

皮膚表皮形成に関わるタンパク質架橋接着反応の分子基盤 (高反応性基質配列ペプチドを用いた皮膚型トランスグルタミナーゼの高感度で特異的な活性検出法の確立)

名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻

人 見 清 隆

Transglutaminase 1 (TGase 1) is an essential enzyme for cornified envelope formation in stratified squamous epithelia. This enzyme catalyzes the cross-linking of glutamine- and lysine residues in structural proteins in differentiating keratinocytes. We had used a phage-displayed random peptide library for screening of primary amino acid sequences that are preferentially selected by human TGase 1. We had identified the most reactive sequence (K5) by evaluation of reactivity as GST-fused recombinant protein. In this study, we have confirmed that K5 appeared to have high and specific reactivity as substrate, even in the peptide form. Furthermore, *in situ* analysis of mouse skin sections using the fluorescence-conjugated K5 peptide resulted in the detection of TGase 1 activity with high sensitivity. Additionally, we have established a specific assay system using this peptide. In conclusion, we have established *in situ* and *in vitro* detection system using substrate peptide as sensitive and specific detection of endogenous TGase 1 activity in the skin.

1. 緒 言

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼは、タンパク質中のグルタミン残基と異種または同種タンパク質のリジン残基に、イソペプチド結合形成を触媒する架橋化酵素である。同時にまた、グルタミン残基に一級アミンを取り込ませたり、脱アミド化することでグルタミン酸へと変換させたりする場合もある(図1A)。この酵素反応は高等動物の多くの組織で観察され、植物や下等真核生物、微生物にも類似の反応様式が見られる事が知られている。高等動物においては、これらの酵素の活性発現にはカルシウムイオンが必要であり、カルシウムシグナルに応答して多彩な生理現象に関わっている。トランスグルタミナーゼの生理的意義は、血液凝固、細胞死、形態形成、細胞外マトリクスの強化と幅広く、今なお未知の役割が発見される可能性もある。トランスグルタミナーゼはヒトにおいてはこれまで8種のアイソザイムの存在が報告されているが、表皮組織には主に3つのアイソザイム(TGase 1, TGase 3, TGase 5)が存在する。

皮膚表皮の形成は、表皮深層の未分化な前駆細胞が分化成熟して、角化した表皮細胞として表層に押し出されることによって達成される。またこの分化過程は、細胞内外のカルシウム濃度の変化によって支配されている。表皮細胞の分化に伴い、細胞内のロリクリン、インボルクリン、small proline rich protein (SPR)などの構造タンパク質群

が、トランスグルタミナーゼによる共有結合的な架橋を受ける。これらの構造物が細胞膜直下に裏打ち構造(cornified envelop)として形成される結果、表皮細胞は硬度化が生じ、外部に対し物理的にも化学的にも強力なバリアとして機能することになる(図1B)。

我々はこれまで、皮膚表皮に存在するTGaseのうち、TGase 1とTGase 3の組換えタンパク質を作製して、その生化学的解析に従事してきた^{1, 2)}。これらの酵素は不活性な前駆体として合成された後、TGase 1が*in vitro*においてカルパインで、TGase 3がカテプシンによって限定分解されて活性化されることを明らかにしてきた。

また一方で、近年我々は、トランスグルタミナーゼが架橋する基質としては、どのような一次構造(アミノ酸配列)があれば認識されやすいのか、という課題に取り組んできた(どのグルタミンやリジンでも区別なく架橋重合するのではない)。これまで、ファージ提示型ランダムペプチドライブラリを用いて、各トランスグルタミナーゼのアイソザイム(TGase 2およびFactor XIII)が好んで認識する基質配列(ペプチド)の同定に成功している^{3, 4)}。さらにこのシステムを用いて、同様に表皮のTGase 1に対する高反応性ペプチド配列を得ることをめざしていた。

今回のコスメトロジー研究振興財団における研究課題として、トランスグルタミナーゼに関わる表皮形成の分子基盤を確立するという課題で採択を頂いた。この課題の遂行を2年間に分けて行い、特に皮膚型トランスグルタミナーゼに対する高反応性基質配列ペプチドの解析と、これを用いた表皮組織での活性検出システムの構築を目的とした。昨年度(平成20年度)まででペプチドの諸性質の解析と蛍光標識ペプチドを用いた検出システムの構築に成功した⁵⁾。昨年以降はさらにこれに加えて、化学標識ペプチドを用いた、*in vitro*での特異的な皮膚表皮架橋酵素のアクセシビリティの開発にも成功したので、ここに報告としてまとめ



