

# 表皮細胞におけるエピプラキンの機能

大分大学医学部皮膚科

藤原 作平

Epiplakin (EPPK), a cytoskeletal linker protein, was originally identified as an autoantigen in serum from a patient with subepidermal blistering disease. To clarify the function of EPPK, we performed slot-blot assays using fusion proteins that included various wild-type and mutated EPPK domains. At least two of the 4.6 repeats in the B domains of epiplakin were necessary for the binding of fusion proteins to keratin. The repeated structures of linker domains were also important for the binding of EPPK to keratin in these assays. Similar but weaker binding to vimentin and desmin was also detected. To confirm these interactions between EPPK and intermediate filaments (IFs), we performed cell-overlay assays with fusion proteins. In HeLa cells, the distribution of fusion proteins in the cytoplasm and their partial colocalization with keratin filaments suggested that the B domains are mainly important for interactions with IFs, while linker domains might include multifunctional regions that are involved in binding to IFs and to molecule(s) other than IFs.

## 1. 緒言

エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された分子量 552kDa (ヒト) ないし 725kDa (マウス) の分子であるが、表皮細胞内に局在する。構造上の特徴として、他のプラキン分子、例えばデスモプラキン、BPAG1、プレクチンのカルボキシ末端に見られる B ドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたりヒトでは 13 個、マウスでは 16 個見出し、特にカルボキシ末端にはほぼ完全に保存された 5 (ヒト) - 8 (マウス) 回の繰り返し構造が存在している (Fig. 1a)<sup>1)</sup>。プラキン分子は細胞骨格結合蛋白に分類され、その中のデスモプラキンやプレクチンなどは中間径フィラメントと相互作用することは、すでに明らかになっていたが、新たな分子であるエピプラキンと中間径フィラメントとの相互作用は不明であった。今回この相互作用を検討するために、いくつかの融合蛋白質を使った Slot-blot Assays と Cell-Overlay Assays による実験を行った。一般にプラキン分子の B ドメイン構造には、38 アミノ酸モチーフ (plakin repeat domain=PRD) からなる 4.6 回の繰り返し構造が存在するが、これはエピプラキンにも存在し、これが機能の単位になっている可能性がある (Fig. 1b)。さらにエピプラキンでは、B ドメイン構造を連結するリンカードメインにも 3 回の繰り返し構造が存在するが、これはエピプラキンに特異的で、他のプラキン分子には見られない構造である (Fig. 1c)。今回我々は、

これらの繰り返し構造に着目し、中間径フィラメントとの相互作用を検討した。

## 2. 実験

### 2-1 Slot-blot Assays

まず B ドメイン、Linker ドメインと B+Linker ドメインのそれぞれに対するプライマーを用いて、ヒト白血球由来の遺伝子断片を鋳型として、PCR 法により各ドメインを支配する cDNA を得た (Fig. 1a)。配列を確認した上で、PGEX 発現ベクターに組み込み、GST 融合蛋白質を得た。B ドメイン内のリピート数とケラチンとの相互作用を調べるために、B ドメイン中の 4.6 回のリピートのうちの 1 リピート (1R)、2 リピート (2R)、3 リピート (3R) を含むコンストラクトを作成し、GST 融合蛋白質として発現させた (Fig. 1b)。次に Linker ドメイン内の 1 リピート (L1R)、2 リピート (L2R)、3 リピート (L3R) を含むコンストラクトを作成し、GST 融合蛋白質として発現させた (Fig. 1c)。これらの GST 融合蛋白質を用いて、Slot-blot Assays を行った。メタノール処理後の PVDF 膜上に中間径フィラメントをしみこませた後、ブロッキングをおこない、それぞれの GST 融合蛋白質を加え、一晚インキュベートした。翌日抗 GST 抗体を加え、2 時間インキュベートした後、二次抗体を加え、さらに 1 時間インキュベート後、化学発光法で抗原を検出した。中間径フィラメントの高次構造が各ドメインとの相互作用にどのような影響を及ぼすかを調べるために、PVDF 膜上に中間径フィラメントをプロットした後 6 M のグアニジン塩酸で変性し、GST 融合蛋白質との反応性を上記と同様の方法で検討した。

