

ノックアウトマウスによる cell envelope のバリアー機能解析

京都府立医科大学 皮膚科学教室

山 西 清 文

At the cell periphery of the stratum corneum is the cell envelope, a highly insoluble membranous structure composed of proteins polymerized via ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-linking. We generated mice with defective cell envelope by gene targeting for transglutaminase 1. The skin barrier function of TGase 1^{-/-} neonates, assessed by measurement of TEWL, by in vitro diffusion of mannitol, and by in vivo transdermal absorption of lucifer yellow, was markedly impaired, and these mice died within 4-5 h after birth. This knock-out study has clearly demonstrated that the cell envelope formation by TGase 1 gene is essential for maintenance of the skin barrier function.

1 緒 言

細胞は形質膜によって外界から隔てられた環境を維持し、生命活動を可能にしているが、われわれの生体を外部環境から保護し、内部環境を保つ生物学的なシステムとして、体表面に角質が産生される。角質は皮膚の表層を構成する表皮細胞（角化細胞）が終末分化（角化）の結果、細胞そのものが特異な変化をとげて作り出される構造である¹⁾。形態的には、細胞内には、細胞骨格を構成するケラチン中間径線維がフィラグリンとともに凝集して充満し、細胞の周囲には15から20nmに肥厚した電子密度の高い膜様構造が形成される。この構造はcell envelope（電顕的にはmarginal band）とよばれ、不溶性で化学的な抵抗性を有する ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合で架橋された蛋白から成り、機械的あるいは化学的侵襲に対する障壁として機能すると考えられている。また、cell envelopeを構成する蛋白として、ロリクリン、インボルクリン、コーニフィンなどの構造蛋白以外に、プロテアーゼインヒビターであ

るエラフィン、シスタチン- α も見出され、微生物のプロテアーゼに対して抵抗性であることから、微生物に対する生体防御にも関わることが示唆される。 ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合を触媒する酵素として、transglutaminases (TGases) (E 2.3.2.13) の存在が知られているが、TGase 2 (tissue TGase) は各組織に広く発現するのに対し、表皮角化細胞では、TGase 1 (keratinocyte TGase) と TGase 3 (epidermal TGase) が特異的に発現すること²⁻⁵⁾、さらに、遺伝性皮膚疾患である常染色体劣性葉状魚鱗癬 (MIM242300) の家系においてTGase 1の突然変異が見出され^{6, 7)}、葉状魚鱗癬の一部の患者においてcell envelopeの形成不全が見られることから、TGase 1がcell envelopeの形成に関与する可能性が推測される。本研究では、TGase 1のジーンターゲティングによりTGase 1遺伝子破壊マウスを作製し⁸⁾、cell envelopeの形成におけるTGase 1の役割を明確にし、cell envelopeの障害にともなう皮膚バリアー機能の変化を解析した。

2 実 験

pPNT および ES 細胞 R1 は、それぞれ、Dr. R. Mulligan、Dr. A. Nagy より供与された。mouse TGase1 genomic DNA は 129/SVJ genomic library (Stratagene) をスクリーニングして得られ、その5'上流5.5kbとexon 3より3'側



Analysis of cell envelope for skin barrier function in Knockout mice

Kiyofumi Yamanishi

Department of Dermatology, Kyoto Prefectural University of Medicine

の2.5kbの領域を pPNT の Xba I-Kpn I および Xho I-Not I site に挿入し、pPNTmtg 1 を構築した。 1×10^7 個の ES 細胞に直鎖化した pPNTmtg 1 (25 μ g) を electroporation で導入後、G418 (150 μ g/mL) と gancyclovir (0.51 μ g/mL) で選択を行い、ES 細胞コロニーを PCR (primers: P1、P2) と Southern hybridization (probe1、2) で解析し、相同組み換えを起こした ES クローンを単離した。ES クローン由来 F₂ マウスの遺伝子型は、PCR (primers: P 3、P 4、P 5) と Southern hybridization (probe 1、2) で解析した。Northern hybridization には Oligotex dT30 (TAKARA) で部分精製した 5 μ g の poly (A)⁺ RNA を用い、各 TGase cDNA に対応する RT-PCR 産物をプローブにした。Hematoxylin-eosin 染色および *in situ* hybridization には 4 μ m パラフィン組織切片を用いた。*In situ* hybridization は digoxigenin ラベルマウス TGase 1 および keratin14 antisense cRNA probe を用いて行った。蛍光抗体法によるロリクリンの観察には、抗マウス・ロリクリン抗体 (BA bCo) を用いた。透過電顕による観察は、常法に従って実施した。

