

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15053

研究課題名(和文)新規リパーゼ様膜蛋白質による皮膚バリア機能形成機序の解明と制御薬物の探索

研究課題名(英文) Investigation of a novel lipase-like transmembrane protein for the discovery of drugs to regulate the epidermal barrier function

研究代表者

金井 好克 (Kanai, Yoshikatsu)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60204533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規リパーゼ様タンパク質LIPXは、表皮バリア機能に必須である。本研究では、LIPX遺伝子欠損マウスを用いて、LIPXが表皮バリア機能の実体である角質細胞間脂質ラメラの形成に寄与する機構の解明に取り組んだ。LIPX欠損によって角質細胞間脂質ラメラに構造的異常が生じることを見出し、表皮バリアに重要なセラミドが半減・短鎖化していることをリポミクス解析により明らかにした。また、LIPXは表皮特異的に発現する膜貫通タンパク質であることを示した。本研究の成果は、LIPXの表皮バリア形成における役割の解明に寄与し、表皮バリア機能を制御する薬物の探索へと繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：The intercellular spaces in stratum corneum are filled with the lamellae of lipids, the structural entity of the epidermal barrier. We previously found that a novel lipase-like protein LIPX is essential for the epidermal barrier function. In this study, by using a LIPX gene knockout mouse strain, we investigated the mechanisms by which LIPX contributes to the formation of the lipid lamellae in the stratum corneum. We revealed that, in the absence of LIPX, the intercellular lipid lamellae formed in the stratum corneum were structurally abnormal. This defect was accompanied with a drastic decrease of ceramides that are essential for the epidermal barrier. We also demonstrated that LIPX is a transmembrane protein specifically expressed in the epidermis. The results of this study contribute to understanding the essential roles of LIPX in the epidermal barrier function and to developing novel medicines to cure the diseases with dysfunction of the epidermal barrier function.

研究分野：薬理学

キーワード：表皮バリア 角質細胞間脂質ラメラ リパーゼ リポミクス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能発現クローニング法によりトランスポーターの分子探索を行ってきたが、その過程で、卵母細胞にアミノ酸の取り込みを亢進させる cDNA として LIPX をクローニングした。LIPX はリパーゼ類似の構造をもつ 1 回膜貫通型タンパク質であると推測され、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させると、アミノ酸のみならず多くの低分子化合物の取り込みを亢進させた。そのキネティクスは非飽和的であり、リパーゼ活性によって膜障害を起こして非特異的に細胞膜の透過性を上昇させたものと考えられたため、トランスポーターの研究対象からは除外した。しかし、その生体内での機能を理解するために LIPX 遺伝子ノックアウトマウスを作製したところ、ホモノックアウトマウスは表皮バリア障害により生後 1 日前後で死亡するという驚くべき表現型を示した。

表皮バリア機能は、角質層が担っており、脂質成分からなる角質細胞間脂質ラメラがその重要構成要素となる。これにより、外部からの異物の侵入が阻止され、皮膚からの水の蒸散による水分喪失が防止される。この脂質ラメラは、セラミドを主成分として多様な脂質から構成され、規則正しい液晶構造をとっている。表皮バリアについては、多様な観点から多くの研究がなされてきたが、表皮バリアの本体に関わる角質細胞間脂質ラメラの形成の機序は明らかになっていない。表皮バリアの障害を示す代表的疾患としては、アトピー性皮膚炎が知られる。同疾患においては、角質バリア機能障害により外からの刺激が容易に皮膚の中にまで侵入して炎症をおこし、また、水分喪失により皮膚の乾燥を伴う。表皮バリア機能を担う因子としては保湿因子に関わるタンパク質フィラグリンが知られ、その異常がアトピー性皮膚炎や尋常性魚鱗癬でも報告されている。この他、数例の脂質代謝関連因子の表皮バリアへの寄与が報告されているが、角質細胞間脂質ラメラの形成維持に関する因子は依然としてその核心が掴めていない状況にある。

予備的に実施したリピドミクス検討により LIPX のホモノックアウトマウスでは表皮バリアに重要とされるセラミドの総量が半減していることが明らかとなった。しかし、リパーゼ様因子である LIPX はセラミド自体を基質あるいは反応生成物とすることは考えにくく、セラミドを含む表皮バリア機能に必須な脂質を角質細胞間脂質ラメラに規則正しく保持するうえで、LIPX が基質とする脂質の分解あるいは反応生成物の合成が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、LIPX の表皮バリア形成における役割を解明し、その基質と反応生成物を同定することを試みた。LIPX の基質あるいは