### 2-2 Cell-Overlay Assays

さらに、これらの GST 融合蛋白質と細胞全体との反応性を検討するために、培養 HeLa 細胞、HaCaT 細胞をメ



The function of epiplakin in keratinocytes  
Sakuhei Fujiwara, M.D.Ph.D

Department of Anatomy, Biology and  
Medicine (Dermatology) Faculty of  
Medicine, Oita University

タノール固定後、GST 融合蛋白質を加えインキュベート後に洗浄し、抗 GST 抗体を加え、さらに二次抗体を加えて Cell-Overlay Assays を行った。

### 3. 結果

#### 3-1 Slot-blot Assays

B ドメイン、Linker ドメイン、B+Linker ドメインの GST 融合蛋白質が、正しく作成されているか否かを確認するため、作成した融合蛋白質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ない、クーマシーブルー蛋白染色、抗 B ドメイン抗体、抗 Linker ドメイン抗体、抗 GST 抗体との反応性を検討した (Fig. 2a-d)。その結果、融合蛋白質はそれぞれの抗体と反応することが示され、また B ドメイン、Linker ドメインはアミノ酸配列上も正しい融合蛋白質であることが明らかになった。Slot-blot Assays の結果、B ドメイン、Linker ドメインと B+Linker ドメインの GST 融合蛋白質の中、B+Linker ドメインとケラチンとの相互

作用が一番強く、次いで GST-B、GST-Linker の順であった (Fig. 3)。中間径フィラメントについては、ケラチン、ビメンチン、デスミン順で弱くなった (Fig. 3)。ケラチンを 6 M のゲアニジン塩酸で変性させた後には、B ドメインとの相互作用がほぼ消失した (Fig. 4)。B ドメイン内のリピート数を変化させた融合蛋白質を用いて Slot-blot Assays を行なった結果、少なくとも、2 ないし 3 リピートで GST-B ドメインとケラチンとの相互作用にほぼ匹敵したため、GST-B ドメインとケラチンとの相互作用には少なくとも 2 ないし 3 つのリピートが必要であることが明らかになった (Fig. 5)。HeLa 細胞と HaCaT 細胞から抽出されたケラチンを使って、同様の Slot-blot Assays を行なった結果、同様の結果が得られた (Fig. 5)。次に Linker ドメイン内のリピート数を変化させた融合蛋白質を用いて Slot-blot Assays を行なった結果、リピートの数が増すとともに相互作用が強くなった (Fig. 6<sup>2)</sup>)。

