

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790804

研究課題名（和文） 脂腺細胞の新規分泌膜小胞セボゾームの生成・分泌機構の解明

研究課題名（英文） Structure of Sebosomes, secret membrane vesicles of sebocytes

研究代表者

永井 彩子 (NAGAI AYAKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教（特定教員）

研究者番号：90420562

研究成果の概要（和文）：ラット培養脂腺細胞は、細胞内でセボゾームを生成し、その後細胞外へと遊離した。各マーカーの局在化から、セボゾームには、リサイクリングエンドソーム膜、早期・後期エンドソーム膜、リソソーム膜、脂質顆粒、脂質ラフトなどの複数の独立した膜成分を含む複合膜系であることが示唆された。また、セボゾームに局在する種々の分子の細胞内の輸送は複数経路で行われた。新生成タンパク質に加えて、セボゾームへ輸送される細胞外由来の分子も、エンドソームを経由することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rat cultured sebocytes synthesized and secreted Sebosomes. It was suggested that Sebosomes contain various subcellular organelles. Recycling endosomes were involved in distribution and localization of the organelles to form the complex membrane system of Sebosomes. Early and late endosomes, lysosomes, lipid granules and lipid rafts were included in the system, in addition to *de novo* synthesized proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学・皮膚生理学

キーワード：セボゾーム、脂腺細胞、ヒストン、抗菌、分泌膜小胞、

## 1. 研究開始当初の背景

皮脂腺は皮膚表面全体に分布し、スクアレンを含む多量の皮脂（2g/日，成人）を分泌して、乾燥や感染、酸化などから皮膚を保護している。皮脂腺の代謝改善などの有用性を検討するためにもその分子機構の解明は必須である。しかし、脂腺細胞の培養が困難で、クローン細胞もほとんど作成されていない

ために詳細な皮脂合成、分泌機構は不明なところが多い。申請者らは、初代培養脂腺細胞の長期培養に成功した。ハムスターの皮膚から分離した株細胞を用い、ステロイドホルモンの分化促進機構、分化マーカー蛋白質；ペリリピンの発現動態、レチノイン酸やビタミンDの脂腺細胞の増殖・分化への関与を報告した。更に、申請者らはラットの初代培養脂

腺細胞や、ハムスターの株化脂腺細胞が遊離する、脂質顆粒を含む特異な分泌膜小胞「セボゾーム」を発見した(申請者ら命名、直径1-10 μm: 2005年)。申請者らは、セボゾームが脂質の主成分であるスクアレンと、抗菌活性を持つヒストン H3 を濃縮していることを明らかにした。従来、脂質は細胞が崩壊した結果、分泌されると説明されていたが、申請者らが発見したセボゾームは細胞死を伴わない新しい脂質成分の分泌経路と考えられた。その分泌調節の分子機構を明らかにし、活性化すれば、皮膚・全身の代謝改善、健康増進により効率的に役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、セボゾームの生成・分泌機能を解析し、また同機能を活性化する天然分子や添加物を探索・特定して、皮膚・全身の健康増強・促進を目的とする。

(1)セボゾームへの蛋白質局在機構とセボゾーム生成機構の解明

- ①蛍光オルガネラトレーサー、蛍光脂質トレーサー、蛍光蛋白質融合蛋白質によるセボゾームへの蛋白質局在化の経時的な観察
- ②LC-MS/MS を用いたセボゾーム構成蛋白質の解析
- ③蛍光免疫染色を用いた培養脂腺細胞での蛋白質局在の検討