反応生成物は、皮膚疾患治療への直接の応用が期待されることから、表皮バリア機能を制御する薬物の探索に繋げることを目指して研究を実施した。また、膜型リパーゼによる組織構築という新たな生物学的概念を提示するとともに、皮膚疾患との関連性解析により LIPX を新たな疾患遺伝子として確立する可能性に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LIPX 特異的抗体による *in vivo* 発現・局在解析

LIPX の生体内における発現および局在を明らかにするため、LIPX 特異的抗体を作成した。FLAG タグを融合した LIPX を安定発現する Flp-In 293 細胞株 (HEK293 細胞由来の細胞株) から組換え LIPX タンパク質を精製し、腸骨リンパ節法によりラットモノクローナル抗体を作成した。抗体力価が最も高い数クローンのハイブリドーマ培養上清から抗体を精製し、ウエスタンブロット法や免疫組織染色法による検討を実施した。また、表皮組織の破碎液から調製した細胞膜画分を用いて、塩、アルカリ、尿素による洗浄、界面活性剤による可溶化などをおこない、LIPX と細胞膜の相互作用の様式を解析した。

(2) リピドミクス解析による LIPX の基質および反応生成物の同定

LIPX の基質と反応生成物となる脂質分子種を明らかにするため、LIPX ノックアウトマウスの表皮からトリプシン処理によって角質シートを調製し、メタノールとクロロホルムを用いた Bligh and Dyer 法によって脂質を抽出した。得られた角質抽出脂質に対して、上記の LIPX 精製組換えタンパク質を混合して反応させ、反応前後のサンプルのリピドミクス解析によって、LIPX の基質と反応生成物の同定を試みた。

(3) 透過型電子顕微鏡観察による表皮組織および角質細胞間脂質ラメラの構造的異常の解析

LIPX ノックアウトマウスの表皮組織あるいは角質細胞間脂質ラメラにおける微細構造の異常を解析するため、野生型および LIPX ノックアウトマウスの皮膚組織を採取し、透過型電子顕微鏡による観察をおこなった。表皮組織の観察は定法に従い、角質細胞間脂質のラメラ構造については、四酸化ルテニウム染色をおこなった。

4. 研究成果

腸骨リンパ節法により作成したラットモノクローナル LIPX 抗体は、マウス組織における内在性 LIPX をウエスタンブロット法で検出できる良好な反応性を示した。新生仔マウスから各臓器を採取し、発現をウエスタンブロット法で解析した結果 LIPX の発現は表皮組織に特異的であることが確認された。ま

た、表皮組織由来の細胞膜画分を用いて、LIPX と細胞膜の相互作用の様式を解析した。細胞膜表面に結合したタンパク質を遊離させる塩、アルカリ、尿素による洗浄処理は、LIPX を細胞膜画分から遊離させなかった。LIPX の可溶化には、界面活性剤による細胞膜の可溶化が必要であることから、LIPX が表皮組織内で膜貫通型タンパク質として発現していることが示された。

同抗体を用いて、新生仔マウスの皮膚組織を用いた免疫組織染色により、LIPX の局在を明らかにすることを試みたが、野生型マウスと LIPX ノックアウトマウスの間で染色像に違いが見られなかった。様々な組織固定法、抗原不活化法などを検討したが、染色結果を改善することは出来ず、*in vivo* における LIPX の詳細な局在を解明するには至らなかった。免疫組織染色に使用できる LIPX 抗体の作製には、これまでも様々な方法で取り組んできたが成功しておらず、タンパク質の立体構造上、LIPX に対しては免疫染色に適した抗体が出来にくいものと考えられる。LIPX の局在解析については、ゲノム編集技術を用いてエピトープタグを付加した LIPX ノックインマウスを作製する方法が有効な手段になると考えられた。

電子顕微鏡観察では、LIPX ノックアウトマウスの表皮組織全体の構築に顕著な構造的異常は見られなかった。一方で、角質細胞間脂質ラメラ構造に関しては、LIPX ホモノックアウトにおいてラメラの周期構造が不鮮明であることを見出した。また、分断化された異常なラメラが不規則に集積した構造など、多くの形態異常を捉える事が出来た。このことから LIPX の欠損による表皮バリア機能の破綻は、角質層細胞間脂質ラメラに比較的限局した異常が要因であることが示された。このような角質細胞間脂質ラメラの構造的異常は、研究代表者らが以前実施した X 線小角散乱法による解析でも示唆されており、今回の解析結果はそれを組織学的な観点から裏付けるものとなった。