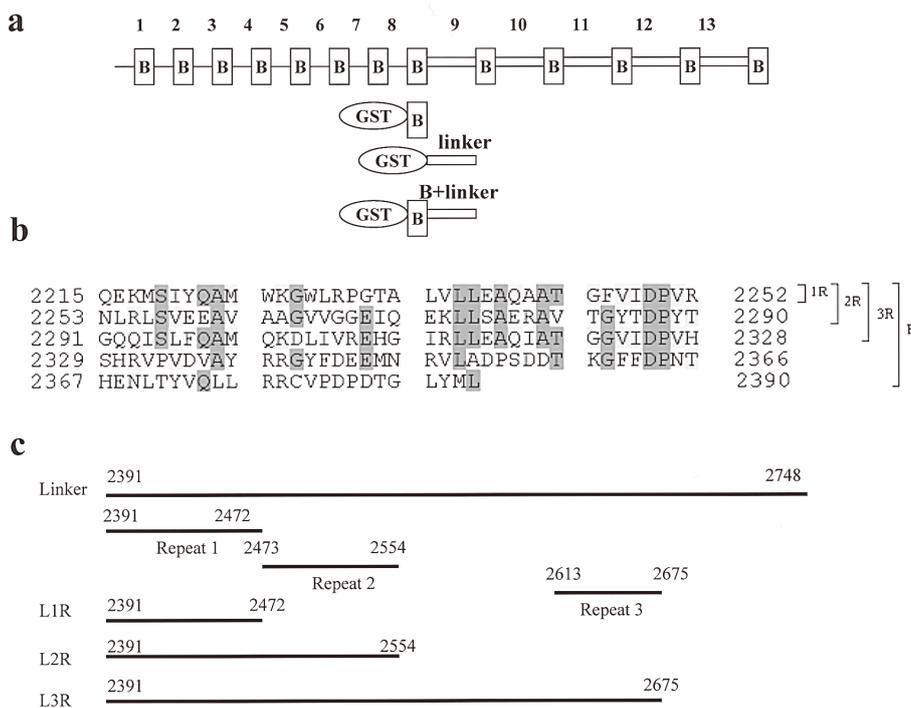


Figure1 Schematic representation of epiplakin (a) and the repeat structures of the B domain (b) and the linker domain (c). (a) Numbered boxes indicate B domains that are 46-70% homologous to the B domain in desmoplakin. The double-lined linker regions and the five corresponding B domains (9-13) are almost identical (1). We performed PCR to generate GST-B domain (8B), GST-linker domain (L8-9), and GST-B+linker domain (B8+L8-9). (b) The structure of each B domain includes 4.6 copies of a motif of 38 amino acids, which is referred to as the plakin repeat domain (PRD). The sequence shown is that of B8. When at least three amino acid residues are identical in the 4.6 copies, they are shown in green, while identical amino acid residues in the first and third or second and fourth copies are shown in yellow. 1R denotes a GST-fusion protein that contains one copy unit, and 2R and 3R denote fusion proteins with two and three copies units, respectively. (c) The structure of the linker domain between B8 and B9, with 2.7 repeats of a sequence of 82 amino acids (1). These repeats are lined up along the entire linker domain. L1R denotes the GST-fusion protein that included the first one repeat of the linker domain (repeat 1). L2R and L3R denote GST-fusion proteins that included two linker repeats (repeat1+repeat2) and three linker repeats (repeat1-3), respectively. L3R also included a non-repeated structure (residue 2555-2612).

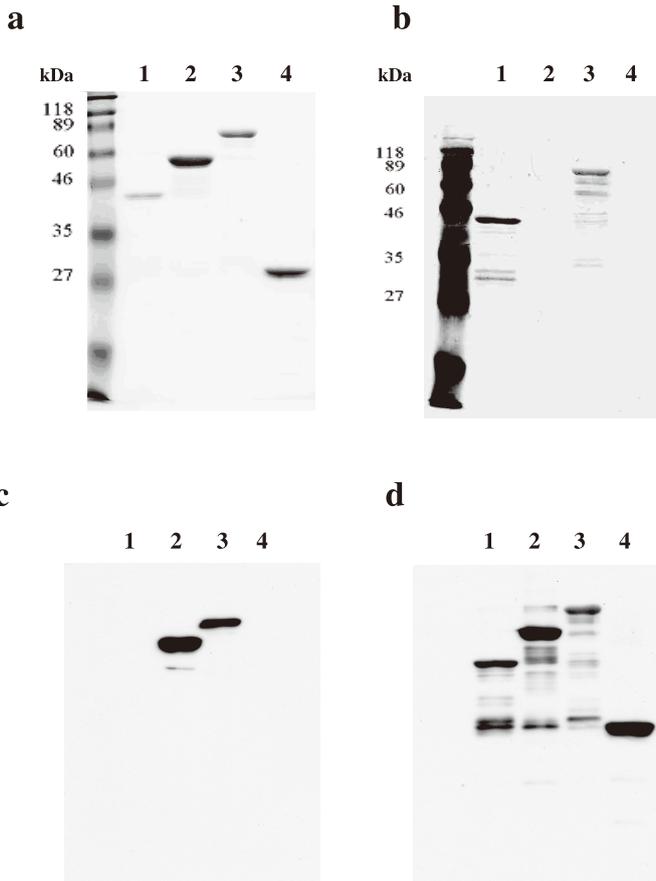


Figure 2 The purity of GST-fusion proteins was examined by SDS-PAGE.