経皮水分蒸散 (TEWL) の測定には Courage and Khazaka Tewameter TM210 を用いた。*In vitro* における経皮吸収の測定は、新生仔マウス背部皮膚を採取し、拡散セル (有効表面積: 0.126 cm²) に挟んで 37°C Ringer 液 (pH7.4) に平衡化したのちに、表皮側に [³H] mannitol (NEN) (10 μ Ci/mL) を添加後、500 μ L の溶液を真皮側から採取し、その直後に等の Ringer 液を添加する操作を経時的に行った。*In vivo* における蛍光色素の経皮吸収は、新生仔マウスをベトリ皿に固定し背部を 1 mM lucifer yellow を含む Ringer 液 (pH7.4) に 1 時間浸したのちに、背腹方向に 5 μ m の凍結切片を作製し、propidium iodide (5 μ g/mL) で対比染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

3 結果

TGase 1 のジーンターゲッティングは、129SVJ

マウスゲノムライブラリーからクローニングした TGase 1 ゲノム DNA を用いて、pPNT をもとに、exon 1 から 3 が Neo によって破壊されるようにデザインしたターゲティングベクターを構築し⁸⁾、ES 細胞株 R 1 に導入後、G418 と gancyclovir による positive-negative selection を行い、TGase 1 遺伝子の一方の allele に相同組換えをおこした ES クローンを単離した。ES クローン #27 と #32 を C57BL/6 マウスの胚盤胞にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植した。その結果、#27 よりキメラマウスが得られ、キメラマウスと B6 を交配しヘテロマウス (TGase 1^{+/+}) を得、さらにヘテロマウス同士を交配して TGase 1 欠損マウス (TGase 1^{-/-}) を作製した。TGase 1^{-/-}における TGase ファミリーの mRNA を Northern blotting で解析したところ、TGase 1 mRNA は、TGase 1^{+/+}では TGase 1^{+/+}の 1/2 であったが、TGase 1^{-/-}では検出されなかった。また、TGase 2、TGase 3 mRNA には変化が認められなかった。

TGase 1^{-/-}新生仔マウスは、やや体格が小さく、皮膚は緊張して皺壁が少なく、紅皮症状態を呈した (図1)。TGase 1^{-/-}は生後全くほ乳せず、4-5 時間のうちに死亡した。なかには、葉状魚

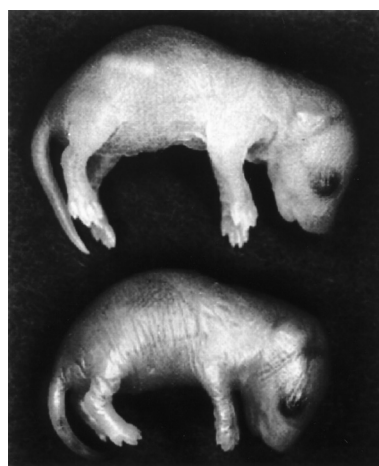


図1 TGase 1 欠損マウスの肉眼的所見
正常新生仔マウス (上) に比較して、TGase 1 欠損マウスは (下) は体格が小さく、皮膚は緊張し、皺壁が粗く、紅皮症状態である。

鱗癬の新生児でみられる collodion baby を思わせるような、透過性のうすい膜で包まれている新生仔も認められた。

新生仔マウス皮膚の HE 染色像では、TGase 1^{-/-}の表皮は伸展し、角層は、正常マウスでみられる明確な層状構造とは異なり、均質で、下層から中層にかけて扁平なケラトヒアリン顆粒の残存が認められた。In situ hybridization では、正常マウス表皮において TGase1 mRNA は有棘層上層から顆粒層にかけて発現するが、TGase 1^{-/-}ではその発現は認められず、対照として、ケラチン 14mRNA の発現は、正常と同様に、基底層から有棘層数層にかけて認められた。Cell envelope の主要な構成蛋白であるロリクリンの局在は TGase 1^{-/-}の角層において低下し、TGase 1^{-/-}では、ロリクリン局在化の障害が示唆された。

18.5 日胎仔表皮の電顕的観察では、TGase 1^{-/-}マウスでは、正常のコンパクトな角質の構造とは異なり、角質細胞は膨化し、ケラトヒアリン F 顆粒の残存が認められた。marginal band (cell envelope) は消失し、その代わり、細胞膜にそって電子密度の高い顆粒が認められた (図 2)。これらの所見から、TGase 1^{-/-}では、ケラトヒアリン F 顆粒の分解の遅滞と cell envelope 形成の

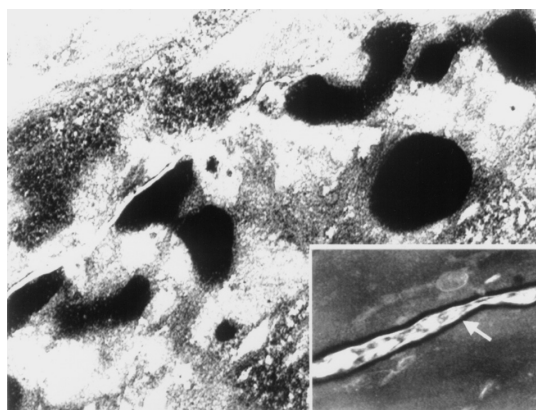


図2 TGase 1 欠損マウス角質の電顕所見

正常マウス (胎生 18.5 日) では、角質細胞辺縁は肥厚した cell envelope がみられるが (囲み内矢印)、TGase 1 欠損マウスでは cell envelope は欠落し、細胞膜に沿って、あるいはその近傍の細胞質内に高電子密度顆粒がみられる。