当初は、リポドミクス解析により LIPX の基質および反応生成物を絞り込むことを予定していたが、哺乳類培養細胞を用いて構築した発現系から十分な量の組換え LIPX タンパク質を調製することができず、研究期間内に LIPX の基質および反応生成物を同定することは出来なかった。今後も組換え LIPX タンパク質の精製・発現系に改良を加えて、同解析を継続して実施する予定である。一方で、野生型と LIPX ホモノックアウト仔マウスの角質層の脂質組成変動については、リポドミクス解析によって、これまでよりもさらに詳細な変動を把握することができた。特に重要な知見として、皮膚に特異的で表皮バリア機能に必須であるとされている、エステル化 脂肪酸を含む皮膚特異的セラミドクラスの総量の半減と、全体な脂肪酸の短鎖化を見出した。

本研究は、トランスポーター分子同定の過程で偶然見いだした新規リパーゼ様タンパク質 LIPX について、そのノックアウトマウスが表皮バリア障害により出生直後に死亡する事実に基づき、LIPX が表皮バリアの本体である角質細胞間脂質ラメラの形成に寄与するメカニズムの解明に挑んだ。LIPX の基質と反応生成物の同定は今後の課題となるが、本研究により明らかになった、LIPX 欠損が引き起こす角質細胞間脂質ラメラの構造的異常や脂質組成の変動、また本研究で確立した解析技術は、LIPX の基質と反応生成物の同定に重要な寄与を果たすと考えられる。本研究の成果は、表皮バリア機能を制御する薬物の探索や、遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子の特定へと繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 30 件) 全て査読有

Hanaoka H, Ohshima Y, Suzuki Y, Yamaguchi A, Watanabe S, Uehara T, Nagamori S, Kanai Y, Ishioka NS, Tsushima Y, Endo K, Arano Y. Development of a widely usable amino acid tracer: ⁷⁶Br-
-methyl-phenylalanine for tumor PET imaging. *J Nucl Med.* 56 (2015) 791-797.
DOI: 10.2967/jnumed.114.152215.

Furukawa J, Inoue K, Maeda J, Yasujima T, Ohta K, Kanai Y, Takada T, Matsuo H, Yuasa H. Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep.* 5 (2015) 15057.
DOI: 10.1038/srep15057.

Nagamori S, Wiriyasermkul P, Guarch ME, Okuyama H, Nakagomi S, Tadagaki K, Nishinaka Y, Bodoy S, Takafuji K, Okuda S, Kurokawa J, Ohgaki R, Nunes V, Palacin M, Kanai Y. Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinurial-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113 (2016) 775-780.
DOI: 10.1073/pnas.1519959113.

Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiriyasermkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y. Specific transport of 3-fluoro-l-
-methyl-tyrosine by LAT1 explains its specificity to malignant tumors in

imaging. **Cancer Sci.** 107 (2016) 347-352.

DOI: 10.1111/cas.12878.

Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiryaserkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Kato Y, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L-methyl-tyrosine (FAMT) by organic ion transporters explains renal background in [(18)F]FAMT positron emission tomography. **J Pharmacol Sci.** 130 (2016) 101-109.

DOI: 10.1016/j.jpshs.2016.01.001.

Nagamori S, Wiryaserkul P, Okuda S, Kojima N, Hari Y, Kiyonaka S, Mori Y, Tominaga H, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relations of leucine derivatives reveal critical moieties for cellular uptake and activation of mTORC1-mediated signaling. **Amino Acids.** 48 (2016) 1045-1058.

DOI: 10.1007/s00726-015-2158-z.

Ohgaki R, Wei L, Yamada K, Hara T, Kuriyama C, Okuda S, Ueta K, Shiotani M, Nagamori S, Kanai Y. Interaction of the Sodium/Glucose Cotransporter (SGLT) 2 inhibitor Canagliflozin with SGLT1 and SGLT2: Inhibition kinetics, sidedness of action, and transporter-associated incorporation accounting for its pharmacodynamic and pharmacokinetic features. **J Pharmacol Exp Ther.** 358 (2016) 94-102.

DOI: 10.1124/jpet.116.232025.

Watabe T, Ikeda H, Nagamori S, Wiryaserkul P, Tanaka Y, Naka S, Kanai Y, Hagiwara K, Aoki M, Shimosegawa E, Kanai Y, Hatazawa J. ¹⁸F-FBPA as a tumor-specific probe of L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a comparison study with ¹⁸F-FDG and ¹¹C-Methionine PET. **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** 44 (2017) 321-331.

DOI: 10.1007/s00259-016-3487-1.