GST-B domain (lane 1), GST-linker domain (lane 2), GST-B+linker domain (lane 3), and GST (lane 4) were separated on an SDS-polyacrylamide gel (12.5% polyacrylamide) and then stained with Coomassie Brilliant Blue (a). Proteins were immunostained with polyclonal antibodies specific for the B domain (b) or with monoclonal antibodies specific for the linker domain (c) or with polyclonal antibodies specific for GST (d). Molecular markers were included on the left side of a and b.

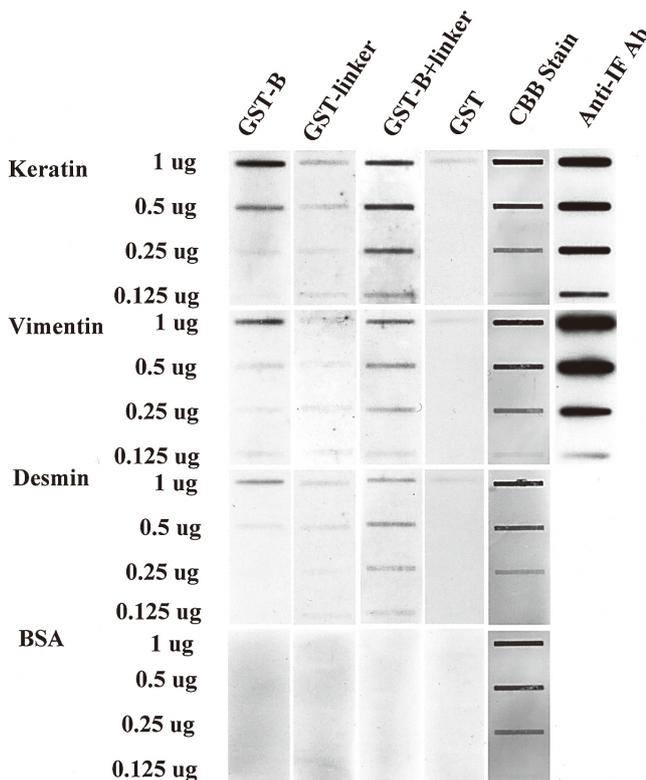


Figure 3 Keratin interacted most strongly with GST-B+linker domain, less strongly with GST-B and least strongly with GST-linker domain.

In slot-blot assays, the indicated protein or BSA (as a control) was immobilized on membranes and then the membranes were incubated with the indicated fusion protein (GST-B, 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; GST-linker, 1.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; GST-B+linker, 1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; these concentrations are equal on a molar basis.) or with GST (as a control) and probed with GST-specific rabbit polyclonal antibodies and HRP-conjugated goat antibodies against rabbit IgG. The immunoreactive proteins on membranes were visualized by chemiluminescence and exposure to x-ray film. The protein loading was monitored with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB) or reaction using anti-keratin (right upper panel) or anti-vimentin (right lower panel) antibodies and HRP-conjugated goat antibodies against mouse IgG. The immunoreactive proteins on membranes were visualized described above.

Keratin interacted most strongly with GST-B+linker domain and it reacted less strongly with GST-B and GST-linker domain, in that order. Although vimentin and desmin also bound to GST-B+linker, GST-B, and GST-linker domain, in a descending order of avidity, the binding was weaker than that to keratin.

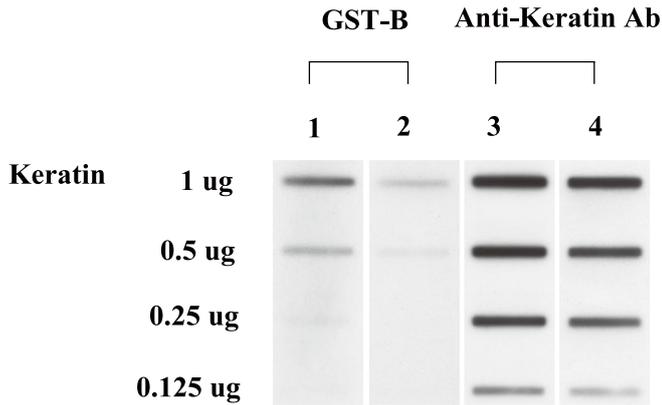


Figure 4 Denatured keratin decreased binding with GST-B domain.

