンパクは fused S100 タンパクファミリーメンバーに属するが、いずれのタンパクも N 末端のアミノ酸配列が類似しており、またタンパクとしての構造が proFLG と類似しているため filaggrin-like protein (22)とも呼ばれる (Figure 3)。EDC はヒトでは *FLG* 遺伝子が染色体領域 1q21.3 に存在するのに対し、マウスでは染色体領域 3QF2.1 に存在する(9, 23)。ヒト同様マウスでも、

FLG 遺伝子は 3 つのエクソンから構成されており、その翻訳領域全長はエクソン 2 とエクソン 3 に存在するが、本配列の大多数を占める反復配列はすべてエクソン 3 の中に含まれている(23)。*FLG* 遺伝子の翻訳領域全長を構成する塩基長はヒトでは 12,747 bp、マウスでは 13,974 bp であることが過去の研究によって明らかになっている(9, 24)。

ヒトおよびマウスの proFLG には共通したアミノ酸モチーフやドメインが存在し、5'末端の N 末端領域と 3'末端の C 末端領域の間に、FLG の反復配列 (FLG repeat) が存在する。FLG の反復数は、ヒトでは 10-13 回であるのに対し、マウスでは系統によって異なり、129/SvJ マウスでは 12 回、NIH3T3 マウスでは少なくとも 20 回、flaky tail マウスでは 16 回、C57BL/6 マウスでは 17 回であると報告されている(9, 24~27) (Figure 2)。proFLG の N 末端領域には EF ハンドと呼ばれるモチーフが存在し、このモチーフは proFLG が Ca^{2+} の存在下で FLG へと分解される過程において重

要となると考えられている(24, 28)。また FLG の前後配列には FLG の部分配列からなる Truncated FLG(24, 28)が存在する (Figure 4)。

FLG は反復数ならびに反復配列を構成するアミノ酸数ともにヒト, マウス, ラットの間で保存されておらず, また翻訳アミノ酸配列もそれぞれの動物種で異なっていることが知られている。また同じ動物種では, 反復配列間の相同性が塩基配列レベルにおいて極めて高いことから反復配列に特異的なプライマーを設計することができず, そのため PCR 法により増幅された *FLG* 遺伝子の断片を用いて完全長の塩基配列解析を行うことは極めて困難であるとされてきた。また *FLG* 遺伝子の全長はヒト, マウスとも 10 kbp 以上であるため, 1 回の PCR 法で *FLG* 遺伝子全長を増幅することも極めて困難である。そこでヒトやマウスに由来する *FLG* 遺伝子全長の塩基配列を解読するための新たな手法が, これまでに開発されてきた。例えばヒト *FLG* 遺伝子全長の塩基配列解析を解析するための方法として, *FLG* 遺伝子の中でも塩基配列の相同性が低い領域に設計されたプライマーを用いた gene shotgun 法 (*FLG* shotgun 法) が過去

に開発された(25)。一方でマウス *Flg* 遺伝子全長の塩基配列解析を解析するための方法として、マウス *Flg* 遺伝子全長を含む BAC ベクターにトランスポゾン挿入してサブクローニングを行い、ランダムに挿入されたトランスポゾンの位置を参考にマウス *Flg* 遺伝子全長の塩基配列の再構築を行う方法が開発された(9)。

イヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列は過去に whole genome shotgun (WGS)法を用いて解読されており、第 17 番染色体に存在するとされている(29)。一方で WGS 法では、*FLG* 遺伝子の様に反復配列同士の相同性が塩基配列レベルで極めて高い場合は塩基配列の再構成が正しく行われないう可能性がある。そこで本研究では、過去に報告されたイヌ *FLG* 遺伝子がヒトやマウスに由来する *FLG* 遺伝子の相同配列であるか、さらに報告されているイヌ *FLG* 遺伝子のドメイン構造や反復配列の数、全塩基配列数などの詳細な情報について解析を行った。まずゲノムデータベースに掲載されているイヌ EDC のコンピューター解析を行った。次にデータベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列から各種アミノ酸モチーフやドメイン配列を予測し、ヒトやマウス

の相同配列と比較を行った。さらに実験室で飼育されているビーグル2頭を用いてイヌ *FLG* 遺伝子全長のゲノムサイズをサザンブロット法により解析した。コンピューター解析によって示されたイヌ *FLG* 遺伝子が示す反復配列の詳細を調べるため、犬種を CAD の好発犬種である柴犬に限定し、PCR 法を用いた解析を試み、同犬種における配列の多様性を解析した。

2. 材料と方法

1) ゲノム DNA 配列

イヌの *FLG* 遺伝子, *THH* 遺伝子, *RPTN* 遺伝子, *FLG2* 遺伝子および *CRNN* 遺伝子の配列については, CanFam2.0 データベース (CanFam2.0) (<http://www.ensembl.org>) に掲載されている配列を参考(28)にした。ヒト EDC 構成タンパクをコードする塩基配列のうち, *FLG* 遺伝子 (*NM_002016*), *THH* 遺伝子 (*NM_007113*), および *RPTN* 遺伝子 (*NM_001122965*) の配列については GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)に登録されている配列を、ヒト *FLG2* 遺伝子

およびヒト *CRNN* 遺伝子の配列については ensemble データベース

(<http://www.ensembl.org>) に掲載されている配列を参考にした。マウス EDC 構成

タンパクをコードする塩基配列のうち、*Flg* 遺伝子(9), (NM_001163098), *Rptn* 遺伝

子 (NM_009100) , *Crnn* 遺伝子 (NM_001081200), および *Thh* 遺伝子

(NM_001163098) の配列については GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)に登録されている配列を、マウス *Flg2* 遺伝子

については ensemble データベース(<http://www.ensembl.org>)に掲載されている配列

を参考にした。イヌ、ヒトおよびマウスの *THH* 遺伝子, *RPTN* 遺伝子, *FLG* 遺伝子,

CRNN 遺伝子, および *FLG2* 遺伝子の染色体上の位置関係については、データベース

(<http://www.ensembl.org>)に記載されている情報を元に確認した。さらにそれぞれの

塩基配列をアミノ酸に翻訳し、N 末端の翻訳アミノ酸配列を ClustalX

(<http://www.clustal.org>) (30)を用いて比較した。イヌ *FLG* 遺伝子内に反復配列が存

在するかを解析するため、dotter program (<http://www.acedb.org>) (31)を用いて Dot matrix 法により解析した。イヌ,ヒトおよびマウスに由来する *FLG* 遺伝子の N 末端領域, C 末端領域ならびに *FLG* の翻訳アミノ酸配列の比較には ClustalX (<http://www.clustal.org>) を用いた。

2) DNA サンプル

東京農工大学獣医内科学研究室で実験動物として飼育され、臨床的に皮膚病変が認められないビーグル犬 2 頭(A, B)から末梢血を採取した。採取した末梢血をクエン酸ナトリウムで処理した後、フェノール/クロロホルム法にて DNA の抽出を行った。抽出した DNA は、後述するサザンブロット法および塩基配列解析に用いられた。

また東京農工大学農学部附属動物医療センターならびに一般動物病院を受診した柴犬 20 頭から、飼い主の同意を得て末梢血を採取した。末梢血をクエン酸ナトリウムを用いて処理後、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation,

Madison, WI, USA)またはフェノール/クロロホルム法を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は後述する PCR 法に用いられた。本研究における全ての動物実験は、東京農工大学動物実験委員会が定める倫理規定に基づき実施された。

3) サザンブロット法

ビーグル犬から抽出した DNA を 2 種類の制限酵素 BspHI (New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA) および Bsp1407 I (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) とそれぞれ 37°C で一晩反応させ、制限酵素処理を行った (Figure 10:a)。制限処理後の DNA について、0.7% アガロースゲル中で電気泳動を行い、Biodyne® Nylon Transfer Membranes (Pall corporation, East Hills, NY, USA) に転写した。

イヌ *FLG* 遺伝子に特異的な DNA プローブを作成するため、同遺伝子の 751 bp から 1254 bp までを増幅するように設計された PCR プライマー (DogFLGexon3-86F: 5'-AATTCATGTTTGCCAAAATAGTG-3', DogFLGexon3_418R: 5'-

GAGATCCTGAGTCAGAGTGCCCAA-3')を用い(Figure 10;a), ビーグル犬から抽出した DNA を鋳型として PCR 法を行った。PCR 法の反応条件は, 94°C で 2 分を 1 サイクル, 94°C で 30 秒, 60°C で 1 分, 72°C で 4 分を 30 サイクル, 72°C で 5 分を 1 サイクルとした。増幅された DNA 断片を 1%アガロースゲルを用いて電気泳動し, 予測された分子量のバンドをゲルから切り出して Monofas® DNA 精製キット I (ジーエルサイエンス株式会社, Shinjuku, Japan) により PCR 産物を精製した。精製された PCR 産物に, dCTP (α -³²P) (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を BioProbe® Random Primed DNA Labeling System (Enzo Life Sciences, NY, USA)を用いて 37°C 下で 2 時間ラベルした。ラベルされたプローブをナイロン膜と 65°C で 1 晩反応させてプローブハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後に, ナイロン膜に転写されたイヌ *FLG* 遺伝子を, 富士イメージングプレート BAS-MS (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて可視化した。

4)PCR 法

イヌ *FLG* 遺伝子内の *FLG* 全長，同配列の N 末端側および C 末端側， N 末端領域および C 末端領域の塩基配列をそれぞれ増幅するためのプライマーを設計した (Table 1)。PCR の反応条件は 94°C で 2 分を 1 サイクル， 94°C で 30 秒， 63°C で 1 分， 72°C で 4 分を 30 サイクル， 72°C で 7 分を 1 サイクルとした。反応後の PCR 産物を 1%アガロースゲルにより電気泳動し，エチレンジウムブロマイドを用いて可視化した。

5) 塩基配列解析

上述の PCR 法により増幅されたイヌ *FLG* 遺伝子の N 末端領域および C 末端領域の PCR 産物について，ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, US)を用いて塩基配列解析を行った。塩基配列データの解析には codon code aligner (Codoncode corporation, Centerville, MA, US) を用いた。

3. 結果

1) ゲノムデータベースに掲載されたイヌ *FLG* 遺伝子の相同性解析

ゲノムデータベースに掲載されたイヌゲノム全塩基配列を解析したところ、第 17 番染色体に EDC および *FLG* 遺伝子の相同配列が存在することが確認された。また *FLG* 遺伝子の相同配列の前後には、THH, CRNN, FLG2 などをコードする遺伝子の相同配列も存在していた。EDC に含まれる遺伝子は染色体上での順番が哺乳類で保存されていた。さらにイヌ *FLG* 遺伝子の相同配列から予測される N 末端側の翻訳アミノ酸配列を、ヒトおよびマウスに由来する proFLG の N 末端側の翻訳アミノ酸配列と比較したところヒトとイヌの配列間における相同性は 75.6% (68/90 アミノ酸) であったのに対し、マウスとイヌ間における相同性は 60% (54/90 アミノ酸) であった。イヌ proFLG の N 末端側の翻訳アミノ酸配列を、EDC に存在する他の遺伝子と比較したところ、THH の N 末端とは 34.4% (31/90 アミノ酸) , RPTN の N 末端とは

40% (36/90 アミノ酸) , FLG2 の N 末端とは 57.8% (52/90 アミノ酸) , CRNN の N 末端とは 41.1% (37/90 アミノ酸) の相同性があった (Figure 5) 。イヌ *FLG2* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列の N 末端とヒトおよびマウス proFLG との相同性はそれぞれ 58.9%(53/90 アミノ酸)および 51.1%(46/90 アミノ酸)であり, いずれもイヌ *FLG* 遺伝子との相同性よりも低い値を示した。

2) Dot matrix 法を用いたイヌ *FLG* 遺伝子内における反復配列の解析

イヌ *FLG* 遺伝子の翻訳領域 (open reading frame: ORF) のうち, エクソン 2 に含まれる ORF の塩基配列長が 138 bp であるのに対し, エクソン 3 に含まれる ORF の塩基配列長は 8,508 bp であるとされている (Figure 7a) 。本章では前述の翻訳領域上に反復配列が存在するかを, イヌ *FLG* 遺伝子の ORF 全長を X 軸と Y 軸に配置した Dot-matrix 法により解析した(Figure 6)。その結果, ゲノムデータベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子の ORF には 1,647 bp あるいは 1,521 bp の 2 つのサブユ

ニットの組み合わせ (FLG repeat) が 4 回反復されており, さらにその N 末端側および C 末端側には前述の反復配列を短縮させた配列が存在した (Truncated FLG : Figure 7b)。さらに反復配列 1 単位の中に, 126 bp の短い反復配列が 4~5 回繰り返されていた (Figure 6, Figure 7b)。さらに Truncated FLG よりも N 末端側および C 末端側には, 反復配列とは異なる配列 (N 末端領域および C 末端領域) が存在した。

以上の結果より, イヌ *FLG* 遺伝子の翻訳領域はヒトやマウスの相同遺伝子と同様に N 末端領域 - Truncated FLG - FLG - Truncated FLG - C 末端領域で構成されることが示された。(Figure 7c)。さらに, データベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子の N 末端領域, C 末端領域および *FLG* の塩基長および塩基配列の正確性を確認するため, データベース上の配列をビーグル 2 頭(A, B)由来の PCR 産物が示す配列と比較したところ, SNPs 部位を除いて全て一致していた。

3) イヌ, ヒト, マウス proFLG のアミノ酸ドメインおよびモチーフ解析

イヌ proFLG の N 末端領域, C 末端領域および FLG の翻訳アミノ酸配列をヒトおよびマウスの相同配列とそれぞれ比較した。N 末端領域を構成するアミノ酸数は, イヌでは 188aa であったのに対し, ヒトで 293 aa, マウスで 283 aa とアミノ酸数が異なっていた。しかしながら EF ハンドを含む N 末端から第 92 アミノ酸までの配列の相同性は, ヒト proFLG との間では 77.2% (71/92 aa) , マウス proFLG との間では 56.5% (52/92 aa) と高かった(Figure 8; a)。次に, FLG のアミノ酸数を 3 種の哺乳動物間で比較したところ, イヌでは 549 aa であったのに対し, ヒトは 325 aa, マウスは 246 aa とアミノ酸数が多かった。

次に FLG のアミノ酸配列を 3 種の哺乳動物間で比較したが, アミノ酸配列の相同性は 3 種の動物間で低い値を示した。ヒトとイヌの間でアミノ酸配列が連続で保存されていたのは最大 5 アミノ酸で, 1 配列中に 2 か所認められたのみであった。マウスとイヌの間では, 連続して保存されていたのは最大 4 アミノ酸で, 1 配列中に 3 か所のみであった(Figure 8b)。

proFLG の C 末端領域のアミノ酸数および配列をイヌ、ヒトおよびマウスの間で比較したところ、イヌではアミノ酸数が 26 aa であったのに対し、ヒトは 157 aa、マウスは 39 aa であった(Figure 8c)。ヒトおよびマウスの同領域では、C 末端側の 27 アミノ酸残基のうち 10 アミノ酸が保存されており、特に C 末端ではチロシン残基が 4 つ連続して存在するが、これらのアミノ酸残基はイヌの配列中には認められなかった(Figure 8c)。

さらに本章では、FLG を構成するアミノ酸の組成について解析した。その結果、主要アミノ酸であるセリン、グリシン、アルギニン、グルタミン、ヒスチジンの構成比は、イヌではセリン(20.3~24.9%)、グリシン(13.8~15.9%)、アルギニン(11.1~13.8%)、グルタミン(10.2~15.0%)、ヒスチジン(7.7~11.4%)と、ヒトやマウスの相同配列における構成比と類似していることが示された (Figure 9)。

4) サザンブロット法によるイヌ *FLG* 遺伝子中の反復配列数の解析

ビーグル犬(A, B)2頭から抽出した後に制限酵素 (BspHI あるいは Bsp1407 I) で切断したゲノム DNA, ならびにイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列に相補的な DNA プローブを用いてサザンブロット法を実施した。その結果, ビーグル犬 A では 11 kbp 付近にバンドが認められたのに対し, ビーグル犬 B では 9.5 kbp および 12.5 kbp 付近に 2 本のバンドが認められた (Figure 10b)。ビーグル犬 A および B において分子量の異なるバンドが認められた理由を解析するため, イヌ *FLG* 遺伝子内の非反復領域である N 末端側と C 末端側を PCR 法で増幅し, 分子量の確認を行った (Figure 10a, c および d)。2 頭のイヌから得られた PCR 産物の分子量は N 末端側が 1,400 bp, C 末端側が 1,000 bp と 2 頭のイヌで一致していた。PCR 法で増幅した N 末端側と C 末端側には, イヌゲノム DNA を切断した 2 種類の制限酵素 (BspH I および Bsp1407 I) の切断認識配列が含まれるが, 塩基配列を解読した結果 2 頭ともいずれの領域でも切断認識配列に多型はみられなかった。これらの結果から, サザンブロット法で認められる遺伝子断片の分子量の差は *FLG* 遺伝子内に存在する反復配列の数, あるいは反復

配列の長さ起因する可能性が考えられた。続いて 2 頭のイヌで *FLG* 遺伝子内の反復配列である *FLG* をコードする遺伝子の分子量を PCR 法により比較した。既に行った Dot matrix 法による解析結果において、*FLG* をコードする遺伝子配列内には複数の小さな反復配列が存在することが示されている (Figure 6)。そこで *FLG* 単量体の全塩基長のみならず、*FLG* の N 末端側の非反復領域ならびに小さな反復配列を含む領域を増幅するようにプライマーを設計し、PCR 法によりそれぞれの分子量を確認した(Figure 10 a)。2 頭のイヌについて *FLG* 全長の遺伝子断片を増幅した結果、ビーグル犬 A では約 1,400 bp と約 1,500 bp の 2 本のバンドが、ビーグル犬 B では約 1,500 bp のバンドが 1 本認められた(Figure 10e)。*FLG* の N 末端側の非反復領域を増幅した PCR 産物の分子量は 2 頭とも約 750 bp と一致していたが(Figure 10f)、小さな反復配列を含む領域を増幅した PCR 産物の分子量は、ビーグル犬 A では約 900bp および約 750 bp の 2 本のバンドが、ビーグル犬 B では約 900 bp の 1 本のバンドが認められた(Figure 10g)。PCR 法による *FLG* 領域の分子量の検索の結果、ビーグル犬 A で