Molecular basis of transglutaminase reactions in the skin epidermis formation: development of efficient detection system of transglutaminase 1 activity using preferred substrate peptide

Kiyotaka Hitomi

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

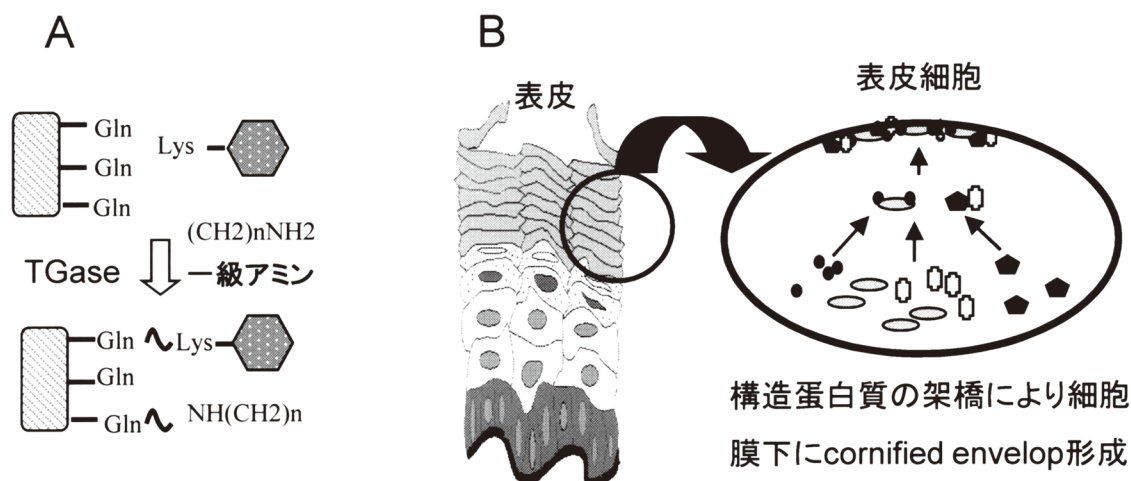


図1 トランスグルタミナーゼの作用様式と表皮における役割

たい。今後、表皮（培養）細胞中の活性検出方法の確立や関連病態との関わりを検討していきたいと考えている。

2. 実験方法

これまで我々は、TGase 1 に対する高い反応性を有する基質配列を、M13ファージディスプレイランダムペプチドライブラリからスクリーニングしている。そのうちおよそ15種類の配列を融合蛋白質として発現精製し、ダンシル修飾カダベリン（蛍光標識アミン）の存在下で、TGase 1 に対する反応性の高いものを4つ選んでおり、それぞれについて解析を進めた。さらに、TGase 1 以外のアイソザイム（TGase 2, TGase 3, Factor XIII）に対する反応性を調べて、特異性の高い配列の1つ、K5（YEQHKLPSSWPF）について、ペプチドレベルでの反応性、特異性、有用性を検討した。

2.1 ペプチドレベルの反応性評価

96穴マイクロタイタープレートを用いる発色方法で行った。この場合、カゼインをグルタミン残基受容基質として、プレートに固相化した。ここに、ビオチン標識したペプチドを含む溶液に酵素（TGase 1）を添加して反応を進行させた。尚、このとき、TGase 2 に対する高反応性ペプチド（T26:HQSYVDPWMLDH）や、変異ペプチド（K5QN:グルタミン残基をアスパラギンに置換したもの）についても並行させた。反応停止し洗浄後、アビジンパーオキシダーゼを含むバッファーを反応させた。洗浄後、パーオキシダーゼに対する発色基質溶液を添加して発色量を測定した。

