

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06540

研究課題名(和文)皮膚の恒常性を担う酵素SASPaseによる基質プロフィラグリン認識機構の解明

研究課題名(英文)Structural study of pro-filaggrin recognition by SASPase

研究代表者

帯田 孝之(Obita, Takayuki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：30578696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の発症要因としてフィラグリン分子の機能異常が知られている。アスパラギン酸型酵素SASPaseはプロフィラグリンを限定分解することから、その酵素活性機構について興味を持たれている。本研究では、SASPaseのX線結晶構造を決定し、続いてHPLCを用いて酵素活性を調べることに成功した。そして、SASPaseの酵素活性機構についての興味深い知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の患者数は、国内で数十万人といわれており、その生活の質の向上のために発症メカニズムの解明や治療法の開発が求められている。これまでフィラグリン分子の機能異常が発症要因として知られていたが、本研究では、SASPaseがフィラグリン分子の分解において重要な役割を果たしているという結果を得ることに成功した。このことは、社会的な意味でアトピー性皮膚炎の治療法の開発に繋がる可能性があると考えている。また、酵素SASPaseが基質を認識する機構を原子レベルで明らかにしたことから、学術的にも大変興味深い結果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：The functional abnormality of filaggrin molecules is known as one of the causes of atopic dermatitis. Retroviral-like aspartic protease SASPase is known for its specific degradation of profilaggrin molecules, making its enzyme activity mechanism of interest. In this study, we successfully determined the X-ray crystal structures of SASPase and subsequently examined the enzyme activity using HPLC. As a result, we obtained interesting insights into the enzyme activity mechanism of SASPase.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 SASPase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚は、外界からの病原体やアレルゲンの侵入を防ぎ、生物と環境の間でバリア機能を担っている。表皮は、基底層、有棘層、顆粒層および角層で構成され、角化細胞(ケラチノサイト)は、基底層から角層に向かって分化する。フィラグリンは、顆粒層細胞においてプロフィラグリンとして発現し、皮膚の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。プロフィラグリンは、通常10~12個の単量体フィラグリンがリンカーで繋がった構造をしており、このリンカー部分が切断されて単量体フィラグリンが産生される。最終的に単量体フィラグリンは、カスパーゼ-14などの様々なプロテアーゼによってアミノ酸にまで分解を受け、天然保湿因子(Natural moisturizing factor:NMF)として、皮膚の保湿に関わっている。プロフィラグリンは様々なプロテアーゼによって分解を受けるが、その一つとして、表皮に特異的に発現しているプロテアーゼ分子・SASPase (Skin ASpartic Protease/ASPRV1)が同定された。

SASPaseは、顆粒層と角層の両方で特異的に発現するプロテアーゼとして同定され、プロフィラグリンのリンカー領域を切断する活性をもつことが報告された。これまでの研究から、SASPase欠損マウスでは、プロフィラグリンの切断不全がおこり、異常型プロフィラグリンの蓄積が観察されている。SASPaseは、膜貫通ドメイン、N末端ドメイン、酵素活性ドメインをもち、二量体構造をとると考えられている。酵素活性ドメインのN末端側とC末端側に自己分解部位を二つもち、これらの自己分解部位を自身の酵素活性ドメインで分解することで活性型SASPaseになると報告されている。しかし、この二か所の自己分解部位を用いてどのように活性化を制御しているのか、フィラグリンリンカーと自己分解部位の異なる配列をもつ基質をどのように認識しているかなど、SASPaseの酵素活性の制御や基質認識についての詳細な機構はまだほとんど解明されていない。

非常に興味深いことには、アトピー性皮膚炎の患者において、SASPaseのプロテアーゼ活性ドメインや自己分解部位近傍において変異が確認されており、その発症メカニズムが注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、SASPaseの基質認識機構を原子レベルの精度で解明することを目的としている。まず、X線結晶構造解析を用いて、SASPaseと基質ペプチド複合体の立体構造を決定し、SASPaseによる基質認識を原子レベルで理解する。さらに、逆相カラムHPLCの系を用いて、SASPaseの酵素活性について定量的な評価を行う。SASPaseが認識する基質配列として、これまでに少なくとも3つが知られているが、それらに共通認識配列は見当たらない。そこで、3つの基質ペプチドと単点変異体の活性を測定して、SASPaseが切断する基質ペプチド配列の「認識配列の精密化」を行う。これらにより、アトピー性皮膚炎の患者にみられるSASPase変異体が、どのような機構で皮膚のバリア機能を失っているかについての知見を得ることができる。