は 2 種類の分子量の異なる FLG の単量体から *FLG* 遺伝子は構成され、その分子量の違いは小さな反復配列数の違いから生じていること、またビーグル犬 B では同じ分子量の FLG で *FLG* 遺伝子は構成されていることが示された。さらにサザンブロット法と PCR 法の結果を合わせて考えると、ビーグル犬 A は対立遺伝子に分子量が違う 2 種類の FLG を含んでいるが、反復配列数は対立遺伝子間で同じであると考えられた。

一方、ビーグル犬 B では 2 本の対立遺伝子の中で、*FLG* 遺伝子の反復配列数が異なると考えられた(Figure 10b)。ビーグル犬 A では BspH I で制限酵素した遺伝子断片の塩基長が 11 kbp であったが(Figure 10b)、1500 bp の FLG repeat が 6 回反復している場合、FLG repeat 以外の分子量 (2,285 bp) を加えると制限酵素断片の計算上の分子量が約 11.4 kbp となり、約 1,400 bp の FLG repeat が 6 回反復していた場合は約 10.7 kbp となるため、いずれも実測値に近い値となる。一方でビーグル犬 B では BspHI で制限酵素処理した遺伝子断片の塩基長が 9.5 kbp および 12 kbp であったが(Figure 10b)、約 1,500 bp の FLG が 5 回反復していた場合制限酵素断片の計算上

の分子量が約 9.9 kbp となり，7 回反復していた場合は，制限酵素断片の計算上の分子量が約 13 kbp となるためいずれも実測値に近い値となる。ビーグル犬 A と B のゲノム DNA を制限酵素の Bsp1407 I で処理した場合でも，BspHI で処理した場合と同様の分子量が予測される。以上の結果より今回解析を行ったイヌ *FLG* 遺伝子反復配列数は 5 回から 7 回であると考えた。

5) イヌ *FLG* をコードする遺伝子の多様性に関する解析

イヌ *FLG* をコードする遺伝子の塩基数に多様性がみられるかを PCR 法により解析した。本実験では CAD と *FLG* 遺伝子変異との関係を解析する上での基礎データを得ることを目的としたため，CAD の好発犬種である柴犬に対象を統一した。解析した柴犬 20 頭において，*FLG* の N 末端側をコードする遺伝子の PCR 産物については分子量が全て一致していたものの，*FLG* 全長と *FLG* の小さな反復配列を含む C 末端側を

コードする遺伝子の PCR 産物については個体により分子量の異なる 1 本~5 本のバン

ドが増幅されて、ラダー状のバンドパターンを形成していた(Figure 11)。

4. 考察

本研究ではまずはじめに、データベースに記載されているイヌの *FLG* 遺伝子がヒトやマウスの相同遺伝子であるかを検討した。ヒトやマウスでは *FLG* 遺伝子上流に *HRNN* 遺伝子が、下流に *FLG2* 遺伝子が存在することが過去に報告されている (22, 32)(Figure 3)。また *HRNN* 遺伝子よりも上流には、*RPTN* 遺伝子が存在することが知られている(29)。イヌでは *HRNN* 遺伝子はデータベース上でアノテーションされていなかったが、*FLG* 遺伝子は *RPTN* 遺伝子と *FLG2* 遺伝子の間にアノテーションされていた。*FLG* 遺伝子と *FLG2* 遺伝子は染色体上で隣り合っており、翻訳タンパクの発現部位や角層での機能が類似していることが過去において報告されている(31)。一方でイヌ *FLG* 遺伝子の翻訳配列の方が、イヌ *FLG2* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列よ

りもヒトおよびマウス proFLG の配列に類似していたことから、イヌ proFLG をコードする遺伝子は *FLG2* 遺伝子ではなく *FLG* 遺伝子であると判断した。

イヌ *FLG* 遺伝子にはヒトやマウスの相同遺伝子と同様に N 末端領域、FLG, Truncated FLG ならびに C 末端領域のドメインが存在することが示された。また各ドメインの翻訳アミノ酸配列を比較したところ、N 末端領域の配列については EF ハンドを含め 3 種の間で保存されていた。一方でイヌ FLG については、ヒトやマウスに由来する配列との相同性は低かった。FLG 間に存在するリンカー配列中はチロシンが含まれることが過去に知られているが (33)、イヌ FLG においてチロシンを含む配列は YFYQVAP と RQYGSG の 2 か所のみであった。このうち前者はヒト FLG の予測リンカー配列 (S/FLYQVST) (34) と類似していたこと、ならびに FLG repeat 中において 549aa 毎に反復して認められたことから、この配列をイヌ FLG のリンカー配列と予測した。リンカー配列以外の FLG 配列の相同性はイヌ、ヒトおよびマウスの間で低かったが、FLG を構成する主要アミノ酸であるセリン、グルタミン、アル

ギニン， ヒスチジン， グリシンの構成比はヒトやマウスの相同配列と同様であった。

ヒトとマウスでは FLG を構成するアミノ酸配列の相同性が低いものの，免疫電子顕微

鏡下での観察によるといずれも表皮や角層において同様の分布を示していると報告さ

れている (7) 。FLG は角層でケラチンフィラメントを凝縮する役割を有するが，こ

の凝縮の際には FLG に含まれる B-turn motif が陽イオンや陰イオンに荷電して相互

作用を起こし，ケラチンを平行に配列するように束ねていると推察されている(6)。

FLG の B-turn motif はセリン/グリシン- セリン/グリシン- セリン/グリシン/極性アミ

ノ酸- セリン/グリシン/塩基性アミノ酸/ 酸性アミノ酸の 4 つのアミノ酸残基から構成

されている(6)。イヌ FLG には，B-turn motif を構成するアミノ酸がヒトやマウスの

相同配列と同等の比率で含まれていることから，ヒトやマウス由来の FLG と同様に角

質細胞内でケラチンフィラメントを凝集させることができる可能性が示唆された。し

かしながらイヌ FLG がヒトやマウスに由来する FLG の相同タンパクであることを証明

するためには、同タンパクの発現解析や機能解析などを今後実施する必要があると思われた。

過去にヒトの尋常性魚鱗癬患者で、*FLG* 遺伝子の C 末端領域をコードする塩基配列に変異が認められるとともに *FLG* の欠損または発現低下がみられたこと、かつその患者の重症度は C 末端領域よりも上流に変異をもつ患者と同等であったことが報告されている(35)。このことから pro*FLG* の C 末端領域は、pro*FLG* から *FLG* に分解するために重要となる配列を含んでいる可能性が推察されている(35)。ヒトとマウスの pro*FLG* の間では、C 末端領域の C 末端側に存在する 27 アミノ酸残基中 10 残基が保存されている(24)。これに対し、イヌ pro*FLG* の C 末端領域については、アミノ酸配列がヒトやマウスの相同配列とほとんど合致しなかった。前述の pro*FLG* から *FLG* に分解される上で重要となる配列は、ヒトやイヌの配列でもこれまでのところ特定されていないことも鑑みると、pro*FLG* の C 末端領域が示す役割や *FLG* への分解に重要となるモチーフの特定にはさらなる検討が必要であると思われた。

データベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子の配列では、*FLG* の反復配列数は 4 回となっている。一方で WGS では、*FLG* のように反復配列間の相同性が高い塩基配列を正しく再構築できないという欠点を有する。本研究で実施されたサザンブロット法の結果から、本研究に用いたビーグル犬 2 頭における *FLG* の反復数は 5-7 回である可能性が示唆された。またイヌではヒトやマウスと異なり、*FLG* 内にも小さな反復配列が存在することが Dot matrix 法で示された。さらにこの反復数はビーグル犬と柴犬とで異なり、また同じ柴犬でも個体により異なり多様性が認められることが PCR 法で証明された。このことからイヌの *FLG* 遺伝子はヒトやマウスよりも複雑な配列を有することが明らかとなり、ヒトやマウスの相同配列よりも塩基配列の解読が難しいことが示唆された。

5. 小括

イヌ pro*FLG* 分子上に存在するアミノ酸モチーフおよびドメインについて解析を

行った。EDC 上におけるイヌ *FLG* 遺伝子と他の角層タンパクをコードしている遺伝子の位置関係はヒトやマウスにおける位置関係と一致していた。またイヌ *FLG* 遺伝子配列中に存在する N 末端領域の翻訳アミノ酸配列は、ヒトやマウスに由来する proFLG の相同配列と最も高い相同性を示していた。イヌ *FLG* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列内に存在する各種ドメインを解析したところ、同配列は N 末端領域 – Truncated FLG – FLG – Truncated FLG – C 末端領域で構成されていた。サザンブロッティング法および PCR 法を用いた解析では、イヌ FLG の反復配列数が 5-7 回であることが示唆された。またイヌ FLG の配列内にはヒトやマウスの相同配列には認められない小さな反復配列が 4-5 回含まれており、この小さな反復配列数がイヌ FLG の分子量の多様性に関与することが示唆された。

イヌ proFLG の各種ドメインが示す翻訳アミノ酸配列をヒトおよびマウスの相同配列とそれぞれ比較したところ、N 末端領域と FLG 間に存在するリンカー配列の相同性は高かったものの、その他のドメインについてはヒトやマウスの配列と比較して相

同性は低かった。しかしながらイヌ **FLG** を構成するアミノ酸構成比をヒトやマウスの相同配列と比較したところ、ケラチンの凝集に必要とされる主要アミノ酸の構成比はヒトやマウスの相同配列と同様であった。

以上の結果から、イヌ **FLG** 遺伝子はヒトやマウスの相同配列よりも複雑な構造を有するものの、同遺伝子がコードするドメインの配列順はヒトやマウスの相同遺伝子と同様であることが示された。またアミノ酸構成比の結果から、イヌ **FLG** がヒトやマウスの **FLG** と同様にケラチンを凝集させる役割を有する可能性が推察された。

Table 1 . Nucleotide sequences of primers used in this study

増幅部位	プライマー	塩基配列 (5'→3')
Primer set 1*	DogFLGexon2-F	CTACCCCTCCCTACCTCTCG
	DogFLGexon3_418R	GAGATCCTGAGTCAGAGTGCCCAA
Primer set 2* / C 末端領域	DogFLG-REP016F	CCACCATCAGCAGTCACAGGACA
	DogFLGexon3+168R	TGTGTGGGTTTCATATTCCTACAA
Primer set 3* / FLG repeat	DogFLG-REP221F	GAGCACTCAGCATCTTATTTCTACC
	DogFLG-REP190R	TCCTCTGACTGGACCTGGAC
Primer set 4*	DogFLG-REP221F	GAGCACTCAGCATCTTATTTCTACC
	DogFLG-REP968R	AATCTTCTGAATGTCCTTCACTCA
Primer set 5*	DogFLG-REP979F	ATTCTTCAACGACCCGTGGAGA
	DogFLG-REP190R	TCCTCTGACTGGACCTGGAC
N 末端領域	DogFLGexon2-F	CTACCCCTCCCTACCTCTCG
	DogFLG-REP968R	AATCTTCTGAATGTCCTTCACTCA

*;Nucleotide positions of primer set 1-5 on canine FLG are represented in Figure 7a.

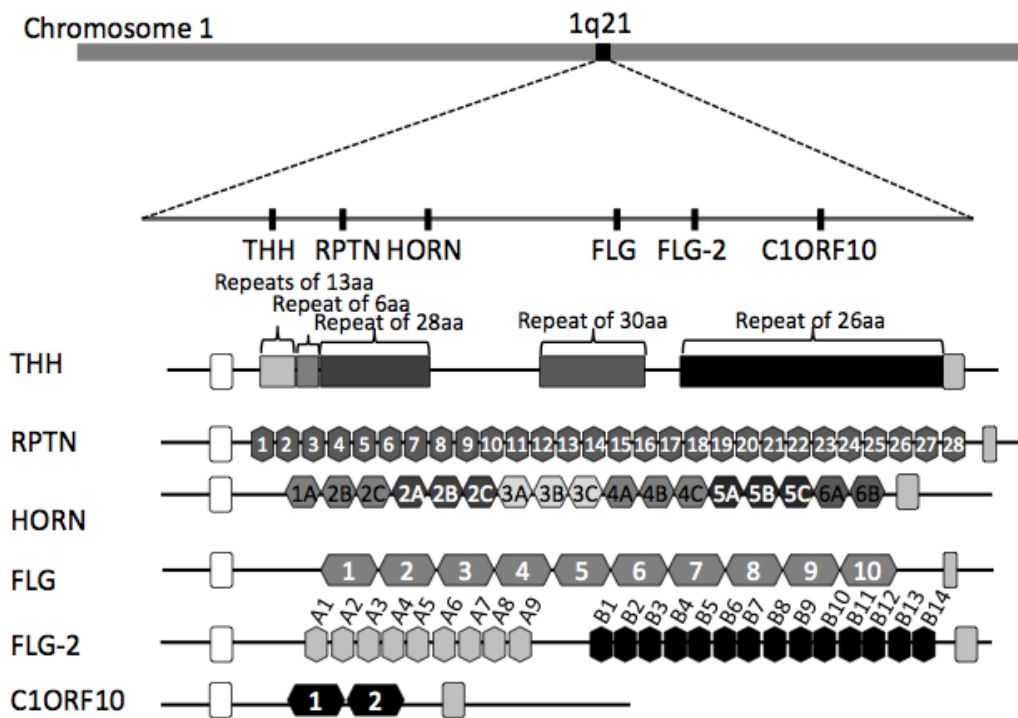


Figure 3. The position of S100 fused family on epidermal differential complex

(EDC) at chromosome 1q21 and domain structure of each protein. THH:

Trichohyalin, RPTN: Repetin, HORN: Hornerin, FLG: Filaggrin, FLG-2:

Filaggrin-2, C1ORF10: Cornulin, aa: amino acid

N-terminal region
 Truncated monomer
 FLG monomer
 C-terminal region

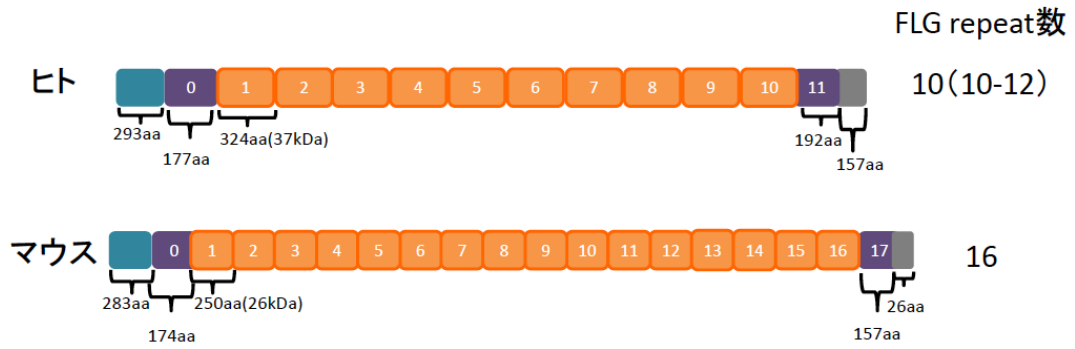


Figure 4. Domain structures of proFLG in humans and mice The orders of each

domain are common between human and mouse sequences, while for the numbers

of FLG repeat are different among these species.

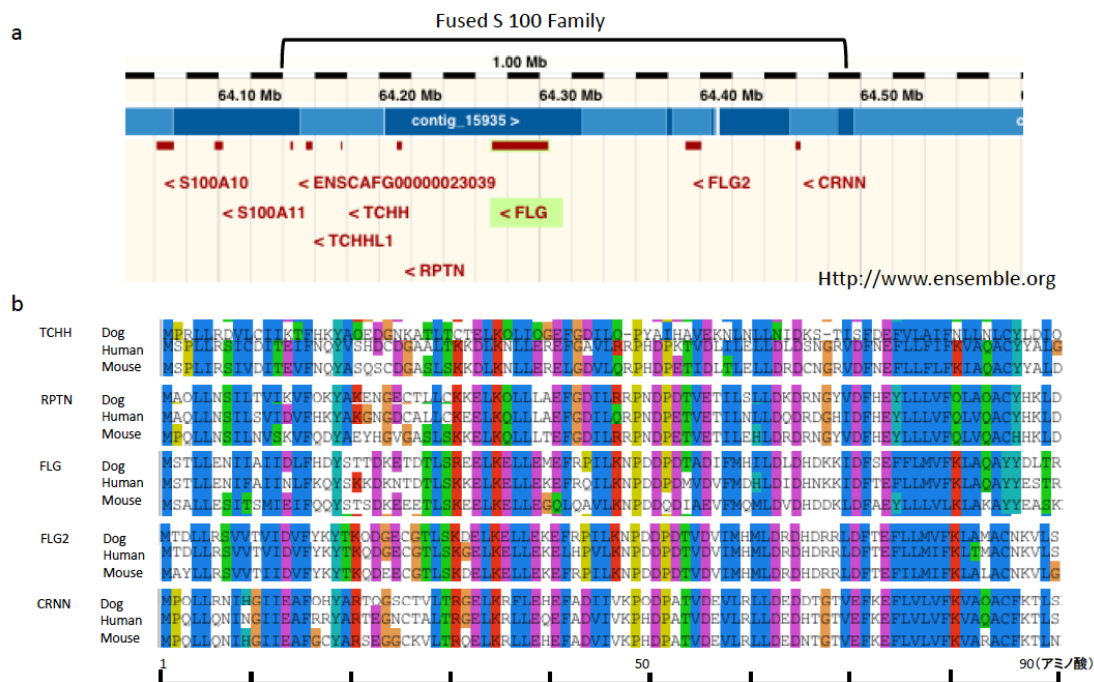


Figure 5. The genetic map of canine epidermal differential complex(EDC) and

comparison of amino acid sequence of N-termini among EDC-related proteins a;

The location of canine *FLG* gene on EDC appeared in database, b; The comparison

of amino acid sequence of N-termini among EDC-related protein from dog, human

and mouse.