In slot-blot assays, keratin was immobilized on a PVDF-membranes and the membranes were denatured with (lane 2 and 4) or without (lane 1 and 3) 6M guanidinium chloride and two pieces of membranes (lane 1 and 2) were incubated with GST-B, 1.0  $\mu$ g/ml and probed with GST-specific rabbit polyclonal antibodies. The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by reaction using anti-keratin antibodies, HRP-conjugated goat antibodies against mouse IgG and a chemiluminescent reagent (lane 3 and 4). After denaturing keratin, the binding ability of the GST-B fusion protein decreased.

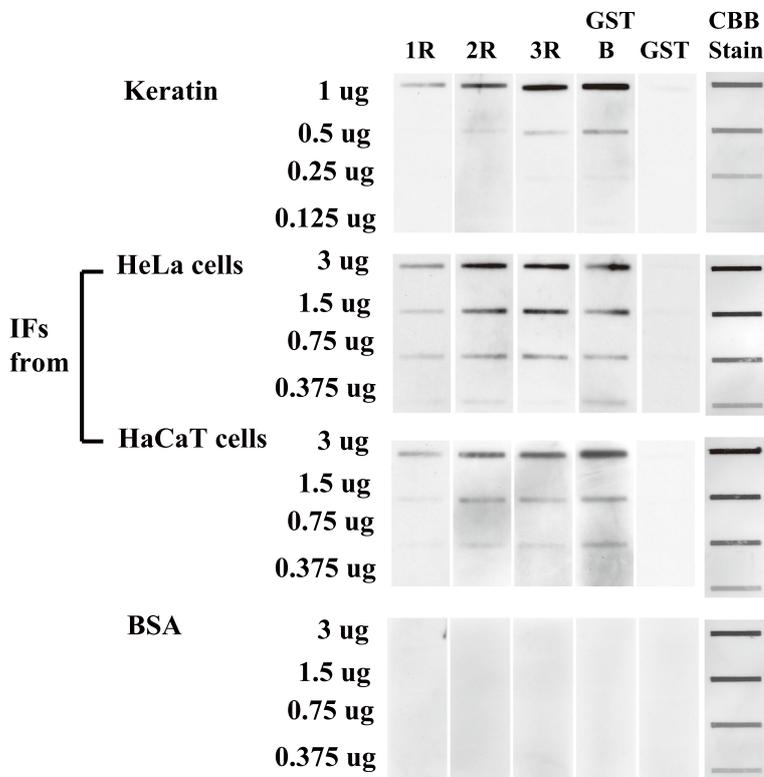


Figure 5 Repeated structures of B domain are important for binding to keratin.

For slot-blot assays, keratin, IF fractions extracted from HeLa cells and HaCaT cells, and BSA (as a control), were immobilized on a PVDF membrane. Each membrane was incubated with 1.0  $\mu$ g/ml of GST-fusion proteins that included one, two and three copies of PRD (1R-3R as shown in Fig.1), GST-B domain and GST (as a control). The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB)

2R and almost 3R in the B domain were necessary for binding to keratin, or to IFs extracted from HeLa or HaCaT cells.

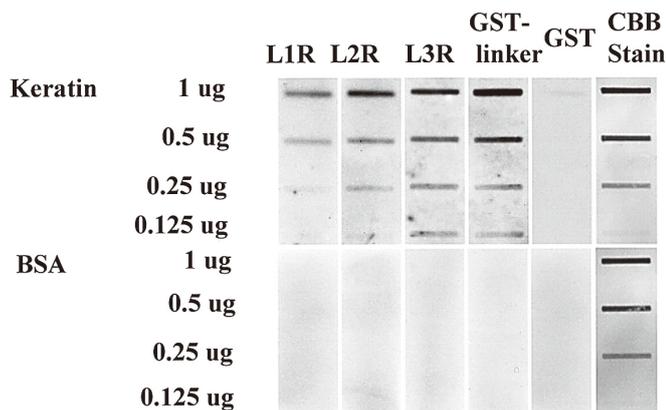


Figure 6 Repeated structures of the linker domain are also important for the binding to keratin.