### 3. 研究の方法

#### ・SASPaseと基質ペプチド複合体のX線結晶構造解析

まず、SASPaseの結晶化を行い、基質が関与していない状態での立体構造を決定する。次に、活性ドメインと3つの基質ペプチド(プロフィラグリン由来ペプチド、二つの自己分解部位由来ペプチド)それぞれとの複合体の結晶化を行う。得られた結晶は、MAD法や分子置換法などにより構造決定を行う。

#### ・SASPaseの酵素活性測定

SASPaseによる3つの基質ペプチドに対する酵素活性を測定する。SASPaseの活性ドメインを用いて、基質ペプチドの限定分解を行い、HPLC逆相カラムを用いて切断された量を定量して、酵素反応速度定数(Km値やkcat値など)を算出する。

#### ・基質(単点変異体)ペプチドの酵素活性測定

SASPaseと基質の複合体の結晶構造を決定し、SASPaseがそれぞれの基質ペプチドをどのように認識しているかを明らかにする。その立体構造をもとに、SASPaseおよび基質にそれぞれ単点変異を導入し、酵素活性を調べ、酵素が基質を切断する酵素活性メカニズムを原子レベルで明らかにする。次に、単点変異体の活性を考慮することによって、基質の特異性や、その最適配列についての知見を得る。

### 4. 研究成果

X線結晶構造解析を用いて分解能1.9オングストロームでSASPaseの酵素活性ドメインとフィラグリンリンカーの複合体構造を決定した。結晶構造中でSASPaseの酵素活性ドメインは二量体を形成しており、二量体界面にある基質結合部位にフィラグリンが一分子結合していた。また、HPLCを用いて酵素活性解析を行い、SASPaseのフィラグリンに対するKm値とKcat値をそれぞれ

れ 93  $\mu\text{M}$ 、0.044 /min と決定した。次に、pH4.0 から pH7.0 の条件で酵素反応を行ったところ、pH5.0 で最も高い酵素活性を示した。SASPase の酵素活性は、角化細胞が顆粒層 (pH6.8~7.5) から角質層 (pH4.5~5.3) への分化に伴って、次第に高くなることが考えられた。さらに、結晶構造中で SASPase との結合が見られたアミノ酸の Ala 変異体を作成し、酵素活性を調べた。その結果、いくつかのアミノ酸で著しい酵素活性の低下が観察され、結晶構造中の結合様式と変異体の測定から、基質認識に重要なアミノ酸を明らかにした。

続いて、二ヶ所存在する自己分解部位に変異を加えて、自己分解が起こらない SASPase 変異体を作成し、基質 (フィラグリンリンカー) に対する酵素活性を測定した。可溶性の SASPase 全長と、酵素活性ドメイン単独の酵素活性を比較したところ、酵素活性ドメイン単独のほうが著しく高い活性を示した。この結果は、N 末端側の自己分解部位の切断、すなわち、酵素活性ドメインが細胞膜から切り離されることにより、SASPase の酵素活性が著しく高くなることを示している。さらに、フィラグリンリンカーの切断点から N 末端側 1~6 個のアミノ酸残基 (P1-P6) と、切断点から C 末端側の 1~5 個のアミノ酸残基 (P1'-P5') の範囲に点変異を導入し、これらに対する SASPase の酵素活性を測定した。測定の結果、P2 と P2' の位置には、SASPase の疎水性ポケットに入り込む Val, Leu, Ile が好ましく、P1 の位置には P3 (Phe) とパイ-パイスタッキング相互作用を形成することができる Tyr, Phe が好ましいことが示された。本研究は、結晶構造と酵素活性の結果から、SASPase の基質認識機構についての新たな知見を得ることができ、皮膚バリア機能に重要なフィラグリン分解機構の解明について重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jin Meihua, Shiwaku Hiroki, Tanaka Hikari, Obita Takayuki, Ohuchi Sakurako, Yoshioka Yuki, Jin Xiaocen, Kondo Kanoh, Fujita Kyota, Homma Hidenori, Nakajima Kazuyuki, Mizuguchi Mineyuki, Okazawa Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26851-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Krasovec Gabriel, Hozumi Akiko, Yoshida Tomoyuki, Obita Takayuki, Hamada Mayuko, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Horie Takeo, Mori Hisashi, Sasakura Yasunori	4. 巻 8
2. 論文標題 Serine controls epidermal vesicle release via NMDA receptor, allowing tissue migration during the metamorphosis of the chordate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abn3264	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 帯田 孝之、三輪 康平、水口 峰之	4. 巻 10
2. 論文標題 古細菌由来基本転写因子 TFE のX線結晶構造解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA利用研究成果集	6. 最初と最後の頁 143~146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18957/rr.10.2.143	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山菜緒、帯田孝之、水口峰之
2. 発表標題 皮膚特異的プロテアーゼSASPaseの自己分解部位を介した活性制御機構解析
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------