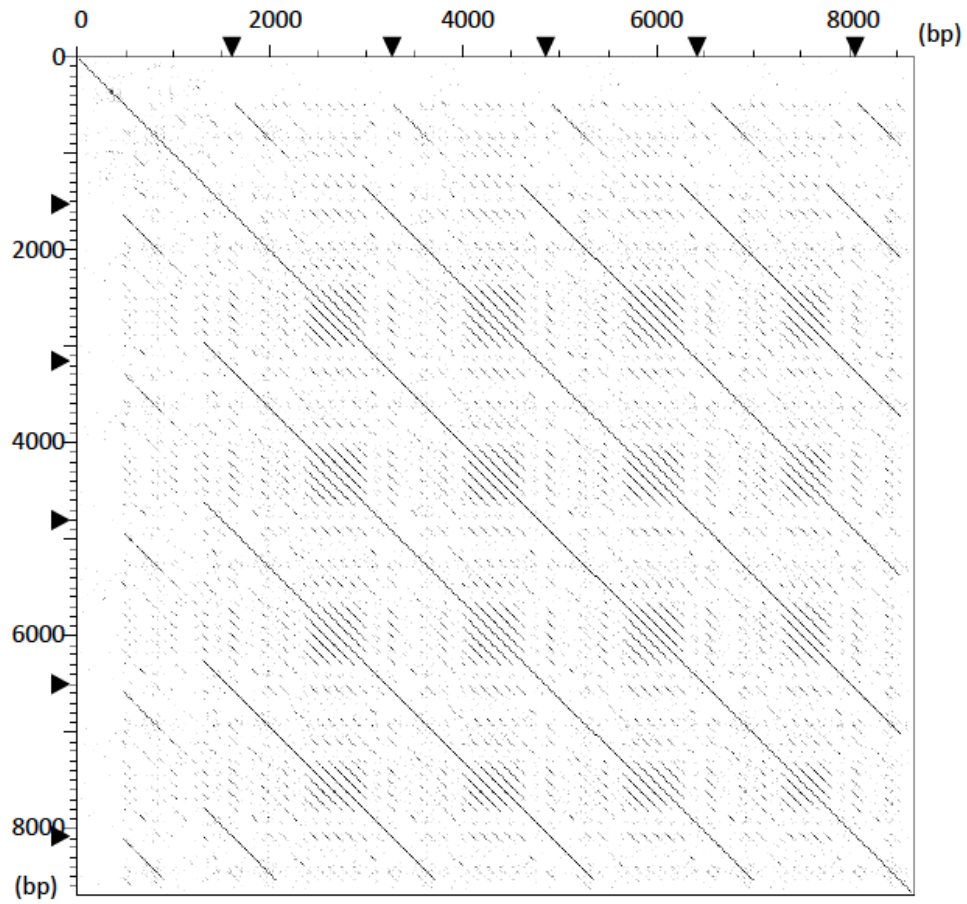


Figure 6. Dot matrix analysis to detect repetitive sequences on canine *FLG* gene.

Nucleotide sequence of Open reading frame(ORF) in canine *FLG* gene are plotted on X axis and Y axis. Identical sequences are represented as diagonal lines .

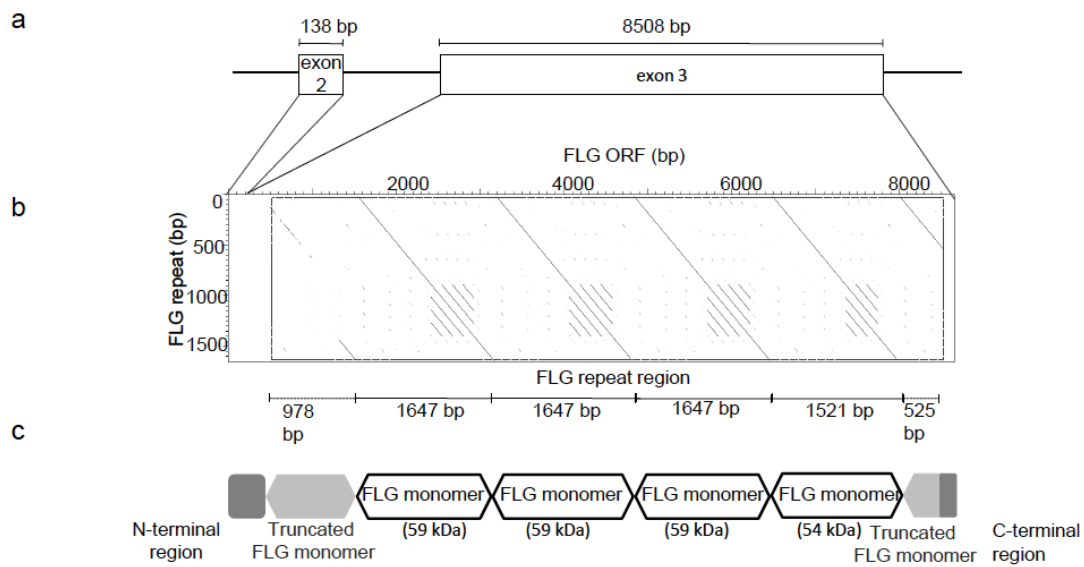


Figure 7. Putative domain structure on canine proFLG sequence obtained from the

database a; The ORF of canine *FLG* gene is located in exons 2 and 3. Start codon of

canine *FLG* gene is located on the 5' terminus of exon 2. b; Dot matrix analysis

revealed repetitive sequences within canine *FLG* gene are located in exon 3.

Canine *FLG* gene consists of 4 FLG within FLG repeat region. Dot matrix analysis

showed that each FLG sequence contains small repetitive regions..c; Domain

structure of proFLG. It is consisted with N-terminal region, Truncated FLG, FLG,

Truncated FLG, and C-terminal region, from N- to C-termini.

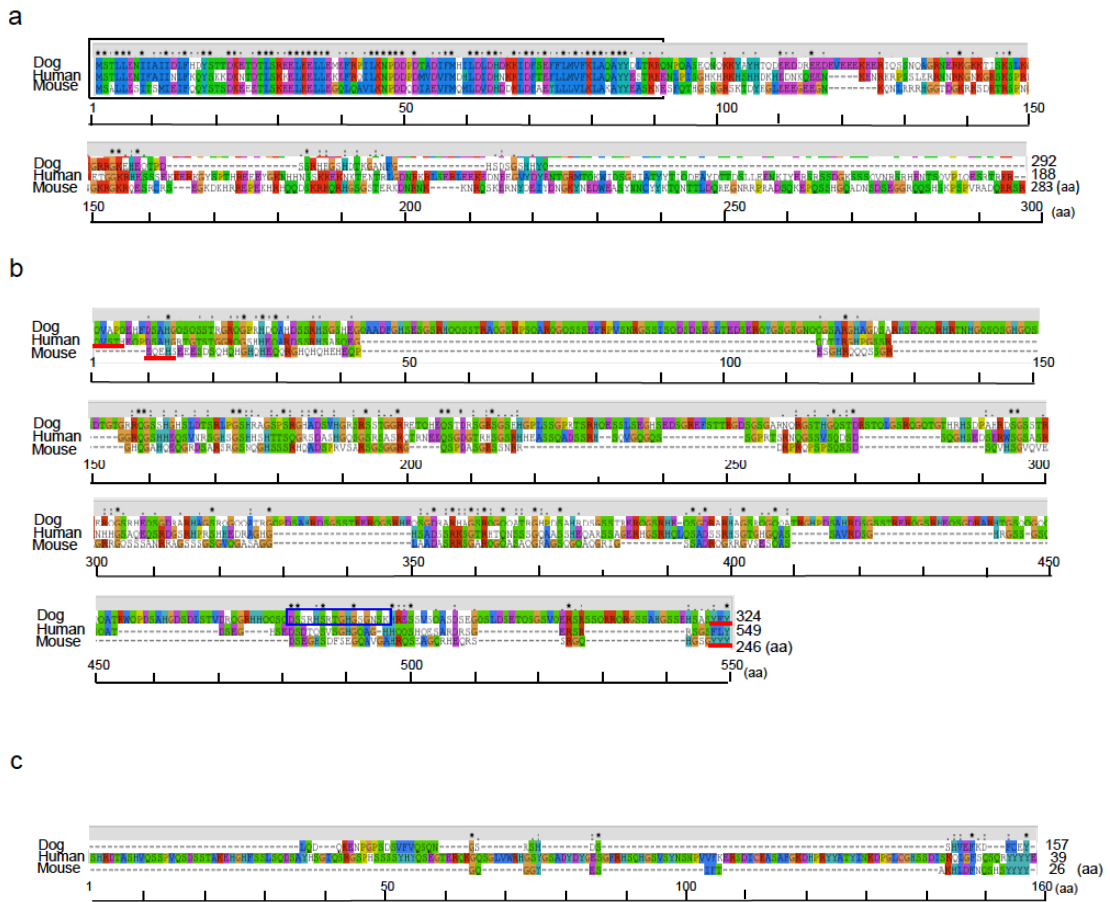


Figure 8. Comparison of translated amino acid sequences of proFLG domains

among dog, human, and mouse. a; Alignment of the N-terminal region of proFLG

among dog, human, and mouse. EF hand is indicated in the black box. b;

Alignment of translated amino acid sequence of FLG among dog, human, and

mouse. The linker sequences are underlined in red. The epitope sequences for anti-

dog FLG antisera are highlighted in blue box. c;Alignment of C-terminal region of proFLG among dog, human, and mouse.

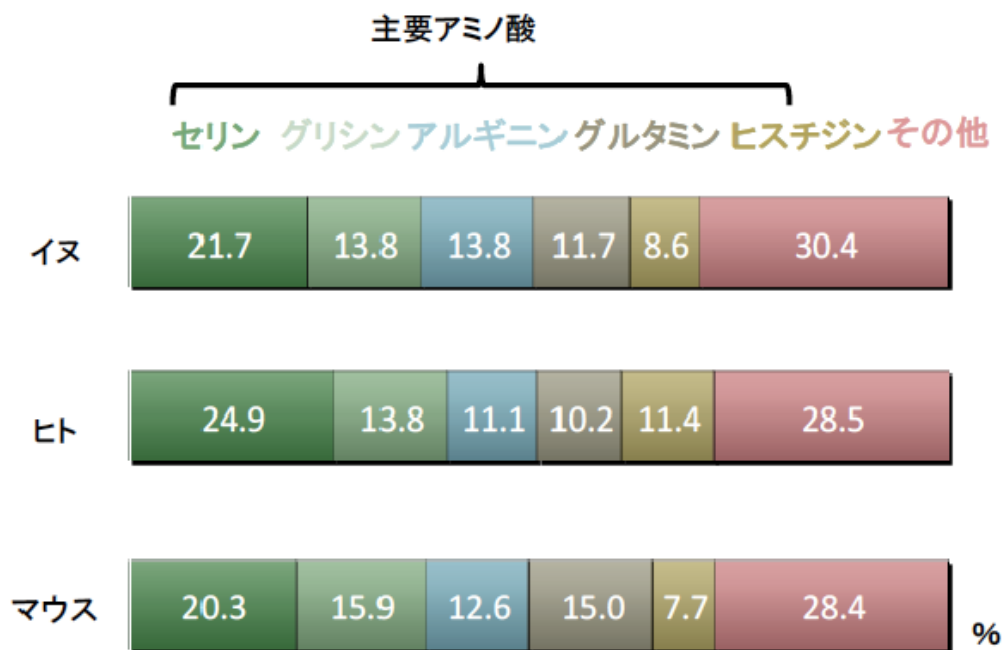


Figure 9. The comparison of major amino acid composition in FLG among dog, human, and mouse. The percentages of serine, glycine, arginine, glutamine, and histidine are conserved among dog, human, and mouse.

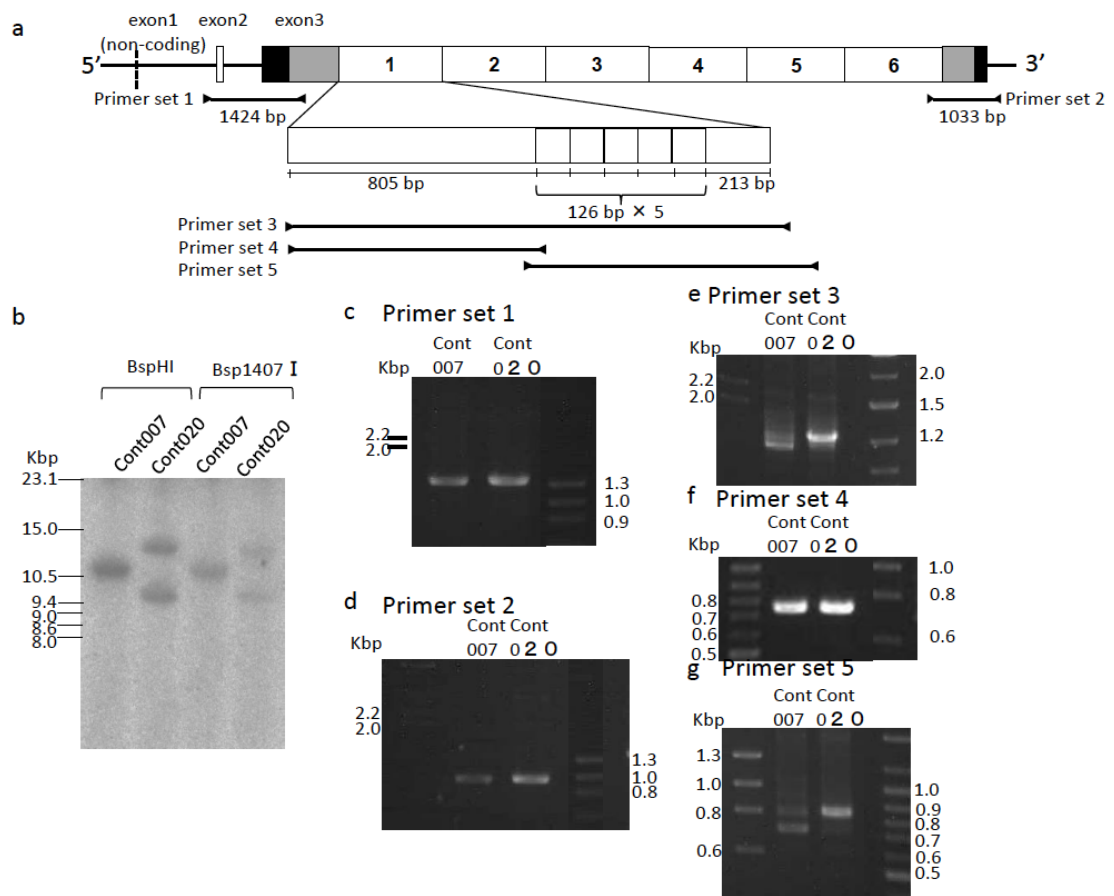


Figure 10 Comparison of the molecular weight of genes encoding parts

of the canine proFLG in two beagle dogs. a: Gene structure of canine FLG

gene and the location of primers used in this study. The digestion site of restriction

enzymes for southern blotting are shown by red triangles (BspH I) and blue

triangles (Bsp1407 I . The probe sequence for southern blotting is highlighted as

green line. Note that small repetitive regions of 126 bp are recognized within FLG.

b; Detection of DNA fragment containing canine *FLG* gene by southern blotting.

The band with molecular weight of 11 kbp is detected in beagle A, while two bands

with molecular weight of 9.5 kbp and 12.5 kbp are detected in beagle B. c-g; PCR

amplification of canine *FLG* gene. Molecular weight of the band for (c) 5'-and (d) 3'-

terminal ends of canine *FLG* gene are the same in beagles A and B. In contrast,

molecular weight of the band for FLG repeat (e) are different in 2 beagle dogs.

Molecular weight of the band for 5'-region of FLG repeat (f) are same in 2 beagle

dogs, while the molecular weight of the band for 3' region of FLG repeat (g) are

different in 2 beagle dogs.

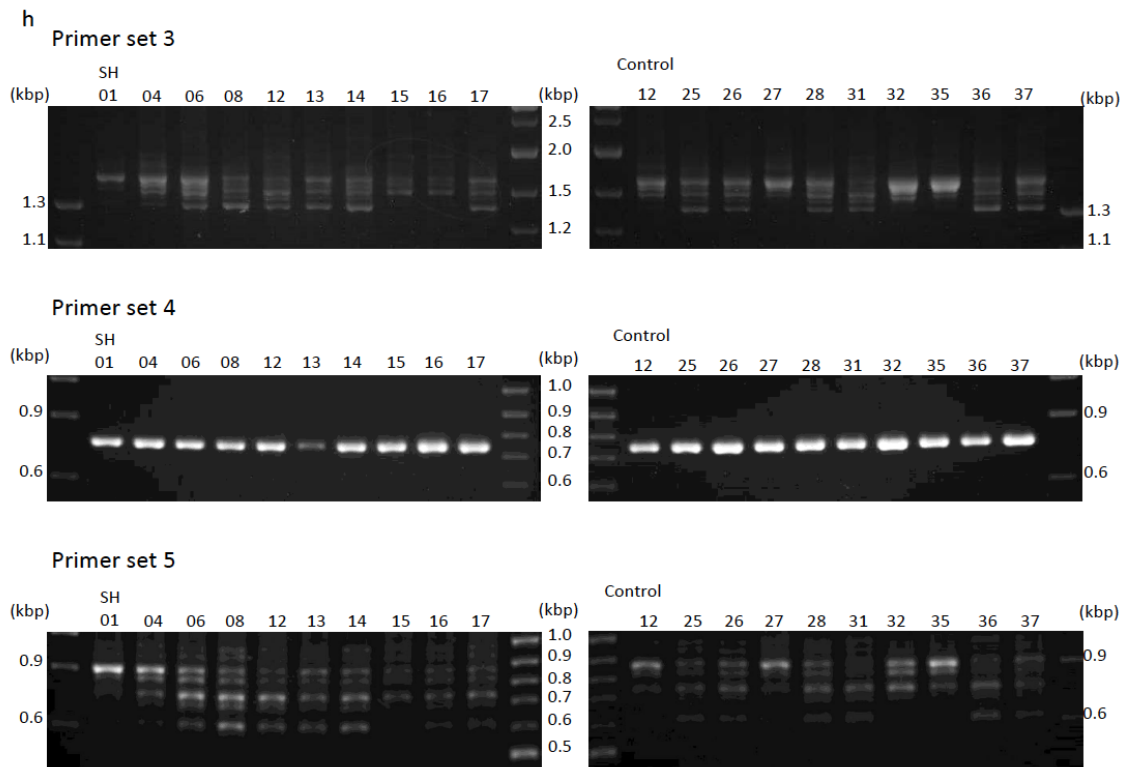


Figure 11. Comparison of the molecular weights of genes encoding

canine FLG, N- and C-termini of canine proFLG in Shiba inu. The size

variation of FLG in 20 Shiba inu is determined by PCR. There are multiple bands

with different molecular weights in FLG (primer set 3) and 3' end of FLG (primer

set 5), while the molecular weight for 5'-end of FLG repeat (primer set 4) is

identical in all dogs tested.

