

D-11 Epiplakin (450-kDa Human Epidermal Autoantigen)の組織局在

藤原作平、大谷裕一郎、竹尾直子(大分医大、皮膚科)、松尾哲孝、吉岡秀克(同生化学)、国松已歳(名古屋市立大学生化学)

目的

自己免疫性水疱症患者の血清が認識した 450-kDa ヒト表皮自己抗原のcDNAの全塩基配列を決定した結果5,065個のアミノ酸からなり、推定分子量は 552kDa であった。以前の報告通りこの蛋白質は、プラキン・ファミリーに属したが、分子のほぼ全体にわたりデスモプラキンのカルボキシ末端の B ドメイン類似構造が 13 個分布し、棒状ドメイン、アミノ末端ドメインが認められず、構造上他のプラキン分子と大きく異なっているため、Epiplakin と命名を変更した。プラキンの新しいカテゴリーに属するこの分子の機能を解明する目的で、この分子に特異的なアミノ酸配列を用いたノーザン・ドットプロットと同配列に対する単クローン抗体、多クローン抗体を作成し、組織局在を検討した。

方法

ヒト各臓器由来 poly(A)+RNA と、カルボキシ末端に存在する Epiplakin 特異配列をプローブにしてノーザン・ドットプロットを行なった。また同じ配列を挿入した GST 融合蛋白質をラットに免疫し、単クローン抗体、多クローン抗体を作成した。さらに患者血清が認識した抗原エпитープに対する多クローン抗体も作成し、これらの抗体を用いて免疫組織染色を行なった。

結果

エピプラキンは、ドットプロットでは、胎盤、肝臓、胃、小腸、大腸、虫垂、唾液腺、脳に発現が認められた。エピプラキン特異配列に対する単クローン、もしくは 2 種の多クローン抗体を用いた免疫組織染色では、皮膚では基底細胞層がやや弱い、ほぼ全層が陽性であり、汗腺分泌部と毛包も陽性であった。食道粘膜上皮も全層が陽性で、唾液腺、胃、小腸、大腸粘膜も陽性に染色された。

考察

エピプラキンは、その特異構造から、中間径フィラメントを束ねる役割を果たすのではないかと推定されているが、重層扁平上皮のみではなく、単層上皮にも発現がみられたことから、複数種の中間径フィラメントとの相互作用が示唆された。

結論

エピプラキンは、皮膚、食道等の重層扁平上皮の他、胃、小腸、大腸、唾液腺等の単層上皮に発現していることが明らかになった。

D-12 肝細胞の種類による endostatin 分泌の相違

友野靖子¹⁾・渡辺綱一²⁾・内藤一郎³⁾・佐渡義一⁴⁾・坪井壮⁵⁾・宮崎正博⁶⁾・難波正義⁶⁾・二宮善文²⁾(重井医学研¹⁾分子細胞生物・³⁾超微病理・⁴⁾免疫・⁵⁾附属病院、岡山大医²⁾分子医化学・⁶⁾細胞生物)(目的) endostatin は XVIII 型コラーゲン(以後 XVIII 型)の NC1 領域に有り、抗血管新生作用により腫瘍成長阻害活性を示す。組換え endostatin、XVIII 型 NC1 およびヘリックス領域にそれぞれ特異的なモノクローナル抗体(CM187、CH18B および CH18D)を用いて、ヒト肝細胞株(JHH-1)および高分化型ヒト不死化肝細胞株(OUMS-29)の分泌するコラーゲン画分を分析し、endostatin 分泌形態が異なることおよび XVIII 型が IV 型と結合している可能性を見出した。(方法) JHH-1 および OUMS-29 を無血清培地で 2 日間培養した。培養上清および 10%TCA で回収した cell layer を SDS で可溶化後 SDS-PAGE し、CH18B および CH18D を用いてウェスタンブロット分析した。また、精製 CM187 を用いて免疫沈降を行った。(結果)JHH-1 は培養上清中に、200kD 以上の高分子量 XVIII 型を、OUMS-29 は NC1 と endostatin を主に分泌していた。一方両細胞の cell layer には、CH18B、CH18D の両方で陽性の 150kD のバンドが認められ、分子量から、肝特異的な long form XVIII 型であると考えられた。また免疫沈降の結果、CM187 には JHH-1 培養上清中の高分子量 XVIII 型が、OUMS-29 培養上清中の NC1 と endostatin が結合していた。さらに、JHH-1 の免疫沈降画分には IV 型特異抗体で陽性のバンドが認められた。(考察・結論) OUMS-29 は正常な肝機能を維持した不死化肝細胞株であり、endostatin の分泌形態が肝細胞株 JHH-1 と異なることは、正常肝細胞がもつ性質を反映したものである可能性が高い。すなわち、肝細胞株では基底膜成分として XVIII 型に結合した形で存在し、一方、正常肝細胞では endostatin の形で細胞外に存在していると考えられた。さらに、肝細胞株から分泌された XVIII 型と IV 型は何らかの結合をしている可能性が示唆された。Difference in endostatin secretion between highly differentiated human immortalized hepatocyte cells (OUMS-29) and hepatocarcinoma cells (JHH-1) Yasuko Tomono¹⁾, Tadakazu Watanabe²⁾, Ichiro Naito³⁾, Yoshikazu Sado⁴⁾, Sou Tsuboi⁵⁾, Masahiro Miyazaki⁶⁾, Masayoshi Namba⁶⁾ and Yoshifumi Ninomiya²⁾ Divs. ¹⁾ Mol. Cell Biol., ³⁾ Ultrastruct. Biol., ⁴⁾ Immunol., ⁵⁾ Hospital, Shigei Med. Res. Inst., Depts. ²⁾ Mol. Biol. and Biochem. and ⁶⁾ Cell Biol., Okayama Univ. Med.Sch.

Tissue Localization of Epiplakin.

Sakuhei Fujiwara, Yuichiro Otani, Naoko Takeo, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka (Department of Dermatology and 2nd Biochemistry, Oita Medical University), Mitoshi

Kunimatsu (Department of Biochemistry, Nagoya City University Medical School)