

論文の内容の要旨

1 目的

原発性皮膚アミロイドーシス (primary localized cutaneous amyloidosis: PLCA) の詳細な病態は不明であるが、そこに沈着するアミロイドは、アポトーシスに陥った表皮角化細胞のケラチン蛋白に由来すると考えられている。しかし、一般的にアミロイド線維は β -シート構造であるのに対し、ケラチンは α -ヘリックス構造を有する。われわれは PLCA におけるアミロイドの主要な構成タンパクとして、ケラチンに加えて Gal-7 とアクチンを同定した (参考論文として提出)。今回、真のアミロイド原性を有する蛋白の同定を目的として、チオフラビン T (Thioflavin T: ThT) 蛍光法ならびに電子顕微鏡を用いた観察により、ガレクチン-7、アクチンならびにこれらの合成ペプチドの試験管内におけるアミロイド原性を検討した。

2 対象及び方法

- (1) PLCA 検体より水抽出法を用いて可溶性アミロイド線維を抽出し、その ThT 蛍光スペクトルを測定した。
- (2) 全長のアクチン、ケラチン、Gal-7 を用いて、試験管内におけるアミロイド線維の形成につき検討した。
- (3) Gal-7 の構造式を基に、 β -strand を含む合成ペプチド (Gal S1-F2、Gal S3-S4、Gal S4-S5、Gal S3-S5、Gal S5-S6a、Gal F3-F5、Gal S2-F1) を合成し、アミロイド原性につき検討した。
- (4) Gal S3-S5 アナログと Gal S2-F1 アナログを作成し、そのアミロイド原性について検討した。
- (5) アミロイド原性の高い S³¹-Q⁶⁷ および F³³-K⁶⁵ に注目して、核を形成後、同種の蛋白溶液や全長の Gal-7 溶液を用いてアミロイド線維の伸長反応を試みた。
- (6) アミロイド原性の高い Gal-7 ペプチド (S³¹-Q⁶⁷、F³³-K⁶⁵、R¹²⁰-F¹³⁶、L¹²¹-R¹³⁴) に対して、他の Gal-7 ペプチド、アクチンおよびケラチン消化断片が与える影響について検討した。
- (7) Gal-7、アクチン、ケラチンをトリプシン、カテプシン D、カスパーゼ-3 で処理し、その消化産物を pH 2.0 でインキュベーションすることによりアミロイド線維の形成を試みた。

3 成績

- (1) PLCA のアミロイド物質は ThT と結合してアミロイド線維に特徴的な蛍光スペクトルを発した。
- (2) 全長のアクチンやケラチンでは ThT 蛍光強度の上昇は認めなかったが、全長の Gal-7 は酸性 pH 下で ThT 蛍光出力の上昇を認めた。しかし、電顕では典型的なアミロイド線維は確認できなかった。
- (3) Gal S3-S5 と Gal S2-F1 は pH 2.0 でインキュベーションすると、それぞれ 3 時間、48

時間後に ThT 蛍光強度の上昇を認め、電顕でも直線状のアミロイド線維が確認できた。

- (4) Gal1 S3-S5 アナログでは S³¹-Q⁶⁷ と F³³-K⁶⁵、Gal1 S2-F1 アナログでは R¹²⁰-F¹³⁶ と L¹²¹-R¹³⁴ が比較的高いアミロイド原性を有していた。
- (5) 同種のペプチド溶液と核の組み合わせでは線維の伸長を認めたが、全長のガレクチン-7 を加えても線維の伸長は確認できなかった。
- (6) S³¹-Q⁶⁷ と F³³-K⁶⁵ は、他の Gal1-7 ペプチドや全長の Gal1-7 を加えても変化はなかったが、 β -strand ドメインを有するアクチンペプチド存在下、不溶性ケラチンのトリプシン消化産物存在下では凝集が抑制された。また、低濃度の R¹²⁰-F¹³⁶ と L¹²¹-R¹³⁴ は、Gal1 F3-F5 存在下で ThT 蛍光出力が増強した。
- (7) Gal1-7 をトリプシンで 3 時間処理したサンプルを pH 2.0 で 72 時間インキュベートすると、ThT 蛍光出力が上昇し電顕上でアミロイド線維も形成されたが、Gal1-7 をカテプシン D やカスパーゼ-3 で処理した場合や、アクチンやサイトケラチンを処理した場合は、アミロイド線維の形成は認められなかった。

4 考 察

PLCA の病態につき、以下のような発症機序を考えた。

(1) ケラチノサイトのアポトーシスの誘導、(2) Gal1-7 発現の亢進とアポトーシス関連プロテアーゼの活性化、(3) プロテアーゼによる Gal1-7 アミロイド原性ペプチドの生成、(4) 酸性環境下におけるアミロイド原性ペプチドの凝集、(5) Gal1-7 ペプチド、アクチン、サイトケラチンによる凝集の調節、(6) Gal1-7 フラグメントのさらなる沈着とアミロイド線維の伸長。

5 結 論

Gal1-7 は、表皮角化細胞においてアポトーシスに関連して強く発現され、豊富な β シート構造を包含する 14kDa の蛋白である。多数の Gal1-7 フラグメントが高いアミロイド原性を有しており、また、全長の Gal1-7 をトリプシン処理後に酸性環境下とすることで線維を形成させることが可能であった。Gal1-7 は PLCA におけるアミロイドの形成に重要な役割を果たしていると考えた。