第3章 抗イヌ FLG 抗血清の作製とイヌ皮膚における FLG の発現

解析

1. 序論

第2章では、データベースに記載されているイヌ *FLG* 遺伝子がヒトやマウスの相同遺伝子であることを示すことができた。*FLG* は表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒内で前駆タンパクである *proFLG* として合成される。*proFLG* に Ca^{2+} が結合すると *proFLG* の構造に変化が生じ、切断部位が構造表面に露出するため *FLG* へと分解されることが推論されている(28, 36)。*proFLG* の N-terminal region は *proprotein convertase* や *furin* によって切断され、切断後は核内に移行してケラチノサイトの脱核を促進する(28)。*proFLG* は *serine/threonine protein phosphatase type 2A (PP2A)* によって脱リン酸化されると立体構造に変化が生じ、*FLG* 間のリンカー配列に存在する切断部位にタンパク分解酵素が到達しやすくなると考えられている(37)。*proFLG* から

FLG への分解には、キナーゼである casein kinase2 の他にも数種類のタンパク分解酵素が関与していることが推測されている(36, 38)。免疫組織化学染色や電子顕微鏡による観察では、ヒトやマウスの FLG は表皮ケラトヒアリン顆粒内と角層の下部に発現している(7, 10)。一方でイヌにおける FLG の発現を、ポリクローナル抗マウス FLG 抗体を用いて評価した報告があるが、表皮基底層や有棘層の細胞質も染色されているため抗体の特異性が疑問視されている(38)。そのため、今後の研究で CAD 症例における FLG の発現異常を特定するには、まずイヌ FLG の正しい局在を証明する必要があると考えた。また、第 2 章の結果からイヌ FLG の分子量はヒトやマウスの相同配列よりも大きいことが予想されたが、正確な分子量を特定したという既報告は存在しない。

そこで本研究ではイヌ皮膚における FLG の局在、ならびにイヌ FLG 分子量を特定するため、抗イヌ FLG 抗血清を作製して前述の解析を試みた。さら

にヒトで報告されている FLG の発現異常が CAD でも認められるかを確認す

るため、CAD の病変部皮膚における FLG の発現解析を試みた。

2. 材料と方法

1) 抗イヌ FLG 抗血清の作製

データベースに記載されているイヌ FLG の部分アミノ酸配列

(SRHSRTGHGSGNSKHR) を再現した合成ペプチドを、ニュージーランド

ホワイトウサギに 6 回免疫して抗血清を作製した (Figure 12)。免疫後の抗

血清から HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を用い

て IgG 分画を精製し、この分画を後述するウエスタンブロット法に使用した。

また前述の合成ペプチドを HiTrap™ NHS-activated HP (GE Healthcare,

Uppsala, Sweden) に結合させてペプチドカラムを作製し、これを用いて精製

した抗体分画を後述する免疫組織化学染色に使用した。

2) イヌおよびマウス表皮からのタンパク抽出

東京農工大学獣医内科学研究室で実験動物として飼育され、臨床的に皮膚に異常がみられないビーグル犬を用いた。イヌに塩酸メデトミジン(ドミトール注射液, Orion, Espoo, Finland, 20 μ g/kg)を筋肉内投与して十分な鎮静を施し、右側体幹部からから 6 mm 生検用トレパン(Kai Industries,Gifu,Japan)を用いて皮膚を採取した。皮膚材料は 1500 U/ml の Dispase II (エーディア株式会社, Tokyo, Japan) に 37 $^{\circ}$ C下で 30 分浸漬し,表皮と真皮を分離したのち表皮を細断し,SDS サンプルバッファーを加えて超音波処理を行った。処理後のタンパク抽出液を 95 $^{\circ}$ Cで 10 分加熱し,15,000rpm (20,400g) で 10 分間遠心分離を行い,上清を回収して実験に使用した。

マウス表皮からタンパクを抽出するため、新生児マウス (C57BL/6J) の背部皮膚より皮膚を採取し,イヌの皮膚材料と同様に処理を行った。以上の動物

実験は、いずれも東京農工大学動物実験委員会が定める倫理規定に基づき実施した。

3) 組織染色および免疫組織化学染色

東京農工大学獣医内科学研究室で実験動物として飼育され、臨床的に皮膚に異常のないビーグル犬 2 頭の頸背部、腋窩部、掌球、ならびに臨床症状が CAD と合致した症例 7 頭 (Table 2) の病変部より、6 mm の生検用トレパン (Kai industries) を用いて皮膚材料を採取した。イヌの CAD の診断には Favrot らが提唱した診断基準を用いた (39)。採取後の皮膚を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋を行った。包埋された組織を 5 μm に薄切し、脱パラフィン後に常法に従って haematoxylin and eosin (H&E) 染色を実施した。

免疫組織化学染色は以下の方法により行った。脱パラフィン後の組織切片を HistoVT One (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を用いて 90°C下で 20 分間処理して抗原の賦活化を行った。抗原賦活化後の切片を、10%ヤギ血清と室温で 30 分間反応させてブロッキングを行った。ブロッキング後の切片を、1:200 に希釈した抗イヌ FLG 抗血清と 4°C下で 1 晩反応させ、PBS で洗浄後、二次抗体として Histofine SAB-PO (MULTI) (NICHIREI bioscience, Tokyo, Japan)を使用して室温で反応させた。さらに切片中における抗体の沈着部位を可視化するため、Histofine DAB substrate (NICHIREI bioscience, Tokyo, Japan)を用いて酵素基質発色を行った。核染色はヘマトキシリンにて行った。

4) ウェスタンブロット法

抽出したタンパクを 5-12%の SDS ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動し、Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA)に転写した。転写膜を 3%スキ

ムミルクを用いて室温で 30 分間ブロッキングした後,1:6000 に希釈したポリ
クローナルウサギ抗マウス FLG 抗体(Covance, Barkeley, CA, USA)あるいは
1:1000 に希釈した抗イヌ FLG 抗血清とともに 4 °Cで 1 晩反応させた。次に
1:10000 に希釈したペルオキシダーゼ加抗ウサギ免疫グロブリン抗ヤギ血清
(DAKO, Glostrup, Denmark)と室温で 1 時間反応させたのち,proFLG または
FLG のバンドを ECL Plus Western blotting detection reagents (GE
Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いて可視化した。

3. 結果

1) 抗イヌ FLG 抗血清を用いた FLG のイヌ皮膚における組織学的局在の解析

作製した抗イヌ FLG 抗血清を用いて免疫組織化学染色を実施した。作製し
た抗血清は、ビーグル犬の腋窩部,頸背部および掌球部すべての皮膚で表皮顆
粒層の細胞質内顆粒に対し染色性を示した。また腋窩部ならびに頸背部では,

角層に対する染色性も認められた (Figure 13a, b および c)。一方で掌球では角層に対する染色性は認められなかった(Figure 13c)。

2) イヌ FLG の分子量の検討

イヌ皮膚から抽出したタンパク液を基質とし、今回作製した抗イヌ FLG 抗血清を用いてウエスタンブロット法を行ったところ、FLG の予想分子量である 59 kDa と 54 kDa の 2 本のバンドが認められた(Figure 14a)。しかし、FLG の 2 量体や 3 量体、ならびに proFLG に相当する分子量のタンパクは確認できなかった。マウス皮膚抽出タンパクを基質として同様のウエスタンブロット法を行ったところ、マウス FLG の分子量に合致した 26 kDa 付近のバンド、ならびに FLG2 量体の分子量に合致する 50-60 kDa の 2 本のバンドが認められた (Figure 14b レーン 1)。しかしイヌ皮膚から抽出したタンパク液を基質としポリクローナル抗マウス FLG 抗体を用いた場合は、FLG,

FLG の 2 量体ならびに proFLG の分子量と合致するバンドは検出されなかった (Figure 14b レーン 2)。

3) CAD の病変部皮膚における FLG の発現解析

CAD 症例における FLG の発現異常について解析するため、CAD と診断されたイヌ 7 頭の病変部皮膚を基質とし、抗イヌ FLG 抗血清を用いて免疫組織化学染色を行った。今回検索を行った 7 頭では H&E 染色および免疫組織化学染色により、表皮顆粒層および角層においてケラトヒアリン顆粒の存在や FLG の染色性が消失した個体は認められなかった (Figure 15a-g)。

4. 考察

イヌ皮膚における FLG の局在を解析した報告として、マウス FLG のを認識する抗マウス FLG 抗体を用いた報告が存在する(38)。しかし本研究で実施

したウェスタンブロット法の結果、抗マウス FLG 抗体はイヌ FLG に相当するバンドを検出できなかった。このことから、前述の抗体が免疫染色により実際にイヌ FLG を染色できたかは疑問である。一方で今回作製した抗イヌ FLG 抗血清は、ケラトヒアリン顆粒の染色パターンと同様に表皮顆粒層の細胞質顆粒や角層を染色し、かつイヌ表皮抽出液中の FLG と同じ分子量のタンパクを認識していることが示された。このことから本研究で作製した抗血清は、イヌ FLG を正しく検出できることが示された。またウェスタンブロット法の結果より、データベースに掲載されていたイヌ *FLG* 遺伝子は真のイヌ *FLG* 遺伝子をコードしている可能性が高いと考えられた。一方でマウスにおいて報告されている proFLG や proFLG の分解過程における FLG 2 量体ならびに FLG 3 量体は検出されなかった(10)。その理由の 1 つとしてデータベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子塩基配列を変換した proFLG アミノ酸配列 (FLG を 4 つ含む) から計算した分子量は約 313 kDa と大きく、ウエス

タンブロット法では検出できなかった可能性が考えられた。また本研究ではイヌ体幹部の皮膚をウェスタンブロット法に用いたが、この部位の皮膚では顆粒層が薄いため、ウェスタンブロット法で検出するのに十分なタンパク量のプロフィラグリンが含まれていなかった可能性もある。

ヒトでは変異 *FLG* 遺伝子が常染色体半優性遺伝様式を示し、ナンセンス変異を示す変異 *FLG* 遺伝子がホモ接合すると組織学的に顆粒層においてケラトヒアリン顆粒が消失するが、片アレルのみに変異遺伝子を有する場合は組織学的には健常皮膚と区別できないとされている(40)。CAD で変異 *FLG* 遺伝子がホモ接合している個体が存在すれば、免疫組織学染色にて顆粒層におけるケラトヒアリン顆粒の消失や、角層における *FLG* の消失が認められることが予想されたことから、本研究で作製した抗血清を用いて、CAD のイヌ 7 頭から採取した病変部皮膚の免疫組織学染色を行ったところ、検索を行った個体の中では表皮顆粒層や角層において *FLG* の染色性が消失している個体は認

められなかった。このことから、本研究で検索した CAD の 7 頭については、*FLG* 遺伝子変異を保有していなかったか、あるいは変異遺伝子が複合ヘテロ接合していたために免疫組織化学染色では発現異常を特定できなかった可能性が示唆された。アイルランドに在住するヒト AD 患者 52 例における変異 *FLG* 遺伝子の保有率について過去に報告が行われ、変異遺伝子と野生型遺伝子のヘテロ接合を有する症例の頻度が 44.2% (23 例) であったのに対し、変異遺伝子がホモ接合していた症例の頻度はわずか 1.9% (1 例)、複合ヘテロ接合が認められた症例の頻度は 9.6% (5 例) であった(11)。この結果を考慮すると、*FLG* の発現異常を免疫染色だけで特定できる症例の頻度は極めて少ないことが予測される。しかし、イヌでもすべての CAD 症例から変異遺伝子解析を試みるよりも、免疫組織化学染色およびウエスタンブロット法で *FLG* 発現異常を調べる方が簡便に行うことができることから多くの症例で検討するのが望ましいと考えた。今後は CAD と *FLG* 遺伝子変異の関係を解明する

ためにより多くの CAD 症例を用いるとともに、ウエスタンブロット法などによる定量解析を加えた多角的な検討を行う必要があると考えられた。また本研究で作製した抗血清は、イヌの魚鱗癬などの角化異常症における FLG の発現異常を特定するための有用な材料となる可能性が考えられた。

5. 小括

第 2 章のイヌ *FLG* 遺伝子構造解析の結果に基づいて作製した抗イヌ FLG 抗血清が、イヌ皮膚中の FLG を認識するか検討を行った。作製した抗血清は、免疫組織化学染色で表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒と一致する染色性を示したと共に、第 2 章の構造解析で予想された FLG と同じ分子量である 59 kDa と 54 kDa のタンパクを認識した。一方で CAD のイヌ 7 頭を用いて免疫組織化学染色を行ったが、FLG の染色性が消失した個体は特定できなかった。以上より、本研究で作製した抗イヌ FLG 抗血清は、イヌ表皮に発現する

FLG をタンパクレベルで検出できることが示された。また本研究で作製した抗血清は、今後イヌの魚鱗癬などの角化異常症における FLG の発現異常を特定するための有用な材料となる可能性が期待された。

Table 2. Summary of CAD dogs used in this study

症例	犬種	年齢(歳)	性別	採材部位
A	ミニチュア・シュнауザー	8	去勢雄	左腰部
B	柴	15	避妊雌	側腹部
C	雑種	10	避妊雌	前胸部
D	雑種	9	去勢雄	右臀部
E	シー・ズー	9	避妊雌	側腹部
F	トイ・プードル	7	去勢雄	側腹部
G	ミニチュア・ダックスフンド	7	避妊雌	左腋窩部

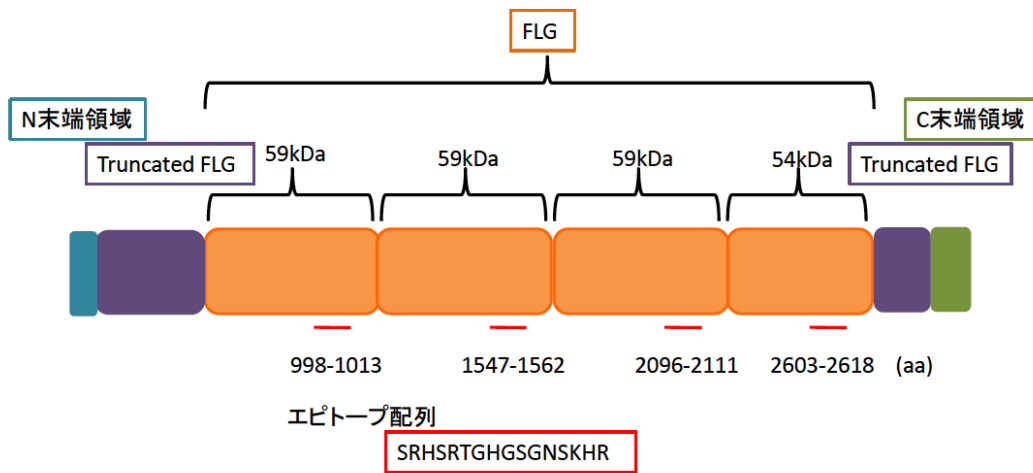


Figure 12. Domain structure of canine proFLG. Profilaggrin

consists of N-terminal region (blue), truncated FLGs (purple), FLGs (orange)

and C-terminal region (green). Location of epitopes recognized by anti-dog

FLG antisera is underlined by red. The amino acid sequence of the epitope

is shown in red box..

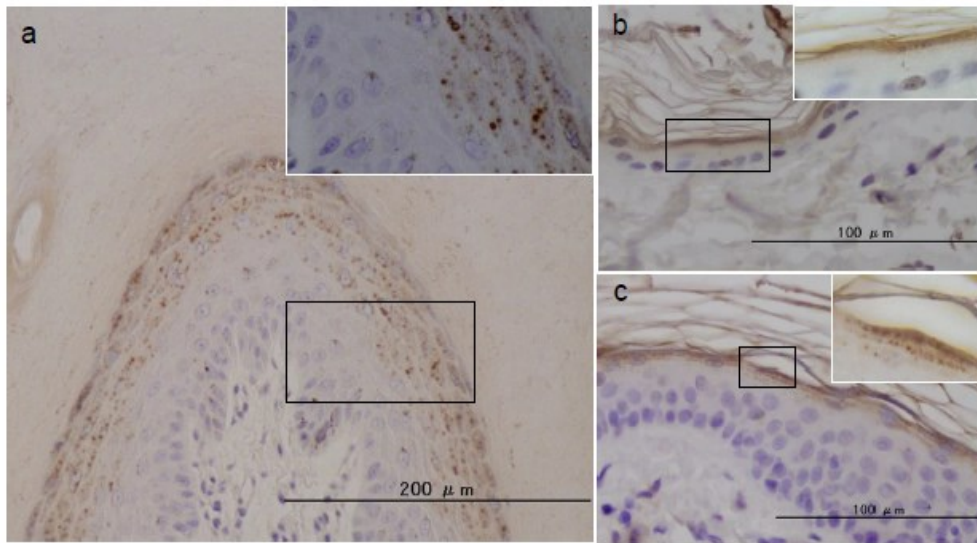


Figure 13 .Localization of FLG in the epidermis of normal dog

skin. Anti dog FLG anti-sera stained the stratum granulosum of the foot

padz(a), dorsal neck (b),and axilla (c) skin in a granular, cytoplasmic staining

pattern (enlarged image; $\times 40$). The stratum corneum is stained in the

dorsal neck (b) and axillae (c).