Tarlungeanu DC, Deliu E, Dotter CP, Kara M, Janiesch PC, Scalise M, Galluccio M, Tesulov M, Morelli E, Sonmez FM, Bilguvar K, Ohgaki R, Kanai Y, Johansen A, Esharif S, Ben-Omran T, Topcu M, Schlessinger A, Indiveri C, Duncan KE, Caglayan AO, Gunel M, Gleeson JG, Novarino G. Impaired amino acid transport at the blood brain barrier is a cause of autism spectrum

disorder. **Cell.** 167 (2016) 1481-1494.

DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.013.

Kongpracha P, Nagamori S, Wiryaserkul P, Tanaka Y, Kaneda K, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). **J Pharmacol Sci.** 133 (2017) 96-102.

DOI: 10.1016/j.jpshs.2017.01.006.

Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, Nakagomi S, Kanai-Azuma M, Kaneda-Nakashima K, Okuda S, Nagamori S, Kanai Y. Essential roles of L-type amino acid transporter 1 in syncytiotrophoblast development by presenting fusogenic 4F2hc. **Mol Cell Biol.** 37 (2017) 印刷中.

DOI: 10.1128/MCB.00427-16.

Ohshima K, Nojima S, Tahara S, Kurashige M, Hori Y, Hagiwara K, Okuzaki D, Oki S, Wada N, Ikeda JI, Kanai Y, Morii E. Argininosuccinate synthase 1-deficiency enhances the cell sensitivity to arginine through decreased DEPTOR expression in endometrial cancer. **Sci Rep.** 7 (2017) 45504.

DOI: 10.1038/srep45504.

[学会発表](計58件)

Kanai Y. Amino acid transporters as targets for cancer-selective drug delivery and anti-cancer therapeutics. BioMedical Transporters Conference 2015. 2015年8月9-13日. Lugano, Switzerland.

Kanai Y. Transporters in pharmacology and molecular target drug discovery. APSA-ASCEPT Joint Scientific Meeting 2015. 2015年11月29日-12月2日. Hobart, Australia.

Nagamori S. Metabolomics and proteomics of knockout mice reveal physiological function of an orphan organic anion transporter. The 3rd Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications" 2015年6月14-17日. Awaji, Japan

Nagamori S. Significance of comprehensive and quantitative

proteomics of membrane transport proteins in drug discovery. 第 89 回日本薬理学会年会. 2016 年 3 月 9-11 日. 横浜.

Nagamori S. A renal tubular transporter mediating reabsorption of α -hydroxybutyrate: a potential target of drugs increasing urinary ketone body excretion. 第 89 回日本薬理学会年会. 2016 年 3 月 9-11 日. 横浜.

Nagamori S. Non-competitive inhibitors arrest the alternating-access mechanism of amino acid transporters. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1-4 日. 神戸.

Nagamori S, Wiriyasermkul P, Okuyama K, Nakagomi S, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a "missing partner" of cystinuria-related membrane protein rBAT/SLC3A1. Experimental Biology 2016. 2016 年 4 月 22-26 日. San Diego, CA, USA.

Ohgaki R, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Hagiwara K, Kanai Y. Properties of mTORC1 regulation by amino acid signaling in HEK293T cells. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1-4 日. 神戸.

Nagamori S, Wiriyasermkul P, Okuyama K, Nakagomi S, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a "missing partner" of cystinuria-related membrane protein rBAT/SLC3A1. The Kaback Symposium. 2016 年 6 月 9-10 日. Bethesda, Maryland, USA.

Ohgaki R, Wei L, Yamada K, Hara T, Kuriyama C, Okuda S, Ueta K, Leclercq L, Mamidi RN, Shiotani M, Nagamori S, Kanai Y. Inhibition kinetics, sidedness of action, and transporter-mediated uptake of the sodium/glucose cotransporter (SGLT) 2 inhibitor canagliflozin: implications for its pharmacodynamic and pharmacokinetic features. 76th American Diabetes Association Scientific Sessions. 2016 年 6 月 10-14 日. New Orleans, Louisiana, USA.

Kanai Y. Transporter and urolithiasis. 13th International Symposium on Urolithiasis. 2016 年 7 月 19-22 日. Chiba, Japan.

Kanai Y. Amino acid transporters as targets for cancer-selective drug delivery and anticancer therapeutics. 2nd Drug Transporters Forum. 2016 年 7 月 23 日. Lanzhou, China.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 好克 (KANAI, Yoshikatsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60204533

(2) 研究分担者

永森 收志 (NAGAMORI, Shushi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90467572

大垣 隆一 (OHGAKI, Ryuichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20467525

奥田 傑 (OKUDA, Suguru)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50511846

中込 咲綾 (NAKAGOMI, Saya)
大阪大学・微生物研究所・特任研究員
研究者番号: 60423894

(4) 研究協力者

石川 准子 (ISHIKAWA, Junko)