Immobilized keratin or BSA (as a control) on a PVDF membrane was incubated with 3.0  $\mu$ g/ml of fusion proteins (L1R, L2R, L3R and GST-linker) and GST (as a control), as shown schematically in Fig. 1. The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB). L3R that included three linker repeats bound to keratin almost as strongly as the entire linker domain, while L2R and L1R to keratin bound less strongly in that order.

### 3-2 Cell-Overlay Assays

HeLa細胞を用いたCell-Overlay Assaysの結果、GST-Bドメインは、核周囲に顆粒状に分布し、一部にケラチンとの局在が認められた (Fig. 7, B-C)。GST-Linkerドメインは、細胞内に点状に分布し、ケラチンとの局在は見られず (Fig. 7, E-F)、GST-B + Linkerドメインは、GST-BとGST-Linkerドメインの中間的分布すなわち一部顆粒状、一部点状の分布がみられた (Fig. 7, H-I)。このことから、GST-Linkerドメインは、ケラチン以外の他の分子とも相互作用することが示唆された。HaCaT細胞における結果もHeLa細胞と同様の結果が得られた。

## 4. 考察

Slot-blot AssaysおよびCell-Overlay Assaysの結果、エピブラキンのBドメインは、ビメンチンよりもケラチンと強く結合することが明らかになった。加えてLinkerドメインもケラチンと結合することが明らかになった。後者は、B+Linkerドメインとケラチンとの相互作用がBドメインとケラチンとの相互作用よりも強かったことを、よく説明しうる。しかしこれらの結果は、Bドメインがケラチン5/14よりビメンチンと強く結合し、Linkerドメインが、ケラチン5/14やビメンチンと反応しないとしたJangらの結果と異なっている3)。この違いは、我々がヒト表皮のケラチン（おそらくケラチン5/14以外にケラチン1/10も含む）を使用したことや、Linkerドメイン融合蛋白質の結合能の不安定性によると考えられる。新規に調整したLinkerドメイン融合蛋白質は、ケラチンと再現性良く結合した。Linkerドメインが、繰り返し配列をとることは、エピブラキンの特徴であり、繰り返し構造が増すごとに、ケラチンへの結合能が増したことは大変興味深い。デスマブラキン、BPAG1、プレクチン、エンボブラキンやペリブラキンなどの他のブラキン分子のLサブドメインと呼ばれるLinkerドメイン（ペリブラキン以外はCドメインのアミノ末端側、ペリブラキンにはCドメインがなく、棒状ドメインのカルボキシ末端側）が、ケラチンやビメンチンと結合することが知られているが4)、その部分と共通の配列は、エピブラキンのLinkerドメインには見られなかった。またFontaoらが、デスマブラキンのLinkerドメインが、単層上皮のケラチン8/18やビメンチンと反応するが、ケラチン5/14と結合しないことを報告している5)。エピブラキンでは、今後ケラチン8/18やケラチン6/16または6/17と結合するか否か、そしてそれがBドメイン、Linkerドメインのいずれと結合するかを検討する必要がある。最近のデスマブラキンのBドメインの結晶解析から、4.6回の繰り返し構造のうち1-2回と3-4回の繰り返し構造の間に溝が形成され、それがおそらく、中間