(2)培養脂腺細胞でのセボゾーム生成・分泌機構とカルシウムとの関係を明らかにするための細胞内カルシウム濃度変化測定条件の確立

(3)セボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索

## 3. 研究の方法

(1)セボゾームへの蛋白質局在機構とセボゾーム生成機構の解明

- ①ラット初代脂腺細胞は EGF 添加培地で培養維持した。脂質ラフトの局在は、蛍光色素マーカー-BODIPY FL C5-ganglioside GM1 (Invitrogen)、chorela toxin B -Alexa555 conjugate (Invitrogen)を、リソゾームの局在は LysoTracker (Invitrogen)を、ピノサイトーシスは Lucifer Yellow(Sigma)を、エンドサイトーシスは RITC-Dextran(Sigma)を、リサイクリングエンドソームは Alexa555-transferrin conjugate (Invitrogen)をそれぞれ培地に添加し、その蛍光を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。初期エンドソームは Organelle Lights Endosomes-GFP (Invitrogen)、

Rab5b-RFP の各組み換え DNA を作製・細胞内に導入し、脂腺細胞に発現させた融合蛍光タンパク質の各局在を細胞内の蛍光で検出した。

②ラット初代脂腺細胞は EGF 添加培地で培養維持した。培地に遊離されたセボゾームは、培地を遠心分離して集めた。セボゾームのペプチド分析は、セボゾームを界面活性剤を含む硫酸バッファー(pH1-2)で溶解し、可溶化画分を透析処理した。次にトリプシンで消化し、4000QTRAP(アブライドバイオシステムズ)で LC-MS/MS 解析を行った。データはラット cDNA データベースを用い、ProID で解析した。

③ラット初代脂腺細胞は EGF 添加培地で培養維持した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、常法に従い、免疫染色を行った。蛍光ラベル二次抗体を用いシグナルを蛍光顕微鏡で観察した。

(2)培養脂腺細胞でのセボゾーム生成・分泌機構とカルシウムとの関係

蛍光細胞内カルシウムイオンセンサーを導入し、検討した。

(3)セボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索

現在考えられる既知の細胞内蛋白質・オルガネラの局在化に関与する種々の阻害剤等のセボゾーム生成・分泌動態への影響を検討した。

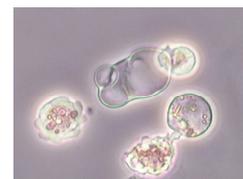
## 4. 研究成果

(1)セボゾームへの蛋白質局在機構とセボゾーム生成機構の解明

ラット培養脂腺細胞は、細胞内でセボゾームを生成し、遊離した。

右図

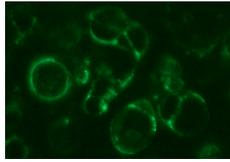
ラット初代培養脂腺細胞から分泌されたセボゾーム(申請者ら命名、直径1-10 μm)



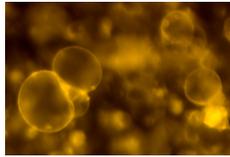
chorela toxin B -Alexa555 conjugate および BODIPY FL C5-ganglioside GM1、LysoTracker の蛍光は、共にセボゾームに局在した。また、Rab5a-GFP 及び、Rab5b-RFP 融合蛍光タンパク質は、共に細胞内および遊離セボゾームに局在した。RITC-Dextran は脂腺細胞に取り込まれ、やがてセボゾームの膜に局在したが、LysoTracker とは異なる局在を認めた。Lucifer Yellowは脂腺細胞に取り込まれ、その後セボゾームの内腔に局在した。Alexa555-transferrin conjugateの蛍光は細胞内部に観察され、続いて培養液中へ徐々に排出されていったが、セボゾームへの

局在も認められた。

右図  
(上段)セボゾームに  
局在する GFP 融合-リ  
ソソームマーカー蛋  
白質



(下段)セボゾームに  
局在するラフトマー  
カー  
chorela toxin B  
-Alexa555 conjugate



また、セボゾームの LC-MS/MS 解析から GPI アンカー蛋白質、リソソームの膜蛋白質やリソソーム酵素等が検出された。これらの蛋白質の一次抗体を用いた免疫染色でもセボゾームに蛍光シグナルが検出された。