障害が示唆された。

皮膚の生理学的な指標として、皮膚のバリア機能を解析するために、まず、エバポリメーターを用いて経皮水分蒸散 TEWL の測定を行った。その結果、TGase 1^{+/+}や TGase 1^{+/-}に比し、TGase 1^{-/-}の TEWL は 100 倍以上亢進していることが明らかになった (図 3)。また、新生仔皮膚をもちいて mannitol の透過性を測定したところ、TGase 1^{-/-}皮膚における mannitol の透過速度は対照の 1000 倍以上と著明な亢進を示し (図 4)、さらに lucifer yellow の経皮吸収実験では、lucifer yellow を 1 時間新生仔背部皮膚に接

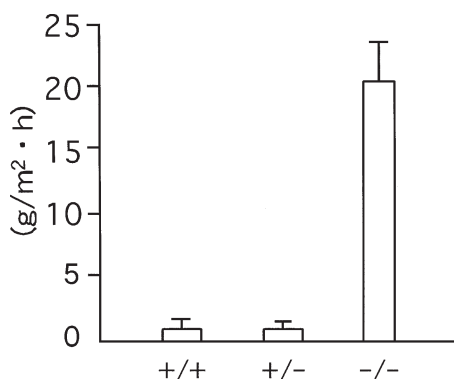


図3 TGase 1 欠損マウスの経表皮水分蒸散 (TEWL)

野生型 (+/+), ヘテロ変異新生仔マウス (+/-) に比較して、TGase 1 欠損マウス (-/-) では TEWL は 100 倍以上に増加している。

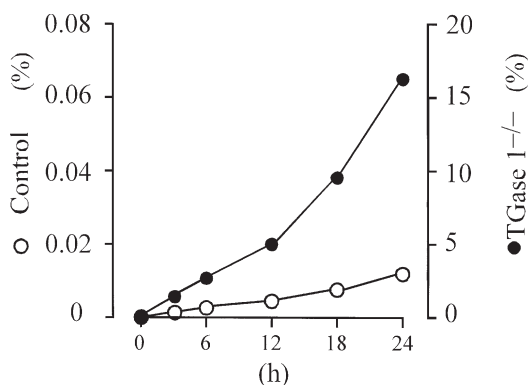


図4 TGase 1 欠損マウスにおける mannitol の経皮吸収

新生仔マウス剥離皮膚をもちいて mannitol 透過速度を測定した結果、正常マウス (○) に比較して、TGase 1 欠損マウス (●) では 1000 倍以上の増加が観察される。

触させた場合、対照では lucifer yellow は角層に止まるが、TGase 1^{-/-}では真皮にまで到達することが確認された。これらの結果から、TGase 1^{-/-}では皮膚のバリアー機能が著しく障害されていると考えられた。

4 考 察

TGase 1 遺伝子欠損マウスの解析から、TGase 1 遺伝子は角質の発生と成熟、とくに cell envelope の形成に必須であり、生後の外部環境への適応と個体の生存のために極めて重要な遺伝子であることが示唆された。TGase 1^{-/-}における皮膚のバリアー機能の著しい障害は、cell envelope の欠損に起因すると考えられるが、cell envelope を構成する前駆蛋白の重合不全、あるいは、cell envelope を覆う lipid envelope の何れが主要な役割を担っているのか、今後の研究課題である。

引用文献

- 1) Roop DR: Defects in the barrier. *Science*, 267, 474-475, 1995.
- 2) Yamanishi K, Inazawa J, Liew F-M, *et al.*: Structure of the gene for human transglutaminase 1. *J. Biol. Chem.*, 267, 17858-17863, 1992.
- 3) Ueda E, Ohno S, Kuroki T, *et al.* The ϵ isoform of protein kinase C mediates transcriptional activation of the human transglutaminase 1 gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 9790-9794, 1996.
- 4) Yamada K, Matsuki M, Morishima Y *et al.*: Activation of the human transglutaminase 1 promoter in transgenic mice: Terminal differentiation-specific expression of the TGM1-lacZ transgene in keratinized stratified squamous epithelia. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 2223-2231, 1997.
- 5) Kim I-G, Lee S-C, Lee J-H, *et al.*: Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family. *J. Invest. Dermatol.*, 103, 137-142, 1994.
- 6) Huber M, Rettler I, Bernasconi K, *et al.*: Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*, 267, 525-528, 1995.
- 7) Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, *et al.*: Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nature Genet.*, 9, 279-283, 1995.
- 8) Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, *et al.*: Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1044-1049, 1998./