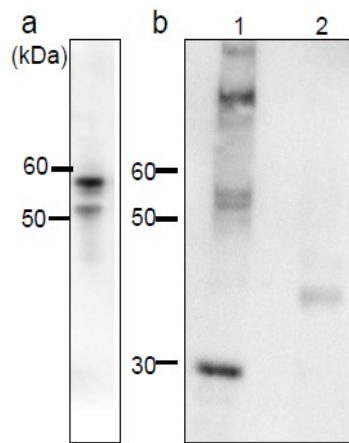


Figure 14. Western blotting with anti-dog FLG anti-sera and

anti-mouse FLG antibodies. a; Western blotting probed with anti-dog

FLG anti-sera. Band of 59 and 54 kDa in size was detected in protein

extracted from dog skin. b; Western blotting probed with polyclonal anti-

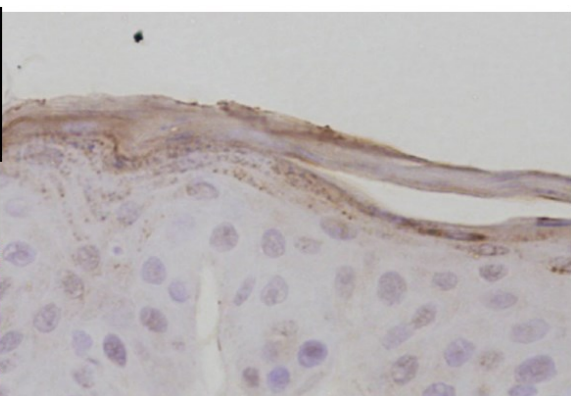
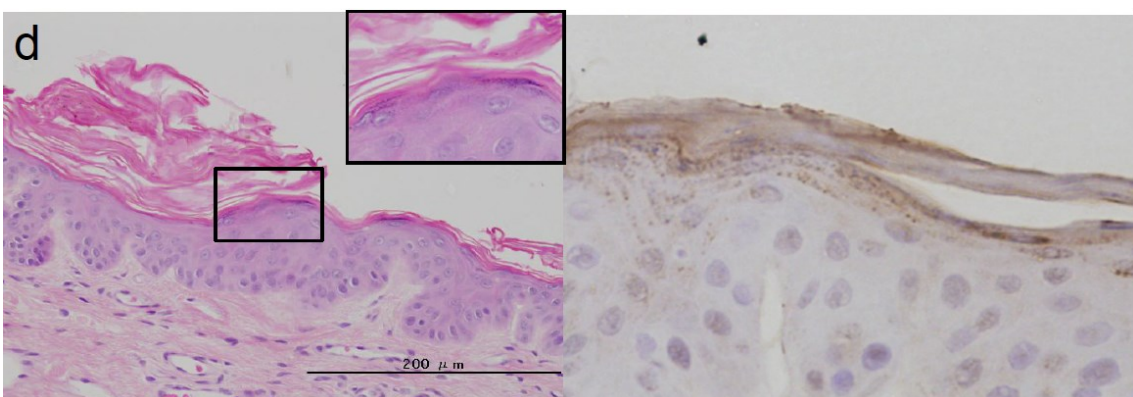
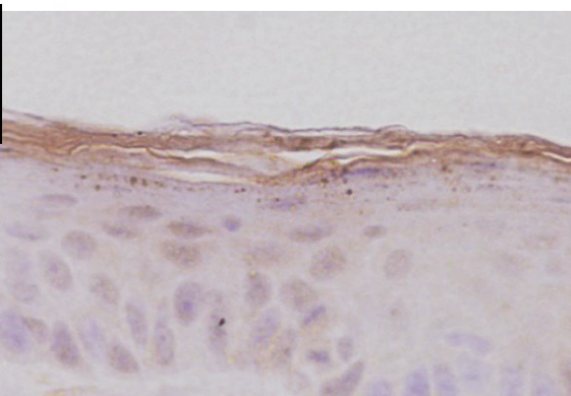
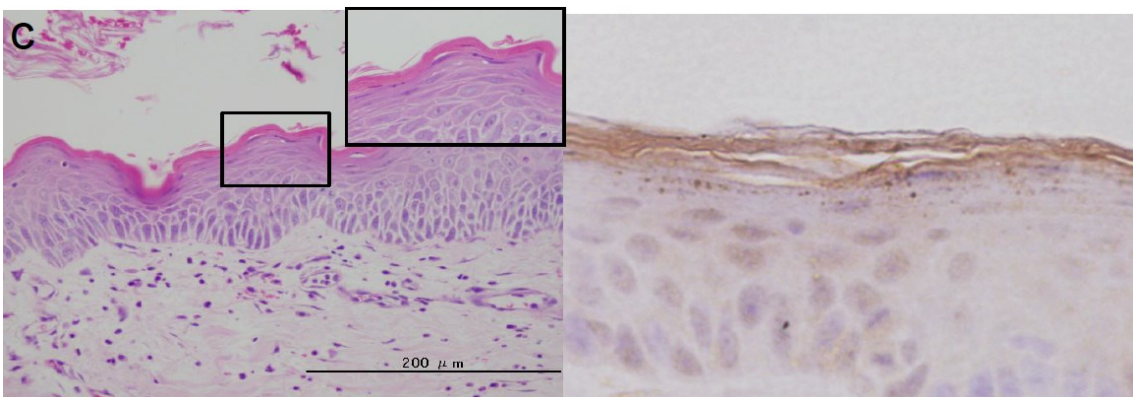
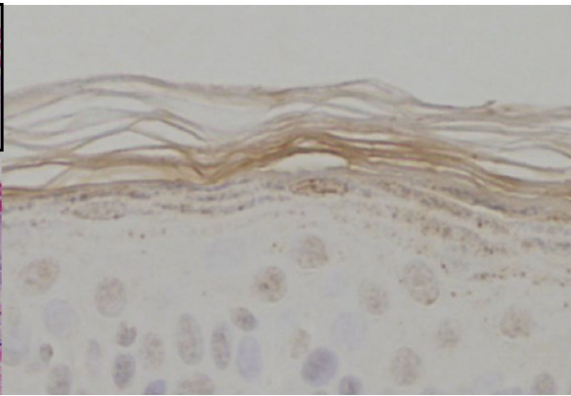
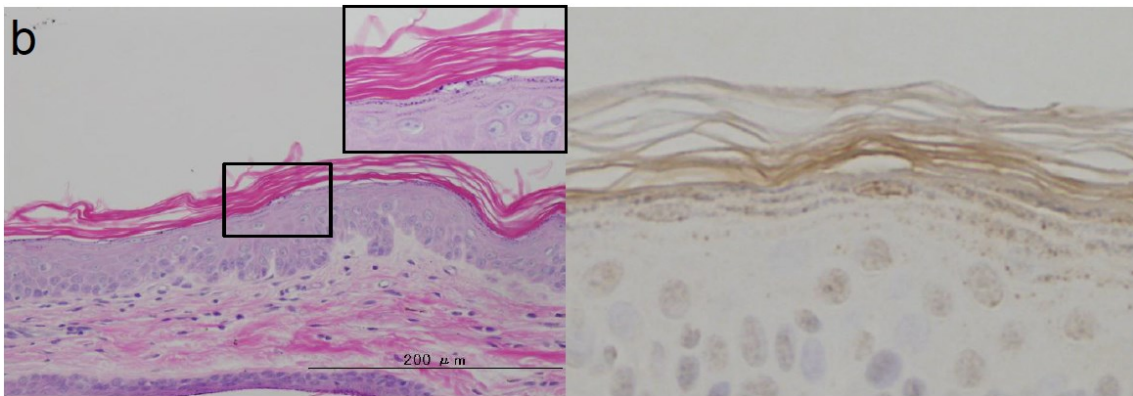
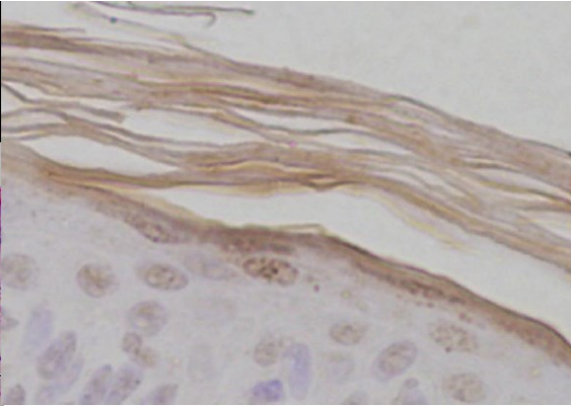
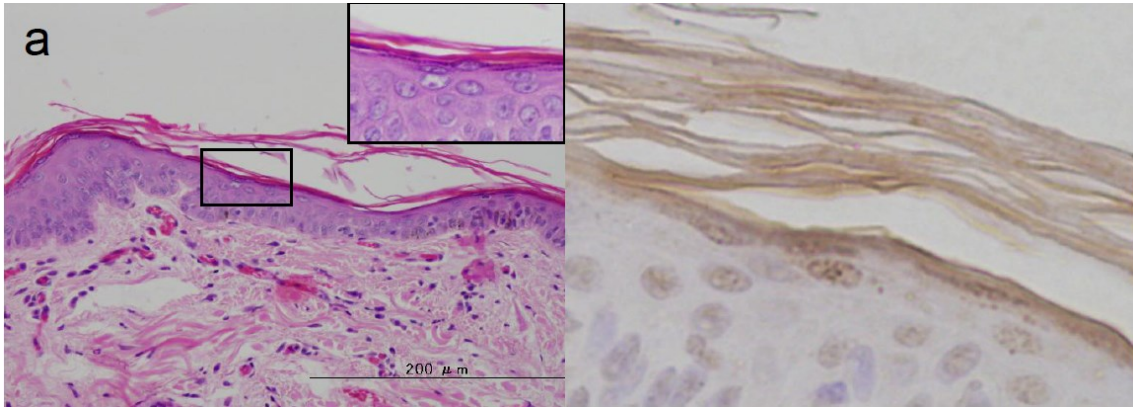
mouse FLG antibodies. A band of 30 kDa in size was detected in protein

extract obtained from mouse epidermis (lane 1). A weak band with

molecular weight between 30 and 50 kDa, which is inconsistent with

predicted molecular weight of canine FLG, was detected in protein extract

obtained from dog skin (lane 2).



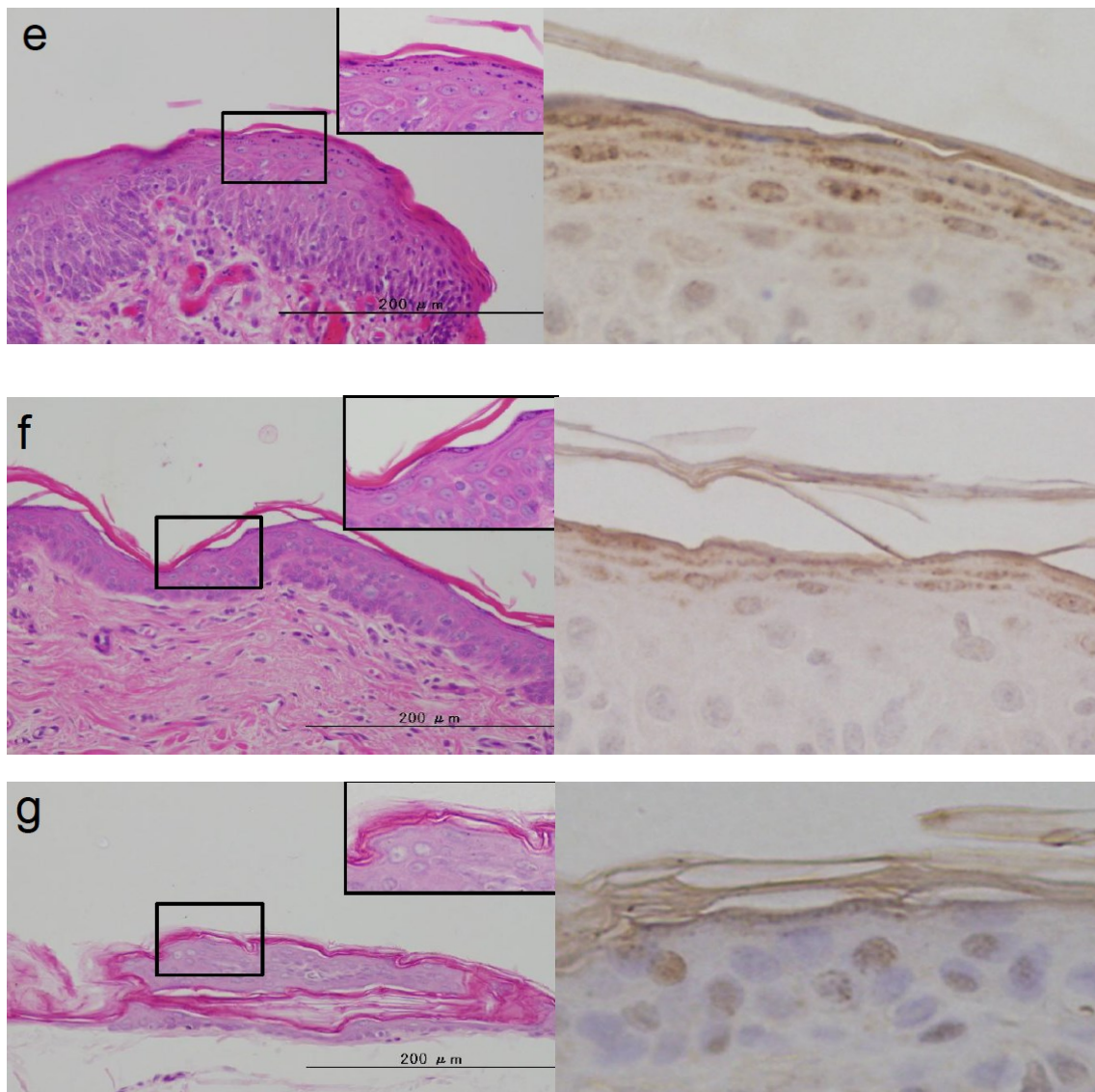


Figure 15. Histopathological and immunohistochemical

analyses of lesional skin obtained from 7 dogs with CAD (a-g).

H&E stain (left column) revealed keratohyalin granules in the stratum granulosum ($\times 40$). Immunohistochemistry with anti dog FLG anti-sera

(right column) revealed cytoplasmic granular staining in the stratum
granulosum.

第4章 イヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列決定および遺伝子変異の検索

1. 序論

ヒトの尋常性魚鱗癬ではケラトヒアリン顆粒の顕著な減少が認められることから、*FLG* 遺伝子に変異が生じている可能性が 1980 年代から推論されてきたが(41)、*FLG* 遺伝子は複雑な構造を有するため遺伝子解析による変異の同定は近年まで行われていなかった。2006 年にヒト尋常性魚鱗癬の家系において、*FLG* 遺伝子中の第 1 反復配列中にナンセンス変異が認められることが明らかになり、その後 *FLG* 遺伝子の変異が常染色体性半優性遺伝の様式で遺伝することが報告された(8)。また、皮膚炎モデルマウスである *flaky tail* マウスではケラトヒアリン顆粒や *FLG* の欠損が認められるが、この原因として *Flg* 遺伝子のエクソン 3 に 1bp の塩基欠失 (5303delA) が認められるため、同遺伝子にフレームシフトが生じて中途終止コドンが出現するたためであることが明らかになった(9)。さらにこの *flaky tail* マウスでは、経皮的なアレルギーの暴露により抗原特異的な IgE が産生されることから、*FLG* の欠損により

角層バリア機能に異常が生じると経皮抗原感作が増強されることが示唆された(9)。

またヒト尋常性魚鱗癬の患者では高率にアトピー性皮膚炎 (AD) が合併することが

過去に知られていたが、近年の報告ではアイルランドに在住するヒト AD 患者の集団

に、ヒト尋常性魚鱗癬で発見された変異と同じ変異が発見されたこと、また変異遺伝

子の保有率と AD の発生率との間に関連が認められたことが報告された(11)。した

がって *FLG* 遺伝子は、ヒト AD においても責任遺伝子の一つであることが示唆され

た(11)。イヌの AD (CAD) はヒト AD と病態が類似していることが指摘されている

が(19, 42, 43), *FLG* 遺伝子に変異が認められるかどうかについての報告はまだな

い。そこで本研究では、CAD 症例の中に *FLG* 遺伝子変異を有する個体が存在する

かどうかを解析するため、最初に PCR 法をベースとした解析法により *FLG* repeat

領域外の塩基配列解析を行った。*FLG* Repeat 領域外に検出された複数の SNPs の組

み合わせから、イヌ *FLG* 遺伝子を 3 種類のハプロタイプに分類できることが明らか

になった。さらに特定のハプロタイプが CAD と関連しているかを association study

により解析した。また過去に開発された *FLG* shotgun 法（ヒト *FLG* Repeat の配列内に保存された複数箇所の配列に相補的なプライマーを設計し、解読した配列情報をジグソーパズルのように再構成することで繰り返し配列全体を明らかにする方法）

（Figure 18）がイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列解読方法にも適応できるかを検討した。

また、この *FLG* shotgun 法を応用し、次世代シーケンサーを用いて健常犬および

CAD の *FLG* 遺伝子中における変異解析を試みた。

2. 材料と方法

1) DNA サンプル

東京農工大学獣医内科学研究室で実験動物として飼育され、臨床的に皮膚病変を認めないビーグル犬 8 頭、家庭で飼育され、臨床症状が CAD に合致した症例 49 頭、CAD に合致した臨床症状を認めないイヌ（非 CAD 犬）34 頭から末梢血を採取した（表 3）。CAD の診断には Favrot が提唱した診断基準(39)を用いた。採取した末梢血

をクエン酸ナトリウムで処理し, Wizard® Genomic DNA Purification Kit

(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), またはフェノール/クロロホルム抽出によって DNA を抽出し, 後述の塩基配列解析に用いた (Table 3)。