以上より、セボゾームは、各マーカーの局在化から、リサイクリングエンドソーム膜、早期・後期エンドソーム膜、リソゾーム膜、GPI アンカー蛋白質などを含む脂質ラフトなどの複数の独立した膜成分が認められる複合膜系である可能性が示唆された。リソゾーム膜、脂質ラフトといった複数の膜成分が含まれており、複合体膜である可能性が示唆された。また、セボゾームへの分子の輸送は、複数経路で輸送されることが示唆された。これは、細胞内での新生タンパク質に加えて、細胞外由来分子が、エンドソームを経由してセボゾームに局在することを示唆した。

#### (2) 培養脂腺細胞の細胞内カルシウム濃度変化測定条件の確立

既知の分泌機構の性質と予備実験の結果から、セボゾーム分泌機構にも細胞内カルシウムイオン濃度変化が関与していると考えられた。細胞内カルシウムセンサーとして、低毒性の低分子カルシウムインジケータを培養脂腺細胞に添加し、測定条件の検討をすすめた。安定したインジケータ導入条件が得られたため、次年度以降測定を進める予定である。

#### (3) セボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索

申請者らはセボゾームの分泌を促進する因子を数種類発見し、効果を確認した。次年度は、発見した分泌促進因子のセボゾーム生成分泌への作用メカニズムを明らかにし、更に同様の効果を持つ因子を探索していく。

申請者らが発見したセボゾームは細胞死を伴わない新しい皮脂成分の分泌経路と考えられる。本研究によりその分泌調節の分子機

構が徐々に明らかになり、活性化する因子も複数同定できたことの成果は大きい。

皮脂は、スクアレン、ステロールの他に抗酸化活性を持つビタミンEを含むことが報告されているが、皮膚でのビタミンE濃度が皮膚表面に近いほど濃度が高いことから、ビタミンEが分泌された皮脂から供給されていると示唆され、ビタミンEの担体でもあるスクアレン結合蛋白質が、皮脂腺組織で発現していることも示されている。申請者らが発見したセボゾームも皮膚表面への皮脂とビタミン供給の経路の一つとして考えられる。そのため、セボゾームの分泌促進ができれば、皮膚表面を酸化傷害から守り、抗加齢作用も発揮すると考えられる。

また、申請者らは、セボゾームにはスクワレン、ワックスエステルなどの皮膚の保湿および抗炎症に作用する皮脂成分が濃縮されていることを発見した。セボゾーム分泌を活性化することで、皮脂の有効な成分を効率よく皮膚表面に供給できることが予想される。

以上のように、セボゾームの分泌活性化は新しい皮膚・全身の代謝改善、健康増進の経路として効率的に役立つと考えられ、本研究中でセボゾームの分泌促進因子を明らかにしたことにより実用化へも大きく進展したと考えられる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 永井彩子、澄田道博、Structure of Sebosomes, secret membrane vesicles of sebocytes, BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、平成22年12月7日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、
- ② 永井彩子、澄田道博、Structure and function of Sebosomes, secret membrane vesicles of sebocytes, 第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、
- ③ 永井彩子、土屋文彦、澄田道博、脂腺細胞の分泌膜小胞、Sebosomesの構造と機能、BMB 2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、平成20年12月12日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、

[図書] (計 2 件)

①澄田道博、永井彩子 シーエムシー出版  
細胞死制御工学～美肌・皮膚防護バイオ素  
材の開発～ (三羽信比古編著)、第 1 編 第  
1 章皮脂改善機能-脂腺細胞の培養系と脂  
質代謝、および、皮脂改善薬の開発指針 3-11  
2009,

②鈴木清香、三村晴子、澄田道博、永井彩  
子、三羽信比古 シーエムシー出版 細胞  
死制御工学～美肌・皮膚防護バイオ素材の  
開発～ (三羽信比古編著)、第 1 編 第 2 章  
セルライト抑制機能 - セルライトに対す  
る脂質代謝改善薬の抑制効果、および、そ  
の薬効評価技術 12-22 2009,

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 彩子 (NAGAI AYAKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

(特定教員)

研究者番号 : 90420562