径線維の棒状ドメインと結合するモデルが提唱されているが6)、ケラチンとの相互作用をする上で、Bドメイン内の少なくとも3リピートが、GST-Bにほぼ匹敵した我々のデータは、このモデルを支持している。しかし、彼らはデスマブラキンのLinkerドメインは、ビメンチンとの結合に大きく寄与しないとしており、今後おそらく球状であるエピブラキンのLinkerドメインの結晶解析を進める必要がある。B+Linkerドメインはケラチンと最も強く相互作用し、ビメンチン、デスミンの順に弱くなる現象は、デスマブラキンと中間径フィラメントとの相互作用に類似している。プレクチンのBと一部のLinkerドメインは、ケラチン(5/14)よりむしろビメンチンとの相互作用が強い。エピブラキン、デスマブラキン、プレクチンのBドメイン間のホモロジーは互いに70%でほぼ等しいが、エピブラキンとデスマブラキン、あるいはエピブラキンとプレクチンのLinkerドメイン間のホモロジーは、デスマブラキンとプレクチンのLinkerドメイン間のホモロジーよりも低い。したがってエピブラキンのB+Linkerドメインが中間径フィラメントと相互作用するにあたっては、高次構造が重要と考えられる。B+LinkerドメインあるいはBドメインがケラチンと相互作用する形式については、エピブラキンが、数本のケラチンを束ねると我々は想定しており、今後この仮説を検証していきたい。

一方エピブラキンのノックアウトマウスを使った実験では、野生型マウスに比し創傷治癒が速くなる傾向が認められた7)。現時点では、エピブラキンノックアウトマウスでは、ケラチン6の発現が低下し、それに伴ってデスマゾームの構造が変化し、表皮細胞の移動が速くなるのではないかと考えているが、今後エピブラキンノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較してデスマゾームやケラチンの配行などにどのような違いを生じているのか、電子顕微鏡レベルで詳しく検討する余地がある。また創傷治癒過程で発現するケラチン6、17、18とエピブラキンとの相互作用についても検討する必要があると考えられる。

## 5. 総括

エピブラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された表皮内蛋白質であるが、そのBドメイン、Linkerドメイン共に中間径フィラメントと相互作用し、GST融合蛋白質の中では、B+Linkerドメイン、次いでGST-B、GST-Linkerの順で相互作用が弱くなった。中間径フィラメントに関しては、ケラチン、ビメンチン、デスミンの順に弱くなった。Bドメイン、Linkerドメイン共に、その繰り返しのリピート数が増すに連れて中間径フィラメントとの相互作用が強くなった。