2.2 蛍光標識ペプチドを用いた活性の視覚化

野生型およびTGase 1 遺伝子欠損マウスから皮膚切片を取得し、OCTコンパウンドに包埋して、3-4μm厚で

切片を作製した。スライドガラスに貼付した切片を乾燥させ、BSAにより非特異的な吸着を防止するためのブロッキングを行った後、蛍光標識したペプチドを含むバッファーを添加した。37度で1時間反応させて、生理食塩水により洗浄してから封入・検鏡した。

このとき、対照実験として、K5ペプチドのグルタミン残基をアスパラギン残基に置換した変異ペプチドで同様の実験を並行させた。また、TGase 1 遺伝子欠損マウスの皮膚表皮切片についても行った。

2.3 ビオチン標識ペプチドを用いた新規アッセイ系の開発

我々はこれまでに、フランスCovalAb社との共同研究で、組織型酵素（TGase 2）について、ELISA法（タンパク吸着プレートを用いた酵素発色による免疫反応検出系）を模した、トランスグルタミナーゼの測定系をTGase 2 について開発していた⁶⁾。これはプレートに、ポリアミン（スベルミン）を共有結合させ、一級アミンを固定したものと、ビオチン標識した高反応性基質配列を用いた検出系で、簡便に高感度で活性検出が可能である。そこで、これに応用して、TGase 1 の高反応性基質ペプチド（K5ペプチド）を用いた特異的なアッセイ系構築を実施した⁷⁾。同様にポリアミンコートしたプレートに、TGase 1 およびK5ペプチドを混合して反応させ、アビジンパーオキシダーゼを反応させ、発色基質を添加した。

3. 結果

3.1 選別した高反応性基質配列に相当するペプチドの反応性の評価

ビオチン標識ペプチド（K5）を、カゼインをグルタミン受容基質として、反応を行った。TGase 1 に対する反応を

調べた結果、K5のみが高い反応性を示し、変異ペプチド (K5QN) やT26は、まったく反応を示さなかった (図2)。なお、図では省略したが、TGase 2, TGase 3, Factor XIII に対しては、反応性が低いことを確認している。ただし、TGase 2 については、比較的高いペプチド濃度や酵素濃度のときには、cross-reactivity が生じることが観察された。これらの結果により、K5がTGase 1 に対して、ペプチドとしてのレベルでも高く、かつ特異的に基質となることが示された。

3. 2 蛍光標識高反応性ペプチドを用いた皮膚表皮における反応の視覚化

蛍光 (FITC) 標識したK5ペプチドを、皮膚表皮凍結切片に添加して、内在性のTGase 1 活性の検出を試みた (図3、図4)。その結果、カルシウム存在下では、K5ペプチドについて特異的なシグナルが観察された。キレート存在の場合、グルタミン残基を変異させた場合には観察されなかった。さらに、図では省略したがTGase 1 遺伝子欠損マウスの皮膚切片の場合では、全くシグナルは観察されな

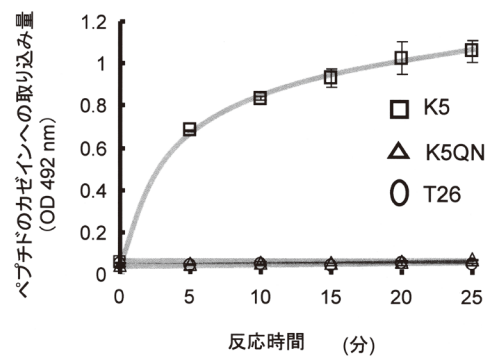


図2 選別した高い反応性配列のペプチドレベルでの評価

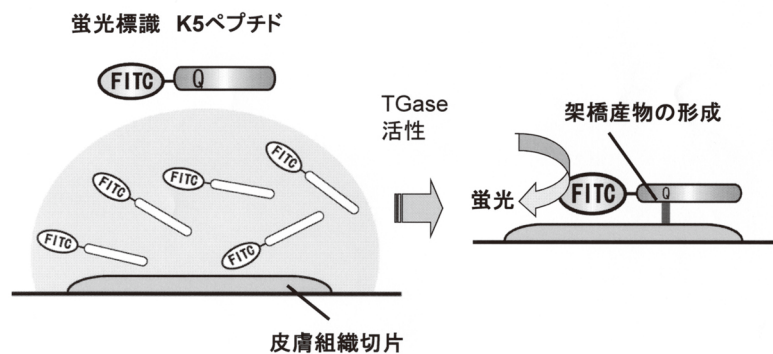


図3 蛍光標識ペプチドを用いた皮膚表皮内の活性の視覚化 (方法)