2) FLG repeat 領域外の塩基配列解析

イヌ *FLG* 遺伝子のエクソン 2 領域, エクソン 3 の 5'側, エクソン 3 の 3'側に存

在する FLG Repeat 領域外に相補的なプライマーを設計した (Table 4, Figure

16a)。 PCR 法の条件は 94°C で 2 分を 1 サイクル, 94°C で 30 秒, 60°C で 1 分,

72°C で 4 分を 30 サイクル, 72°C で 7 分を 1 サイクルとした。PCR 産物については,

1.0%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い分子量の確認を行った。増幅された

PCR 産物については ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems,

Foster City, CA, USA)を用いて塩基配列解析を行った。塩基配列データの解析には

codon code aligner (Codoncode corporation, Centerville, MA, US) を用いた。

3) イヌ *FLG* 遺伝子ハプロタイプと CAD との association study

イヌ *FLG* 遺伝子の 3'側に存在する 6ヶ所の SNPs を含む遺伝子断片を増幅するため、プライマー(DogFLGRep753F: 5'-TTCCAGGGTCCCATCGTGCAGG-3' / exon3+168R: 5'-TGTGTGGGTTCATATTCCTACAA-3')を用いて PCR 法を行った。

増幅された PCR 産物の塩基配列解析を行い、3'側の 6つの SNPs の配列パターン (Figure 17)を元に CAD 犬 49頭および非 CAD 犬 42頭におけるハプロタイプの分類を行った(Table 3)。CAD 犬 49頭および非 CAD 犬 42頭(表 8)、CAD に罹患した柴犬 28頭および罹患していない柴犬 25頭における、特定のハプロタイプの出現頻度の比較解析をそれぞれ行い、解析には χ^2 検定を用いた。

4) *FLG* shotgun 法

FLG shotgun 法を行うため、FLG repeat 中のオーバーラップ領域を含む 3 組のプライマー (DogFLGRepeat016F / DogFLGRep745R, DogFLGRep753F / DogFLGRepeat745R, DogFLGRep362F / DogFLGRep369R)(Figure 16 b)を用いて PCR 法を実施した。増幅した PCR 産物を pCR® 4Blunt-TOPO® ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に挿入した後、コンピテントセル (Competent Quick DH5α : TOYOBO, Osaka, Japan)に形質転換した。形質転換したコンピテントセルを LB 培地に撒き、37°C 下で 1 晩インキュベートした。培地上に形成されたコロニーについては、ベクタープライマー (M13F/M13R) を用いた colony direct PCR に用いた。PCR 産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、増幅されたバンドのサイズが 1.6 kpb 付近であることを確認した後、ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて塩基配列解析を行った。塩基配列解析には codon code aligner を用いた。

5) 次世代シーケンサー (Miseq) に用いる被検材料の調整

FLG repeat と FLG repeat 外の領域を増やすように設計した 7 組のプライマーを用いて、イヌ *FLG* 遺伝子の全領域を PCR 法で増幅した (Table 6, Figure 16c)。

PCR 産物の濃度を Qubit® fluorometer (Life technology, Carlsbad, CA, USA) を用いて測定し、PCR 産物のモル比が FLG Repeat 外の領域と FLG Repeat 領域とで 1 : 3 になるように混合した。混合した PCR 産物を Nextera DNA Sample Prep Kit(Illumina, San Diego, CA, USA)で調整し、Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて塩基配列解析を行った。

6) 解析ソフト

FLG shotgun 法におけるアライメントには codon code aligner (Codoncode corporation, Centerville, MA, USA) を用いた。次世代シーケンサーでの塩基配列データは bwa (Burrow-Wheeler Alignment Tool) (<http://bio->

bwa.sourceforge.net/) を用いて(44), データベース上のイヌ *FLG* 遺伝子配列の ORF に mapping し, GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>) を用いて(45), 遺伝子多型および挿入・欠失を抽出してその頻度を計算した。また遺伝子多型の部位, ならびに遺伝子多型によりアミノ酸置換や中途終止コドンが生じていないかを snpEFF (<http://snpeff.sourceforge.net/>) を用いて(46)確認した。さらに Igv (Integrative genomics viewer) (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) を用いて前述の塩基配列データを可視化して(47), 解析エラーが生じていないかを確認した。

3. 結果

1) *FLG* Repeat 領域外の塩基配列解析

イヌ *FLG* 遺伝子の ORF のうち, *FLG* Repeat 領域外である 5'末端 (エクソン 2 ならびにエクソン 3 の 5'末端に存在) と 3'末端 (エクソン 3 に存在) の塩基配列を計 22 頭のイヌ (CAD 犬; 16 頭, 非 CAD 犬; 6 頭) (Table 7) について解析し

た。犬種の内訳を表 5 に示す。SNPs はエクソン 3 の 5'末端 (ORF の 139 bp から 2,272 bp まで) と 3'末端 (ORF の 6,998 bp から 8,814 bp まで) にそれぞれ 6 ヶ所 ずつ認められた(Figure 17)。エクソン 3 に存在する 12 ヶ所の SNPs {1,318 (C/G) , 1,374(C/T), 1,558(C/T), 2,019(G/C), 2,097(C/T), 2,142(A/T), 8,151(G/T), 8,195(A/G), 8,247(T/A), 8,286(A/G), 8,327(A/G), 8,461(A/C)} は互いに連鎖して おり, 3 種類のハプロタイプ (ハプロタイプ A : 5'-C-C-C-G-C-A-G-A-T-A-A-A-3', ハプロタイプ B : 5'-C-C-C-G-T-T-T-G-A-G-G-C-3', ハプロタイプ C : 5'-G-T-T-C-C-A-G-G-A-G-G-A-3') を構成していた(Figure 17)。さらに 91 頭(表 3: CAD 犬 49 頭, 非 CAD 犬 42 頭)(Table 8)のイヌで同様の解析を行ったところ, すべてのイヌで前述 の 3 種類のハプロタイプのいずれかが出現していた。CAD 犬および非 CAD 犬で出 現していたハプロタイプの内訳は, CAD 犬では A/A 13 頭(26.5%), A/B 9 頭(18.4%), A/C 8 頭(16.3%), B/B 5 頭(10.2%), B/C 6 頭(12.2%), C/C 8 頭(16. 3%)であった のに対し, 非 CAD 犬では A/A 13 頭(31.7%), A/B 6 頭(14.3%), A/C 5 頭(11.9%),

B/B 4頭(9.5%), B/C 7頭(16.7%), C/C 7頭(16.7%)であった (Table 9)。ハプロタイプ A の出現頻度は CAD 犬で 45 頭 (43.9%) , 非 CAD 犬で 37 頭 (45.1%) , ハプロタイプ B の出現頻度は CAD 犬で 25 頭 (25.5%) , 非 CAD 犬で 21 頭 (22%) , ハプロタイプ C の出現頻度は CAD 犬で 30 頭 (30.6%) , 非 CAD 犬で 26 頭 (31%) であった (Table 9)。CAD 犬と非 CAD 犬におけるハプロタイプの出現頻度に統計学的な有意差はみられなかった (Table 10) (χ^2 検定, $P=0.98$)。しかしながらハプロタイプ C を保有する CAD 犬 22 頭中 20 頭が柴犬であることが示された (A/C : 8 頭中 8 頭, B/C : 6 頭中 5 頭, C/C : 8 頭中 7 頭)。

2) イヌ *FLG* 遺伝子のハプロタイプと CAD との association study

先の結果から, CAD に罹患した柴犬とハプロタイプ C との間に関連がある可能性が示唆されたことから, 対象を柴犬に限定して association study を行った。CAD に罹患した柴犬 28 頭, CAD に罹患していない柴犬 26 頭におけるハプロタイプの出

現頻度について比較したところ、CAD 犬では A/A 2 頭 (7.1%) , A/B 4 頭 (14.3%) , A/C 8 頭 (28.6%) , B/B 2 頭 (7.1%) , B/C 5 頭 (17.9%) , C/C 7 頭 (25%) であったのに対し、非 CAD 犬では A/A 2 頭 (7.7%) , A/B 2 頭 (7.7%) , A/C 5 頭 (19.2%) , B/B 3 頭 (11.5%) , B/C 7 頭 (26.9%) , C/C 7 頭 (26.9%) であった (Table 11) 。ハプロタイプ A の出現頻度は CAD 犬で 16 頭 (28.6%) , 非 CAD 犬で 11 頭 (21.2%) , ハプロタイプ B の出現頻度はそれぞれ CAD 犬で 13 頭 (23.2%) , 非 CAD 犬で 17 頭 (32.7%) , ハプロタイプ C の出現頻度は CAD 犬で 17 頭 (48.2%) , 非 CAD 犬で 26 頭 (50.0%) であった (Table 12) 。このことから柴犬では、CAD 犬と非 CAD 犬の間で特定のハプロタイプの出現頻度に差はみられなかった (χ^2 検定, $P=0.48$) 。

3) FLG shotgun 法を用いたイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列解析

FLG Repeat 内の詳細な塩基配列を解析する目的で、1頭のビーグル犬から抽出した DNA サンプルを鋳型とした FLG shotgun 法を実施した。LG repeat 配列内に保存された複数箇所の配列に相補的な 3 組のプライマーを用いて PCR 法を行い、PCR 産物をベクターに挿入してクローニングを行った。クローニングされた遺伝子断片の塩基配列を解読したところ、FLG repeat の 92 塩基目 (G/T) , 342 塩基目 (G/A) , 344 塩基目 (T/A) , 385 塩基目 (G/T) , 400 塩基目 (T/A) , 668 塩基目 (G/T) に SNPs が存在することが確認された(Figure 19a)。また 6 箇所の SNPs の組み合わせから、FLG repeat を構成する配列のパターンは 5'-T-G-T-G-A-T-3' , 5'-T-G-T-G-A-G-3' , 5'-G-G-T-G-A-T-3' , 5'-G-G-T-T-T-T-3' , 5'-T-A-A-G-A-G-3' の 5 種類に分類された(Figure 19a)。得られた配列内の 6 箇所の SNPs の位置を手掛かりに FLG repeat 領域全体の配列について再構成を試みた。N 末端領域の FLG repeat 1(Figure 19b)と C 末端領域に最も近い Truncated FLG repeat の 6 ヶ所の SNPs については、PCR 法の結果と同じ塩基配列を得ることができ、今回解読したイヌでは

FLG repeat 1 における SNPs の組み合わせが 5'-T-G-T-G-A-T-3', C 末端領域側における組み合わせは 5'-G-G-T-G-A-T-3'であった(Figure 19b)。FLG repeat をコードする塩基配列内の SNPs に加え, サザンブロット解析により推論された FLG repeat の反復配列数を参考にして, イヌ FLG repeat の塩基配列の再構成が可能であった(Figure 19b)。

4) 次世代シーケンサーを用いたイヌ *FLG* 遺伝子変異の検索

前述の通り FLG shotgun 法によりイヌ *FLG* 遺伝子全体の塩基配列情報のほとんどを解析することが可能であった。しかしながら本法の欠点として, 手法が煩雑なため 1 個体の解析に時間ならびに費用がかかり, 複数の個体を対象とした解析を行うのは困難であると考えられる。本研究では, 複数の検体を短時間で解析できる次世代シーケンサーを用いて, イヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列解析ならびに CAD に特有の遺伝子変異を特定することが可能かどうか CAD 犬 5 頭, 非 CAD 犬 3 頭(Table 3)で検討し

た。その結果、前述したイヌ *FLG* 遺伝子のエクソン 3 の 5'末端あるいは 3'末端に存在する 12 ヶ所の SNPs や *FLG* shotgun 法で得られた SNPs は本法でも確認することができた。しかしながら、今回解析を行ったいずれの個体からも CAD に関連する *FLG* 遺伝子変異を示す配列の特定はできなかった。

4. 考察

本症では第 2 章での解析結果をもとに、まず *FLG Repeat* 外の領域の塩基配列を、PCR 法をベースとした手法により解析した。その結果、同配列内には 12 箇所の SNPs が存在することが明らかになったとともに、SNPs の組み合わせからイヌ *FLG* 遺伝子は 3 種のハプロタイプに分類できた。*FLG* 遺伝子内の変異部位とハプロタイプは連鎖すると考えられるため、CAD の症例において保有率の高いハプロタイプが決定できれば、そのハプロタイプを保有する遺伝子上に CAD と関連する変異部位が存在する可能性が期待された。そこで遺伝的に比較的均一であると考えられ、か

つ CAD の好発犬種である柴犬に限定し、ハプロタイプの発現頻度と CAD との関連について解析を行ったが、明らかな関連は認められなかった。しかしながら、過去において英国におけるラブラドル・レトリバーの症例では、*FLG* 遺伝子の非翻訳領域に SNP がみられ、かつこの SNP の保有率と CAD との相関が高いことが示された報告が存在する(21)。本研究にて *FLG* 遺伝子翻訳領域内の SNP を明らかにすることができたため、今回認められた SNP を元にイヌの頭数を増やしてゲノムワイド関連研究を行うことや、CAD が好発する他の犬種でも同様の検討を行う必要があると思われた。

今回イヌ *FLG* 遺伝子塩基配列解析方法を探索するため、ヒトで開発された *FLG* shotgun 法がイヌにも応用可能かどうかの検討を行ったところ、*FLG* repeat 内の反復配列に関する詳細な順序を特定することはできなかったものの、*FLG* 遺伝子全領域の塩基配列情報のほとんどを特定することができた。しかしながら *FLG* repeat 間

の相同性が高すぎるため、反復配列領域に限っては全配列を決定することはできなかった。

本症において検索した CAD 症例 5 頭，健常犬 3 頭については次世代シーケンサーを用いた解析で *FLG* 遺伝子にナンセンス変異は見つからなかったものの，前述の PCR 法や *FLG* shotgun 法での解析により証明できた既知の SNPs については同様に検出することが可能であった。次世代シーケンス法は，PCR 法や *FLG* shotgun 法よりも多くの検体を同時に解析することが出来るという利点を有する。このことから，本法は複数のイヌにおける *FLG* 遺伝子上のハプロタイプや遺伝子変異を同時に解析する方法として有用である可能性が期待された。

5. 小括

第 2 章で行われたイヌの *FLG* のドメイン解析の結果(第 2 章)を元に *FLG* Repeat 領域外の塩基配列解析を行い，今まで知られていなかったイヌ *FLG* 遺伝子の SNPs

を明らかにした。さらにこの SNPs の相互関係からイヌ *FLG* 遺伝子には 3 種類のハプロタイプが存在することをみいだした。CAD に罹患したイヌと罹患していないイヌでハプロタイプの型別を比較したが、CAD に特有のハプロタイプは認められなかった。

イヌ *FLG* 遺伝子内の変異を特定するために過去に開発された *FLG* shotgun 法を実施したところ、*FLG* repeat 配列内に存在する SNPs とその組み合わせを検出することができた。また SNPs の情報を元に *FLG* repeat 領域全体の再構成を行ったところ、反復配列領域を除くイヌ *FLG* 遺伝子全領域の塩基配列情報を特定することができた。さらに次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析ならびに遺伝子変異の検索を実施したところ、PCR 法による塩基配列解析で明らかになったハプロタイプ、ならびに *FLG* shotgun 法で明らかになった SNPs を *FLG* の配列内に確認することができた。一方で、CAD と *FLG* 遺伝子変異とが関連するという証拠は、本章の結果からは得られなかった。今後は CAD や角化異常を示すより多くのイヌについて、同時

に多数の検体を解析できる次世代シーケンス法を用いて解析を行うことで、それぞ

れの疾患に関連する *FLG* 遺伝子変異を解析できると考えられた。

Table 3. Summary of CAD dogs and non-CAD dogs used in this chapter

症例番号	疾患名	犬種	ハプロタイプ	解析項目
1	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/A	*, #, 卩
2	CAD	フレンチ・ブルドッグ	A/A	#
3	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/A	#
4	CAD	ニューファンドランド	A/A	#, 卩
5	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/B	#
6	CAD	柴	A/B	*, #, \$, 卩
7	CAD	チワワ	B/B	#
8	CAD	ワイアー・フォックス・テリア	A/A	#
9	CAD	トイ・プードル	A/B	#
10	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/B	#
11	CAD	柴	A/B	#
12	CAD	ウエスト・ハイランド・ホホワイト・テリア	A/A	#
13	CAD	トイ・プードル	A/B	#
14	CAD	シー・ズー	B/B	*, #
15	CAD	柴	C/C	#, \$
16	CAD	柴	B/C	#, \$
17	CAD	フレンチ・ブルドッグ	A/A	#
18	CAD	柴	C/C	*, #, \$, 卩
19	CAD	秋田	A/B	#
20	CAD	ミニチュア・ダックスフンド	A/A	#

Table 3 (continued). List of the dog used in analysis in this chapter

症例番号	疾患名	犬種	ハプロタイ	
			プ	解析項目
21	CAD	ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	B/C	#
22	CAD	ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	C/C	#
23	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/A	#
24	CAD	柴	C/C	*, #, \$, †
25	CAD	柴	A/B	*, #, \$, †
26	CAD	ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	B/B	#
27	CAD	柴	C/C	#, \$
28	CAD	柴	B/C	#, \$
29	CAD	ミニチュア・シュнауザー	A/A	#
30	CAD	柴	A/C	*, #, \$
31	CAD	柴	A/C	#, \$
32	CAD	柴	C/C	#, \$
33	CAD	柴	A/A	*, #, \$
34	CAD	柴	A/A	*, #, \$
35	CAD	柴	A/C	#, \$
36	CAD	柴	B/B	*, #, \$
37	CAD	柴	B/B	*, #, \$
38	CAD	柴	A/B	#, \$
39	CAD	柴	A/C	#, \$
40	CAD	柴	C/C	*, #, \$
41	CAD	柴	C/C	*, #, \$

Table 3 (continued).

症例番号	疾患名	犬種	ハプロタイプ	解析項目
42	CAD	柴	A/C	#, \$
43	CAD	柴	A/C	#, \$
44	CAD	柴	C/C	*, #, \$
45	CAD	柴	C/C	#, \$
46	CAD	柴	A/C	#, \$
47	CAD	柴	B/C	#, \$
48	CAD	柴	B/C	#, \$
49	CAD	ラブラドル・レトリバー	A/A	*, #
50	非 CAD	ミニチュア・ダックスフンド	A/A	#
51	非 CAD	柴	B/C	#, \$
52	非 CAD	ミニチュア・ダックスフンド	A/A	#
53	非 CAD	柴	A/A	#, \$
54	非 CAD	ビーグル	A/B	#
55	非 CAD	ビーグル	A/A	#
56	非 CAD	ビーグル	A/A	*, #, †, ‡
57	非 CAD	秋田	B/B	#
58	非 CAD	ミニチュア・ダックスフンド	A/A	#
59	非 CAD	ラブラドル・レトリバー	A/A	#
60	非 CAD	柴	B/B	*, #, \$, ‡
61	非 CAD	ドーベルマン	A/B	#
62	非 CAD	雑種	A/B	#
63	非 CAD	ビーグル	A/A	*, #

Table 3 (continued).