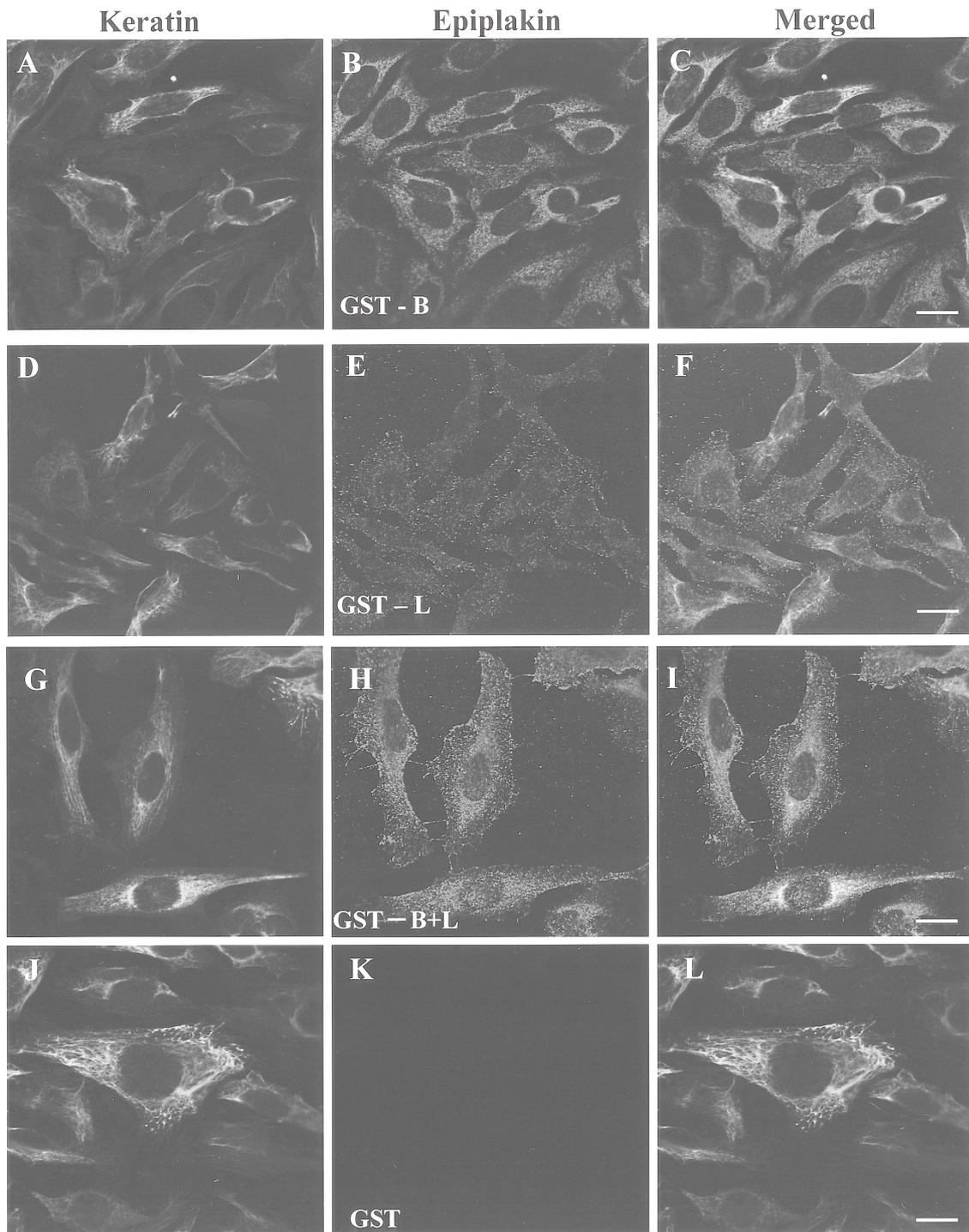


Figure 7 GST-B bound to the cytoplasm partially along keratin filaments, although GST-linker and GST-B+linker distributed mainly in dots in the cytoplasm in HeLa cells.

HeLa cells were fixed with 100% methanol and then were incubated with fusion proteins in 1% BSA/PBS. After washing with PBS, cells were incubated with a mixture of anti-pan-keratin monoclonal antibody C11 and anti-GST rabbit polyclonal antibodies, and then washed with PBS. Cells were subsequently incubated with FITC- and Rhodamine-conjugated secondary antibodies directed against mouse or rabbit IgG.

GST-B(red) localized around the nucleus in the cytoplasm partially along keratin filaments (green) in HeLa cells(B). Both GST-linker and GST-B+linker distributed mainly in dots in the cytoplasm(E,H) and did not colocalized with keratin filaments, which indicated that linker domains interacts with other component(s) other than IFs. Bars=20 $\mu$ m

## (References)

- 1) Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, et al: Epiplakin, a novel member of the plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen: Structure and tissue localization, *J Biol Chem*, 276: 13340-13347, 2001.
- 2) Wang W, Sumiyoshi H, Yoshioka H, et al: Interactions between epiplakin and intermediate filaments. *J Dermatol*, 33, 518-527, 2006.
- 3) Jang SI, Kalinin A, Takahashi K, et al: Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks, *J Cell Sci*, 118: 781-793, 2005.
- 4) Karashima T, Watt FW: Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments, *J Cell Sci*, 115: 5027-5037, 2002.
- 5) Fontao L, Favre B, Riou S, et al: Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus, *Mol Biol Cell*, 14: 1978-1992, 2003.
- 6) Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT et al: Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure, *Nat Struct Biol*, 9: 612-620, 2002.
- 7) Goto M, Sumiyoshi H, Sakai T, et al: Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. *Mol Cell Biol*, 26 (2) , 548-558, 2006.