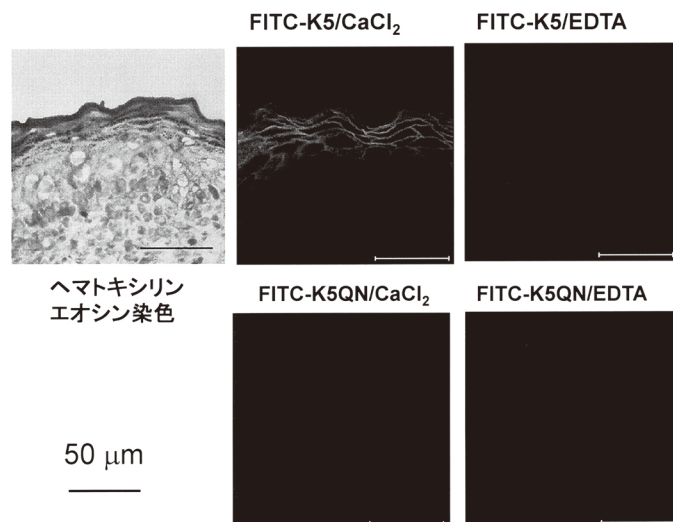


図4 蛍光標識ペプチドを用いた皮膚表皮内の活性の視覚化 (結果)

かった⁵⁾。

ヘマトキシリン&エオシン染色での結果から、角化層には活性は検出されず、顆粒層からやや下あたりまでの細胞層に見られた。また、TGase 1 は細胞膜直下に局在するが、表皮細胞の細胞膜周辺にシグナルが見られ、これまでの知見とも合致する結果となっている。

3. 3 ビオチン標識ペプチドを用いた、迅速で高感度な活性検出系の確立

図 5 A に示すように、一級アミン固定化プレートに、トランスグルタミナーゼおよび、ビオチン標識した高反応性基質配列ペプチドを混合することによって、反応を進行させた。図 5 B に示すように、TGase 1 に特異的なペプチドである K5 を用いた場合、TGase 1 の酵素の存在下で時間依存的にビオチン標識 K5 の取り込みが観察された。同じようにグルタミン残基を含む、T26 や F11 (Factor XIII 高反応性ペプチド) では反応されなかった。図では省略するが、酵素量およびペプチド濃度依存的にも取り込み量が増大した。

4. 考 察

緒言でも記したように、皮膚形成、特に角化層の表皮細胞でバリア機能を果たす cornified envelop が形成されるためには、複数のトランスグルタミナーゼの活性が必須である。なかでも、本課題で対象とした TGase 1 は、(1) ノックアウトマウスで異常な皮膚形成が明らかなこと(2) 遺伝子変異によって、重篤な皮膚疾患が生じること、から最も重要なアイソザイムであると言える。

我々が近年同定してきた、トランスグルタミナーゼのアイソザイムに特異的な高反応性基質配列が、ペプチドとしても良い基質であれば、様々な用途への展開が可能であるとの認識に基づいて、今回の研究課題に臨んだ結果、いくつかの有用な成果をあげられた。

結果の 3.1 に示したように、ペプチドとしても、他のアイソザイムと交差することなく、特異性を有した形で

TGase 1 の基質となることが示された。K5 の配列中にはリジン残基が (グルタミン受容) あり、基質としてどの TGase アイソザイムでも反応する可能性もあったが、特異的に TGase 1 の良い基質であることが、変異体 (QN 変異) の解析で明らかになった。

このペプチドを用いた応用的な解析として、蛍光標識したペプチドを作製し、これを用いて皮膚表皮での活性を可視化できた (結果 3. 2)。これは、特異的にアイソザイムの反応物を検出する方法としては、これまで抗体で行われてきた方法よりもさらに正確に酵素の働きを知ることのできる画期的な手法と言える。抗体の場合は、「存在」のみであるが、TGase 1 や TGase 3 は限定的分解を受けると活性上昇が起こるので、抗体反応のみでは活性を判断できない場合に有効である。基礎的知見に加え、この手法では、TGase 1 の活性低下による疾病研究にも貢献できる。データは省略するが、この成果より発展したヒト皮膚に関する共同研究を、北海道大学医学部・清水宏教授および秋山真志准教授と行った。その中で、ヒト皮膚表皮、とりわけ魚鱗鮮患者の皮膚組織での、TGase 1 の発現解析に関しても、有用な検出系として役立つことが判明した⁸⁾。