症例番号	疾患名	犬種	ハプロタイプ	解析項目
64	非 CAD	ビーグル	A/B	*, #
65	非 CAD	ビーグル	A/A	#
66	非 CAD	ビーグル	A/A	#
67	非 CAD	ビーグル	A/A	#
68	非 CAD	柴	A/C	#, \$
69	非 CAD	柴	B/C	#, \$
70	非 CAD	柴	A/B	#, \$
71	非 CAD	柴	B/C	#, \$
72	非 CAD	柴	C/C	#, \$
73	非 CAD	柴	C/C	*, #, \$
74	非 CAD	柴	A/C	*, #, \$
75	非 CAD	柴	B/B	*, #, \$
76	非 CAD	柴	A/C	#, \$
77	非 CAD	柴	C/C	#, \$
78	非 CAD	柴	A/B	#, \$
79	非 CAD	柴	C/C	#, \$
80	非 CAD	柴	B/C	#, \$
81	非 CAD	柴	B/C	#, \$
82	非 CAD	柴	B/C	#, \$
83	非 CAD	柴	A/A	#, \$
84	非 CAD	柴	C/C	#, \$
85	非 CAD	柴	A/C	#, \$

Table 3 (continued).

症例番号	診断名	犬種	ハプロタイプ	解析項目
86	非 CAD	柴	A/C	#, \$
87	非 CAD	柴	C/C	#, \$
88	非 CAD	柴	B/B	#, \$
89	非 CAD	柴	C/C	#, \$
90	非 CAD	柴	B/C	#, \$
91	非 CAD	シー・ズー	A/A	#, \$

*: Sequencing analysis for out side of FLG repeat, #: analysis for the frequency of

the haplotype, \$: Association study between haplotype and CAD in shiba-inu,

†:FLG shotgun method, ‡: Identification of FLG mutation in dog using next

generation sequencer.

Table 4. Primer list used in sequencing analysis for outside of FLG repeat (Figure 16a)

増幅部位	プライマー	塩基配列 (5'→3')
エクソン 2 領域	DogFLGexon2-F	CTACCCCTCCCTACCTCTCG
	DogFLGexon2-R	TGTGTTTGTGTGTTGTGCATT
エクソン 3 5'側	DogFLGexon3-86F	AATTCATGTTTGCCAAAATAGTG
	DogFLGrep968R	AATCTTCTGAATGTCCTTCACTCA
エクソン 3 3'側	DogFLGrep753F	TTCCAGGGTCCCATCGTGCAGG
	DogFLGexon3+168R	TGTGTGGGTTCATATTCCTACAA

Table 5. Primer list used in FLG shotgun methods (Figure 16 b)

プライマー	塩基配列 (5'→3')
DogFLGRepeat016F	CCACCATCAGCAGTCACAGGACA
DogFLGrepP745R	GGTATCTAGAGAGTGCCCATGACTA
DogFLGrep362F	CATGAGGGTCAGGCAGCCGAT
DogFLGrep369R	CTCATGGGAGCCTGAGTGCCT
DogFLGrep753F	TTCCAGGGTCCCATCGTGCAGG

Table 6. Primer list used in identification of *FLG* gene mutation in dog using next

generation sequencer. (Figure 16 c)

増幅部位	プライマー	塩基配列 (5'→3')
エクソン 2 領域	DogFLGexon2-F	CTACCCCTCCCTACCTCTCG
	DogFLGexon2-R	TGTGTTTGTGTGTTGTGCATT
エクソン 3 5'側	DogFLGexon3-86F	AATTCATGTTTGCCAAAATAGTG
	DogFLGrep968R	AATCTTCTGAATGTCCTTCACTCA
エクソン 3 3'側	DogFLGrep753F	TTCCAGGGTCCCATCGTGCAGG
	DogFLGexon3+168R	TGTGTGGGTTTCATATTCCTACAA
FLG repeat;	DogFLGrep221F	GAGCACTCAGCATCTTATTTCTACC
Primer set 1		
	DogFLGrep190R	TCCTCTGACTGGACCTGGAC
FLG repeat;	DogFLGrep362F	CATGAGGGTCAGGCAGCCGAT
Primer set 2		
	DogFLGrep369R	CTCATGGGAGCCTGAGTGCCT
FLG repeat;	DogFLGrep410F	CACCAGCAATCGTCCACTCGG
Primer set 3		
	DogFLGrep408R	CGAGATCCAGACTCAGAATGTCC
FLG repeat;	DogFLGrep753F	TTCCAGGGTCCCATCGTGCAGG
Primer set 4		
	DogFLGrepP745R	GGTATCTAGAGAGTGCCCATGACTA

Table 7. Breed, diagnosis, and number of the dog in sequencing analysis for outside of FLG repeat.

	AD 犬	非 AD 犬	合計 (頭)
柴犬	13	4	17
ラブラドル・レトリバー	2	0	2
ビーグル	0	2	2
シー・ズー	1	0	1
合計(頭)	16	6	22

Table 8. Breed, diagnosis, and number of the dog in analysis for the frequency of the haplotype,

	AD 犬	非 AD 犬	合計(頭)
柴	28	26	54
ラブラドル・レトリバー	6	1	7
ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	4	0	4
ビーグル	0	8	8
ミニチュア・ダックスフンド	1	3	4
シー・ズー	1	1	2
トイ・プードル	2	0	2
フレンチ・ブルドッグ	2	0	2
チワワ	1	0	1
秋田	1	1	2
ニューファンドランド	1	0	1
ワイアー・フォックス・テリア	1	0	1
ドーベルマン	0	1	1
ミニチュア・シュナウザー	1	0	1
雑種	0	1	1
合計 (頭)	49	42	91

Table 9. Frequency of *FLG* gene haplotype in CAD dogs or non-CAD dogs.

ハプロタイプ	AD 犬	非 AD 犬	合計 (頭)
A/A	13 (26.5%)	13 (31.0%)	26
A/B	9 (18.4%)	6 (14.3%)	15
A/C	8 (16.3%)	5 (11.9%)	13
B/B	5 (10.2%)	4 (9.5%)	9
B/C	6 (12.2%)	7 (16.7%)	13
C/C	8 (16.3%)	7 (16.7%)	15
合計(頭)	49	42	91

Table 10. Frequency of *FLG* gene haplotype in CAD dogs or non-CAD dogs.

ハプロタイプ	AD 犬	非 AD 犬	合計 (頭)
A	43 (43.9%)	37 (45.1%)	80
B	25 (25.5%)	21 (22.0%)	46
C	30 (30.6%)	26 (31.0%)	56
合計 (頭)	98	82	182

Table 11. Frequency of *FLG* gene haplotype in shiba-inu with CAD or without CAD.

ハプロタイプ	AD 犬	非 AD 犬	合計 (頭)
A/A	2(7.1%)	2(7.7%)	4(7.4%)
A/B	4(14.3%)	2(7.7%)	6(11.1%)
A/C	8(28.6%)	5(19.2%)	13(24.1%)
B/B	2(7.1%)	3(11.5%)	5(9.3%)
B/C	5(17.9%)	7(26.9%)	12(22.2%)
C/C	7(25%)	7(26.9%)	14(25.9%)
合計(頭)	28	26	54

Table 12. Frequency of *FLG* gene haplotype in shiba-inu with CAD or without CAD.

ハプロタイプ	AD 犬	非 AD 犬	合計 (頭)
A	16(28.6%)	11(21.2%)	27(25.0%)
B	13(23.2%)	17(32.7%)	30(27.8%)
C	27(28.2%)	26(50.0%)	53(49.1%)
合計(頭)	56	52	108

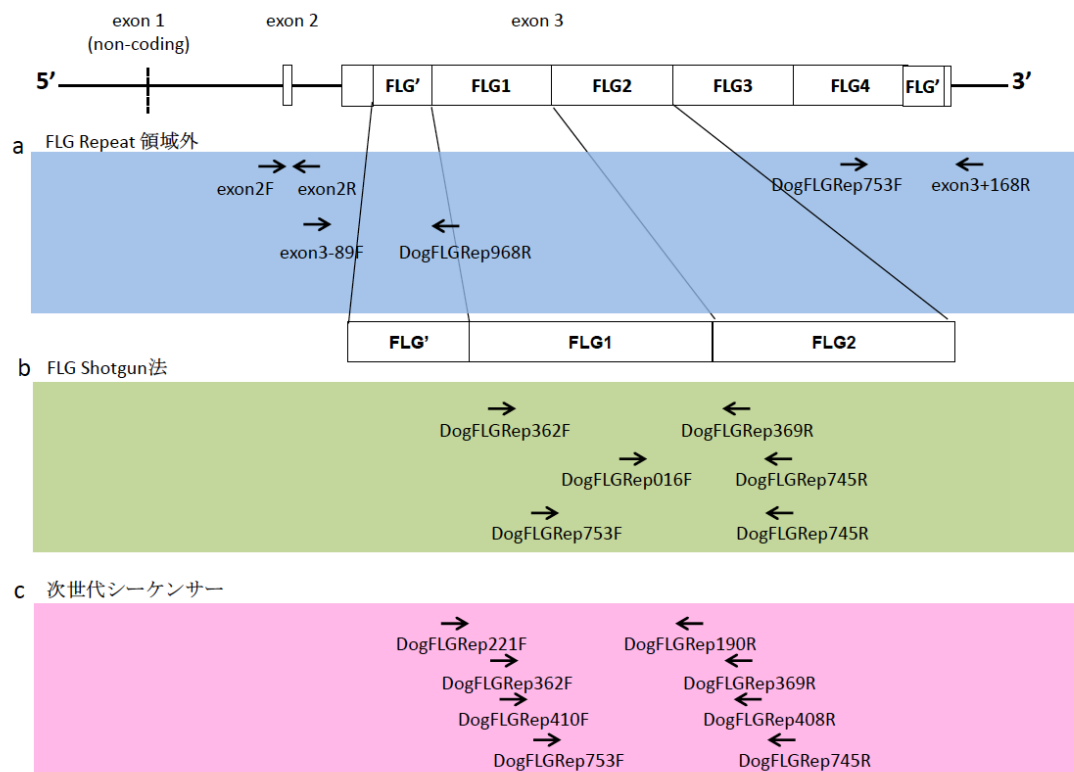


Figure 16. **Map of primers used in this chapter.** a: Primer sets used in sequencing analysis for outside of FLG repeat, b: Primer sets used in FLG Shotgun method, c: Primer sets in identification of *FLG* gene mutation in dog using next generation sequencer.

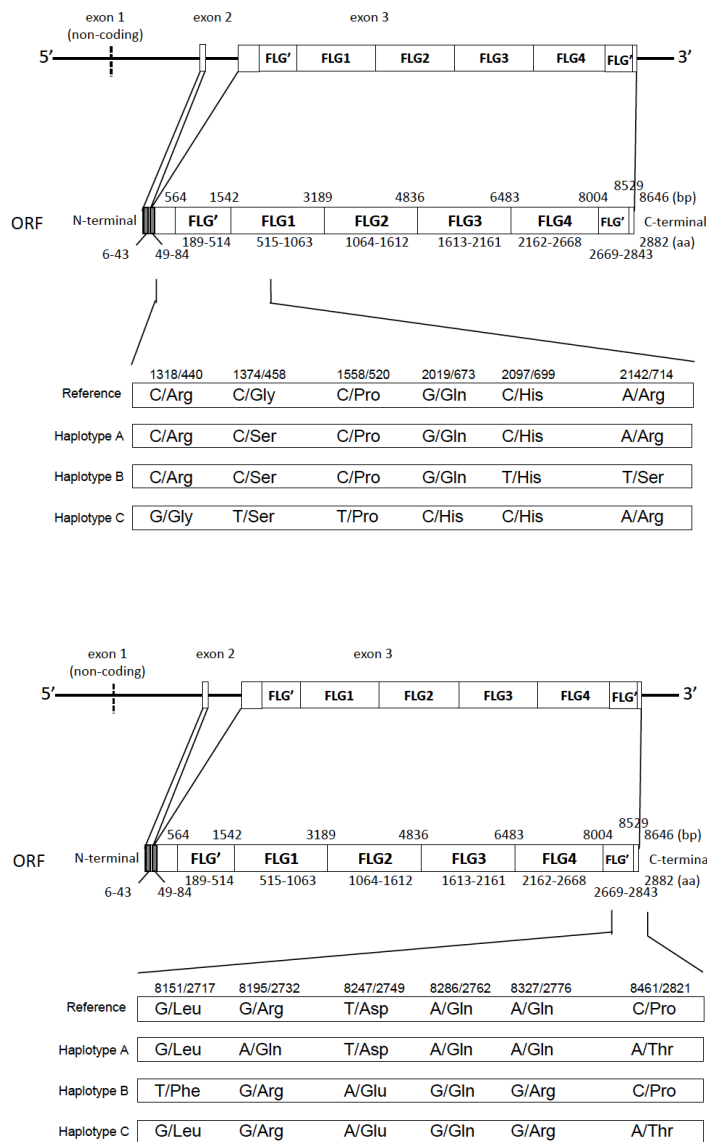


Figure 17. The location of SNPs at the outside of FLG repeat region. There are 12 SNPs at 5' end and 3' end of canine *FLG* gene. They are linked each other and classified into 3 haplotypes. The positions of each SNPs, nucleotide, and amino acids are shown in the figure.

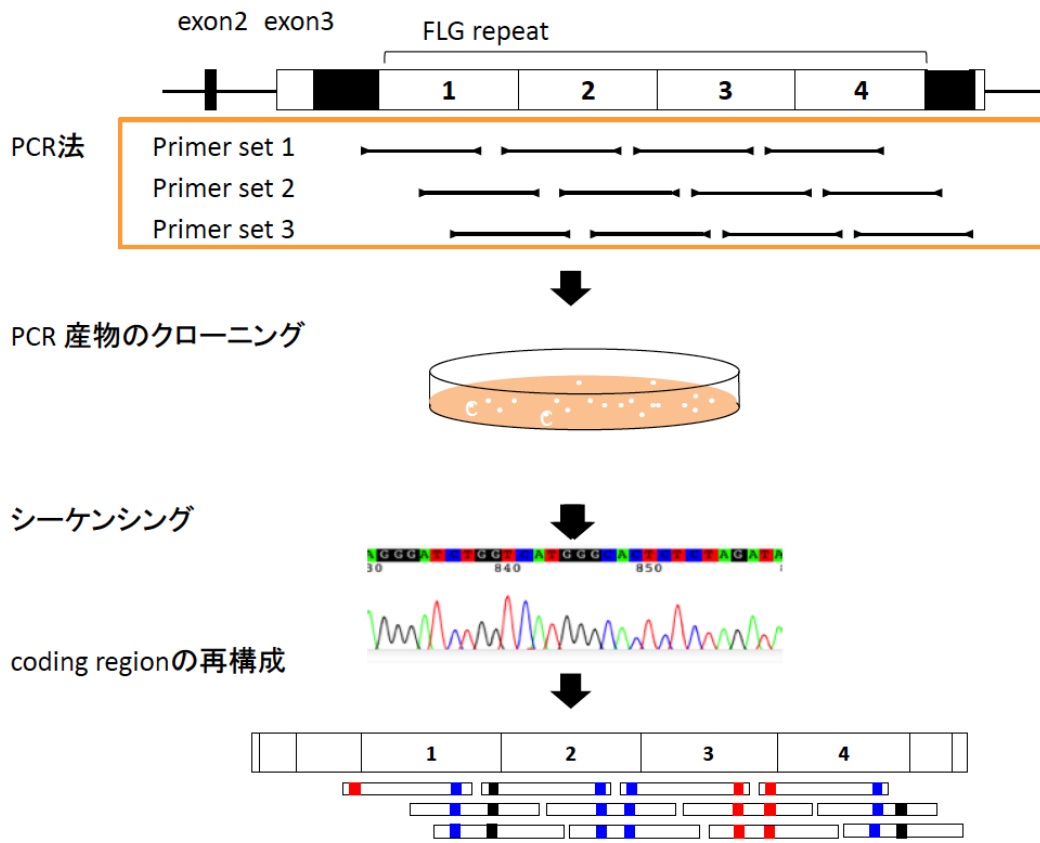


Figure 18. Frame format of FLG shotgun method. Complementary primer

sets designed for conserved region in FLG repeat and then amplified for cloning.

After cloned DNA fragment are sequenced, they are aligned and reconstructed to

cover entire DNA sequence of *FLG* gene.

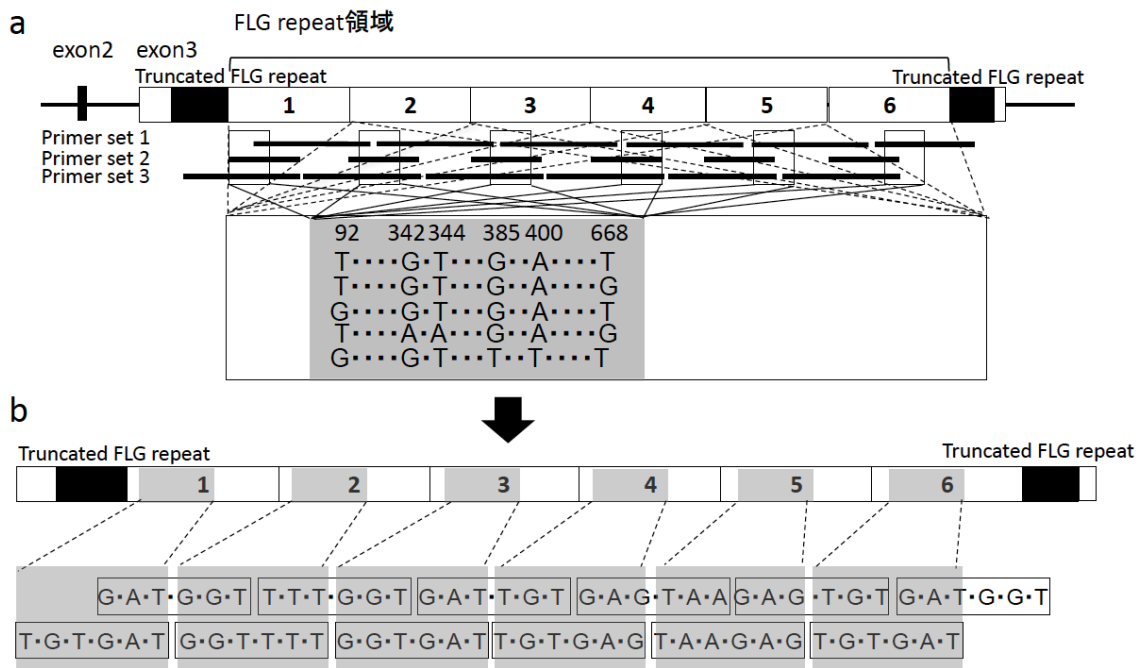


Figure 19. FLG shotgun methods for canine *FLG* gene. a; 3 primer sets

in the conserved region of FLG repeat are prepared for PCR, and cloned PCR

products are sequenced. The combination of 6 SNPs that leads to 5 type of FLG

repeat are classified. b; Alignment of entire FLG repeat are constructed like a

puzzle with these 6 SNPs.

第5章 総括

AD はイヌとヒトで類似した病態を示す慢性瘙痒性皮膚疾患である。AD の原因は多因子性と考えられており、発生に関与する遺伝子群や皮膚炎発症のメカニズムなど未だに明らかになっていない点も多い。過去の研究において、角質細胞が発現する proFLG をコードする *FLG* 遺伝子にナンセンス変異を認めるマウスにアレルゲンを経皮感作させたところ、血清中における抗原特異的 IgE 抗体価が上昇したことから、角層のバリア機能と proFLG の発現異常との関連が示唆された(9, 10)。またヒト AD 症例では、健常人よりも変異 *FLG* 遺伝子の保有率が高いことが報告されている(11)。

FLG 遺伝子は内部に複数の繰り返し配列を有し、かつ各配列間における塩基配列の相同性が著しく高いことから、PCR 法を用いた塩基配列に関する詳細な解析は長い間困難とされてきた。一方で近年では、塩基配列特異的なプライ

マーを複数組み合わせた *FLG* shotgun 法などが開発され、ヒトおよびマウスの *FLG* 遺伝子の塩基配列を完全に解読することが可能となっている(25)。

イヌはヒトと共生する哺乳動物で、動物種内における遺伝子多型がヒトよりも少なく、かつ疾患の病態がよく研究されていることから、疾患の原因遺伝子を特定する上で有用な動物種であることが過去に指摘されている(29)。CAD は特定の犬種に好発し、若齢犬での発症が多く、抗原特異的血清 IgE 抗体価の上昇や皮膚バリア機能の異常が認められるなど、ヒトの AD との類似点も多い(19, 42)。このことから CAD においても、*FLG* 遺伝子に変異が生じている可能性が示唆されてきたが、イヌ *FLG* の発現分布に関する報告は極めて少なく、さらにイヌ *FLG* 遺伝子配列についてはこれまで詳細に解析されていない。

本研究では、イヌ *FLG* 遺伝子塩基配列から予想される proFLG のドメイン解析を行うと共に、proFLG の分解産物である FLG のイヌ皮膚における発現解析を試みた。またイヌ *FLG* 遺伝子のハプロタイプと、犬種または CAD との

関連について解析を行うとともに、次世代シーケンサーを用いたイヌ *FLG* 遺伝子変異の同定を試みた。

第 2 章では、データベースに掲載されているイヌ *FLG* 遺伝子配列から pro*FLG* のアミノ酸配列を予測し、過去に配列が同定されているヒトやマウスの相同配列と比較した。その結果イヌ *FLG* 遺伝子では、*FLG* の反復配列である *FLG repeat* をコードする塩基配列がエクソン 3 に含まれるという点については共通していたが、イヌ *FLG repeat* 中には両種の相同配列には存在しない 126 bp の小さな繰り返し配列が存在していることが示された。イヌ pro*FLG* は 5'末端の N-terminal region と 3'末端の C-terminal region の間に、*FLG* が存在するという点においては、ヒトやマウスと共通していたが、*FLG* のアミノ酸配列に関してはリンカー領域を除いてヒトおよびマウスのアミノ酸配列と著しく低い相同性を示した。一方で *FLG* の機能に重要と考えられている主要

アミノ酸であるセリン，グリシン，アルギニン，グルタミン，ヒスチジンの構成比については相同配列と同様であった。

次にイヌゲノム DNA を用いたサザンブロット法を実施したところ，イヌ *FLG* 遺伝子中における *FLG repeat* の反復数が 5-7 回であることが推定された。*FLG repeat* の反復数がヒトでは 10-12 回，C57BL/6 マウスで 17 回であることを鑑みると，イヌではヒトやマウスと比べて *FLG repeat* の反復数が極めて少ないことが示唆された。またアミノ酸ドメイン解析の結果，イヌ *FLG* を構成するアミノ酸数は 549 aa (59 kDa) であり，ヒト *FLG* の 325 aa (37 kDa) やマウス *FLG* の 255 aa (26 kDa) と比較してアミノ酸数が著しく多いことが明らかになった。またイヌの *FLG* には，ヒトやマウスの相同配列には存在しない 126 bp の小さな反復配列が C 末端側に存在している。

第 3 章では第 2 章で得られた *proFLG* のアミノ酸配列情報をもとに，ウサギ抗イヌ *FLG* 抗血清を作製した。免疫組織化学染色により，作成した抗血清は

表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒や角層に一致した染色性を示した。またイヌ表皮から抽出したタンパクを基質としたウエスタンブロット法により、翻訳アミノ酸配列から予想される FLG の分子量に一致した 59kDa および 54kDa の 2本のバンドが認められた。さらに CAD の皮膚病変部における FLG の発現を免疫組織化学染色により解析したが、今回検索した CAD 症例のいずれにおいても FLG の染色パターンは健常犬と同等であった。しかし抗イヌ FLG 抗血清は、イヌ皮膚における FLG の発現異常をタンパクレベルで解析できると考えられた。

第 4 章では、PCR 法を用いてイヌ *FLG* 遺伝子の N 末端領域および C 末端領域をそれぞれ増幅し、塩基配列解析により上述の配列中に 12 ヶ所の一遺伝子多型 (SNP) が存在することを証明した。さらに SNPs の相互関係から、イヌ *FLG* 遺伝子にはヒトの相同配列と同様に 3 種類のハプロタイプが存在することを見いだした。CAD 症例と健常犬が保有するハプロタイプの発現頻度を元

に association study を行ったところ、 CAD とハプロタイプとの明らかな関連は認められなかったものの、ハプロタイプの存在という *FLG* 遺伝子変異解析にとって重要な情報を得ることができた。さらに、*FLG* shotgun 法を実施してイヌ *FLG* 遺伝子の全塩基配列解析を試みたところ、イヌ *FLG* repeat 中には少なくとも 6 ヶ所の SNPs が存在した。これらの組み合わせにより *FLG* repeat には 5 種類の塩基配列の組み合わせが存在することを見いだした。さらにリード数を増やすことでイヌ *FLG* repeat の内部配列を詳細に解析するため、次世代シーケンサーを用いてイヌ *FLG* 遺伝子の塩基配列解析を試みたとともに、CAD に罹患した 5 症例、健常犬 3 頭を用いて本症に関連する遺伝子変異の同定を試みた。しかしながら今回検討した全症例で、本症に関与する遺伝子変異は確認できなかった。

以上をまとめると、イヌ pro*FLG* の予測アミノ酸配列を初めて詳細に解析し、同配列がヒトやマウスの相同配列よりも反復数の少ない *FLG* repeat により構

成されていることを見出した。またイヌ皮膚における *FLG* の組織学的分布が、ヒトやマウスにおける分布と同様であることを確認した。さらにイヌ *FLG* 遺伝子には SNPs の組み合わせに基づく複数のハプロタイプが存在することを発見した。これに対し CAD 症例に関連する *FLG* の発現異常または *FLG* 遺伝子の変異を、本研究において証明することはできなかった。

しかしながら、組織学的に *FLG* の発現異常を解析した CAD 症例は 7 頭のみ、次世代シーケンサーを用いて *FLG* 遺伝子全体の塩基配列解読と変異の検索を行った CAD 症例が 5 頭、健常犬は 3 頭のみであったことから、今後は解析を行う頭数を増やすことで *FLG* 発現異常に関連する遺伝子変異を特定することができる可能性が考えられた。

本研究で開発した抗イヌ *FLG* 抗血清、ならびに本研究で用いた分子生物学的手法は、今後イヌに発症する魚鱗癬などの角化異常と関連する皮膚疾患にお

ける FLG の発現異常や遺伝子変異を詳細に解析する上で極めて有用であると

考えられた。

参考文献

- 1) Miller, W.H., Griffin, C.E. and Campbell, K L. (2013). Structure and Function of the Skin. *In: Muller & Keirk's Small Animal Dermatology*, 7th ed. pp. 8~20. ELSEVIER, Missouri.
- 2) Lings, A.V. and Harding, C.R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* 17 (Suppl) 1, 43~8.
- 3) Nemes, Z. and Steinert, P.M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5~19.
- 4) Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 328~40.
- 5) Dale, B.A., Resing, K.A. and Lonsdale-Eccles, J.D. (1985). Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann. N Y Acad. Sci.* 455, 330~42.
- 6) Mack, J.W., Steven, A.C. and Steinert P.M. (1993). The mechanism of

interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper

hypothesis. *J. Mol. Biol.* 232, 50~66.

- 7) Manabe, M., Sanchez, M., Sun, T.T. and Dale, B.A. (1991). Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation*. 48, 43~50.
- 8) Smith, F.J., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L.E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A.T., Goudie, D.R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C.S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S.J., Compton, J.G., DiGiovanna, J.J., Presland, R.B., Fleckman, P. and McLean, W.H. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* 38, 337~42.
- 9) Fallon, P.G., Sasaki, T., Sandilands, A., Campbell, L.E., Saunders, S.P., Mangan, N.E., Callanan, J.J., Kawasaki, H., Shiohama, A., Kubo, A., Sundberg,

J.P., Presland, R.B., Fleckman, P., Shimizu, N., Kudoh, J., Irvine, A.D., Amagai, M. and McLean, W.H. (2009). A homozygous frameshift mutation in the murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat. Genet.* 41, 602~8.

10) Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., Shimizu, A., Mizuno, H., Yamada, T. and Amagai, M. (2012). Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1538~46.

11) Sandilands, A., Terron-Kwiatkowski, A., Hull, P.R., O'Regan, G.M., Clayton, T.H., Watson, R.M., Carrick, T., Evans, A.T., Liao, H., Zhao, Y., Campbell, L.E., Schmuth, M., Gruber, R., Janecke, A.R., Elias, P.M., van Steensel, M.A., Nagtzaam, I., van Geel, M., Steijlen, P.M., Munro, C.S., Bradley, D.G., Palmer, C.N., Smith, F.J., McLean, W.H. and Irvine, A.D. (2007). Comprehensive

analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat. Genet.* 39, 650~4.

12) Akiyama M. (2010). FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *Br. J. Dermatol.* 162, 472~7.

13) Nomura, T., Akiyama, M., Sandilands, A., Nemoto-Hasebe, I., Sakai, K., Nagasaki, A., Palmer, C.N., Smith, F.J., McLean, W.H. and Shimizu, H. (2009). Prevalent and Rare Mutations in the Gene Encoding Filaggrin in Japanese Patients with Ichthyosis Vulgaris and Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1302~5.

14) Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 207~8.

15) Sousa, C.A. and Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 153~7.

16) Olivry, T. (2011). Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis?

Vet. Immunol. Immunopathol. 144, 11~6.

17) Hill, P.B. and DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic

dermatitis (IV): environmental allergens. Vet. Immunol. Immunopathol. 81,

169~86.

18) Miller, W.H., Griffin, C.E. and Campbell, K. L. (2013). Hypersensitivity

disorders. *In*: Muller & Keirk's Small Animal Dermatology, 7th ed., pp.

363~431. ELSEVIER, Missouri.

19) Marsella, R. and Olivry, T. (2003). Animal models of atopic dermatitis. Clin.

Dermatol. 21, 122~33.

20) Marsella, R., Olivry, T. and Carlotti, D.N. (2011). Current evidence of skin

barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. Vet. Dermatol. 22,

239~248.

21) Wood, S.H., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. and Carter, S.D. (2010).

Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 138, 193~7.

22) Presland, R.B., Rothnagel, J.A. and Lawrence, O.T. (2006). ProFilaggrin and the Fused S100 Family of Calcium-Binding proteins. *In: Elias P.M., Feingold K.R. [eds] Skin Barrier*, 1st ed. pp. 111~40. Taylor & Francis, New York.

23) McKinley-Grant, L.J., Idler, W.W., Bernstein, I.A., Parry, D.A., Cannizzaro, L., Croce, C.M., Huebner, K., Lessin, S.R. and Steinert PM. (1989). Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 4848~52.

24) Presland, R.B., Haydock, P.V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W. and Dale, B.A.

- (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol. Chem.* 267, 23772~81.
- 25) Sasaki, T., Kudoh, J., Ebihara, T., Shiohama, A., Asakawa, S., Shimizu, A., Takayanagi, A., Dekio, I., Sadahira, C., Amagai, M. and Shimizu N. (2008). Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 51, 113~20.
- 26) Gan , S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Markova, N. and Steinert, P.M. (1990). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry.* 29, 9432~40.
- 27) Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D. and McLean, W.H. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell. Sci.* 122, 1285~94.

28) Pearton, D.J., Dale, B.A. and Presland, R.B. (2002). Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J. Invest. Dermatol.* 119, 661~9.

29) Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J. III., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., DeJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T.,

Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J.,
Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N.,
Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P.,
Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K.,
Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O,
Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S.,
FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber,
M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois,
E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C.,
Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby,
M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D.,
Kieu, A.C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W.,
Leger, J.P., Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y.,

Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K.,
Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus,
L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L.,
Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C.,
Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P.,
O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang,
P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V.,
Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S.,
Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J.,
Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S.,
Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S.,
Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T.,
Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiand,

M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q.,

Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A. and Lander, E.S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438, 803~19.

30) Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.

(1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876~82.

31) Erik, L.L.S. and Richard, D. (1996). A dot-matrix program with dynamic

threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene* 167, GC1~10.

32) Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R. and Schröder, J.M. (2009).

Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the

S100 fused-type protein family. PLoS One. 4, e5227.

- 33) Resing, K.A., Walsh, K.A., Haugen-Scofield, J. and Dale, B.A. (1989).

Identification of proteolytic cleavage sites in the conversion of profilaggrin to filaggrin in mammalian epidermis. J. Biol. Chem. 264, 1837~45.

- 34) Rothnagel, J.A., Steinert, P.M. (1990). The structure of the gene for mouse

filaggrin and a comparison of the repeating units. J. Biol. Chem. 265, 1862~5.

- 35) Nemoto-Hasebe, I., Akiyama, M., Nomura, T., Sandilands, A., McLean, W.H.

and Shimizu H. (2009). FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema. Br. J. Dermatol. 161, 1387~90.

- 36) Resing, K.A., Johnson, R.S. and Walsh, K.A. (1993). Characterization of

protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin.

Biochemistry. 32, 10036~45.

- 37) Kam, E., Resing, K.A., Lim, S.K. and Dale, B.A. (1993). Identification of rat epidermal profilaggrin phosphatase as a member of the protein phosphatase 2A family. *J. Cell. Sci.* 106, 219~26.
- 38) Marsella, R., Samuelson, D. and Harrington, L. (2009). Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet. Dermatol.* 20, 547~554.
- 39) Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. and Picco F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet. Dermatol.* 21, 23~31.
- 40) Chen, H., Ho, J.C., Sandilands, A., Chan, Y.C., Giam, Y.C., Evans, A.T., Lane, E.B. and McLean, W.H. (2008). Unique and Recurrent Mutations in the Filaggrin Gene in Singaporean Chinese Patients with Ichthyosis Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1669~75.

- 41) Sybert, V.P., Dale, B.A. and Holbrook, K.A. (1985). Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J. Invest. Dermatol.* 84, 191~4.
- 42) Marsella, R. and Girolomoni, G. (2009). Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *J. Invest. Dermatol* 129, 2351~57.
- 43) Terada, Y., Nagata, M., Murayama, N., Nanko, H. and Furue, M. (2011). Clinical comparison of human and canine atopic dermatitis using human diagnostic criteria (Japanese Dermatological Association, 2009): proposal of provisional diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 38, 784~90.
- 44) Heng, Li. and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754~1760.
- 45) McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky,

A., Garimella, k., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. and DePristo, M.A. (2010).

The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-

generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297~1303.

46) Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land,

S.J., Lu, X. and Ruden, D.M. (2012). A program for annotating and predicting

the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of

Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly.* 6, 80~92.

47) Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S.,

Getz, G. and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.*

29, 24~6.

謝辞

本研究を退職直前までご指導いただきました東京農工大学農学部獣医内科学研究室の岩崎利郎元教授，岩崎先生の後を引き継ぎ細部まで詳細にご指導くださいました東京農工大学農学部獣医内化学研究室の西藤公司准教授に深謝いたします。また研究について多大なるご助言をいただき，終始叱咤激励していただきました慶應義塾大学医学部皮膚科学教室の天谷雅行教授，慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室の工藤純教授に深謝いたします。分子生物実験やタンパク実験に関する実験手技を一から私が理解するまで，熱心に指導してくださいました慶應義塾大学医学部研究支援センターの佐々木貴史特任助教，慶應義塾大学医学部 MED アレルギー研究寄附講座の塩濱愛子特任講師に深謝いたします。また，サザンプロット法ならびに次世代シーケンサー（Miseq）に用いる被検材料の調整を補助していただくのと同時に，日々励ましていただき，実験

の成功をともに喜んでいただいた慶応義塾大学遺伝子医学研究室の古橋ミエ

さん，慶応義塾大学分子生物教室の讃岐奈緒子さんに心から感謝いたします。