また結果 3. 3 に示すように、ペプチドをビオチン標識すれば、アッセイが可能なことを示した。予備的な実験結果として、マウスの皮膚抽出物から、従来のアッセイ系よりもより感度良く、短時間で活性を検出することができた。今後、蛍光ペプチドを用いた可視化の検出系と並行して、皮膚表皮トランスグルタミナーゼの異常なレベル低下の高感度検出に用いられる可能性もある。

5. 総 括

このようにタンパク質架橋酵素反応を、組織および細胞レベルで高感度に検出するシステムを開発することに成功したので、皮膚表皮における本酵素の分子基盤を確立することができたといえる。今後は、皮膚表皮培養系での活性検出と、TGase 1 以外のアイソザイムとの役割分担、および架橋重合される基質群の架橋化パターンの解明を行う

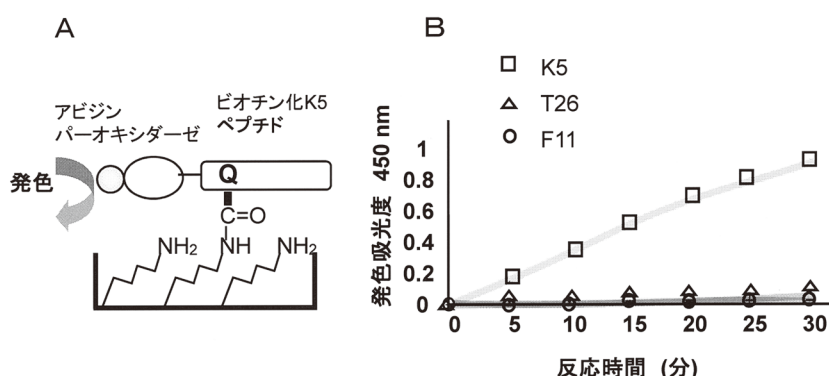


図 5 ビオチン標識ペプチドを用いた新規な酵素活性測定方法

ことにより、「どのように皮膚のバリア機能と固さが形成されるのか」を明らかにしていきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いたコスメロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科分子細胞制御学研究室で行われたもので、大学院生として実験に従事されました杉村禎昭博士、細野真代氏、北村三矢子氏の多大な努力による成果であります。

また、マウスの皮膚切片標本を供与頂いた、兵庫医科大学の山西清文教授に感謝申し上げます。紹介したヒト皮膚に関する実験は北海道大学医学研究科皮膚科学教室、清水宏教授、秋山真志准教授の成果です。また、活性測定系の開発においては、フランスCovalAb 社との共同研究によるものです。

(参考文献)

- 1) Hitomi K.: Transglutaminase in skin epidermis. *Eur. J. Dermatol.* 15, 313-319, 2005
- 2) Hitomi K. et al. Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J. Dermatol. Sci.*, 32, 95-103, 2003.
- 3) Sugimura Y. et al. Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library. *J. Biol. Chem.* 281, 17699-17706, 2006.
- 4) Hitomi K. et al.: Preferred substrate sequences for transglutaminase 2: screening using a phage-displayed peptide library. *Amino Acids.* 36, 619-624, 2009.
- 5) Sugimura Y. et al. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1: development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *FEBS J.* 275, 5667-5677, 2008.
- 6) Alea, M. P. et al.: Development of an isozyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking assay. *Anal. Biochem.* 389, 150-156, 2009.
- 7) Hitomi, K. et al. A specific colorimetric assay for measuring of transglutaminase 1 and factor XIII activities. *Anal. Biochem.* 394, 281-283, 2009.
- 8) Akiyama et al.: Transglutaminase1 preferred substrate peptide K5 is an efficient tool in diagnosis of lamellar ichthyosis. *Am. J. Pathol.* 176, 1592-1599, 2010.
- 9) 人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用 *生化学* 81, 708-711, 2009.