

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19719

研究課題名（和文）皮膚バリア機能の維持・向上に対する遊離D-アミノ酸の役割

研究課題名（英文）Effects of free D-amino acids for skin barrier function

研究代表者

坂上 弘明（Sakaue, Hiroaki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：80734855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒトの皮膚常在菌であるアクネ菌がD-アラニン菌体外に分泌していることが明らかとなった。D-アラニンはヒト表皮角化細胞のフィラグリン発現を増強し、皮膚バリア機能を高める可能性が示唆された。また、本研究ではタンパク質の翻訳後修飾の一つであるアスパラギン酸残基の異性化が生じたタンパク質を網羅的に探索するための技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により皮膚に存在するD-アミノ酸が皮膚バリア機能を高め、生体防御機能の一員を担っている可能性が示唆された。また、本研究で開発した異性化タンパク質を網羅的に探索する技術は既存のプロテオミクス解析ソフトを用いて簡便に探索が可能な新しい技術である。本技術により、これまで未知であった異性化タンパク質の組織分布や疾患との関連性を明らかにしていけるものと考えられ、バイオマーカー探索などにおいて有用な技術となる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that *P. acnes*, a commensal bacterium of human skin, secretes D-alanine into the extracellular space. D-alanine enhanced filaggrin expression in human epidermal keratinocytes, suggesting that it might have enhanced skin barrier function. In addition, this study developed a technique to comprehensively search for proteins in which isomerization of aspartic acid residues, one of the post-translational modifications of proteins, occurs.

研究分野：分析化学

キーワード：皮膚バリア機能 D-アミノ酸 フィラグリン

1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体の最も外側に存在する最大の臓器であり、紫外線や化学物質への曝露はもちろんのこと、気温や湿度の変化、細菌感染など多種多様な環境ストレスに晒されている。皮膚はこれらストレスに対する防御壁であり、皮膚表層のバリア構造がその機能を支えている。

皮膚バリア機能の中心的役割を担うのは、角質細胞間脂質と水分保持分子からなる天然保湿因子である。角質細胞間脂質の主成分はセラミドであり、幾重にも重なった脂質層を形成することで、体内からの水分蒸散や外界からの病原体・異物の侵入を防いでいる。一方、水分保持分子の主成分はアミノ酸と尿素であり、これらが水分子を保持することで角質細胞内の潤いを保つとともに、紫外線を吸収して皮膚への直接的ダメージを防いでいる。

天然保湿因子の一つであるアミノ酸は、フィラグリンと呼ばれる巨大なタンパク質から多段階の酵素分解を受けて生成される。皮膚の代表的な疾患であるアトピー性皮膚炎では、フィラグリンのタンパク質発現量が低下し、皮膚バリア機能が破綻していることが報告されている。また、フィラグリンの発現低下はアトピー性皮膚炎のみに留まらず、喘息や花粉症といった種々のアレルギー疾患を連鎖的に引き起こす。これは脆弱な皮膚バリア機能がアレルゲンの侵入を容易に許し、経皮感作を引き起こすためであると考えられている。

アミノ酸にはL型とD型の2つの鏡像異性体が存在しているが、生体に存在するほとんどのアミノ酸はL型である。近年の研究で、腸内細菌が産生したD-アミノ酸が共生菌である乳酸菌の増殖を促すことに加え、D-アミノ酸酸化酵素によって産生される過酸化水素が病原菌を宿主から排除する働きをもっており、D-アミノ酸を介したヒトと細菌の共生システムが存在することが報告されている。

皮膚上皮においても腸同様に細菌叢を形成していることから、皮膚上皮においても細菌由来のD-アミノ酸が存在するものと考えられるが、その機能については未だ解明が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、皮膚バリア機能に対する遊離D-アミノ酸の作用を明らかにすることを目的として、ヒト表皮角化細胞に対してD-アミノ酸を処理し、種々の遺伝子発現を解析した。また、アミノ酸の異性化は遊離アミノ酸のみならず、タンパク質中のアミノ酸にも生じ、タンパク質機能を変化させることから、アミノ酸の異性化に注目した皮膚構成タンパク質の質的変化の解析も重要である。本研究では、遊離D-アミノ酸によるフィラグリンタンパク質の発現の変化に加え、タンパク質中のアミノ酸異性化を網羅的に探索できる技術の開発を行った。

3. 研究の方法

アクネ菌 (*P. acnes*) が産生する遊離D-アミノ酸の分析

アクネ菌由来以外のアミノ酸の影響を避けるため、アミノ酸を全く含まない最小培地(M9培地)中でアクネ菌を1週間程度培養した。培養後、遠心分離にて菌体と培養上清に分離し、培養上清中のD-アミノ酸を分析することで菌体外に放出されるD-アミノ酸の分析を行った。D-アミノ酸分析では、培養上清をTCA沈殿により徐タンパクした後、メタノール抽出によりアミノ酸を抽出した。抽出したアミノ酸を凍結乾燥し、N α -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-alaninamide (L-FDLA)にてラベル化後、LC-MSを用いてD/Lアミノ酸の分析を行った。

表皮角化細胞に対するD-アミノ酸の作用の解析

HaCaT細胞およびNHEK細胞に1.2 mMカルシウム存在下、D-アミノ酸(D-アラニン、D-グルタミン酸)およびフィラグリン発現のポジティブコントロールであるリゾホスファチジン酸(LPA)を各10 μ Mの濃度で添加した。分化状態を把握するための9個のマーカーについてプライマーを合成し、D-アミノ酸及びLPAによって誘導させた正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)の分化状態を経時的(0, 3, 6, 12, 24 h)に解析した。

タンパク質中のアミノ酸異性体を網羅的に探索する技術の開発

皮膚構成タンパク質の質的変化もまた、皮膚バリア機能への影響を及ぼす要因の一つであると考えられる。特にタンパク質中のアスパラギン酸残基(Asp)の異性化は老化や紫外線

等の環境ストレスによって促進され、タンパク質機能に影響することが示唆されている。しかしながら、異性化は分子量の変化を伴わない翻訳後修飾であるため、プロテオミクス的な手法で複雑なタンパク質中から網羅的に異性化タンパク質を同定することができなかった。

本研究では、Asp 異性体の一つである L-isoAsp 残基を有するタンパク質の網羅的解析に資する技術を開発した。

TVLDSGISEVR という配列を有するペプチドのうち、4 番目の Asp を L-Asp、L-isoAsp、D-Asp、D-isoAsp に置き換えたペプチドを化学合成した。この 4 種類のペプチド混合物に対し、酵素 rAspN を加えることによって特異的に L-Asp ペプチドを分解したのち、His タグ吸着樹脂を混合して rAspN を除去した。次いで、ペプチドを凍結乾燥した後、 $H_2^{18}O$ 中で L-isoAsp を L-Asp へと修復する酵素 Protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) と反応させ、L-isoAsp ペプチドを ^{18}O を取り込んだ L-Asp に変換した。このペプチドは +2Da 質量が大きくなるため、質量分析により判別が可能である。+2Da 質量が増加した Asp 残基を有するペプチドをデータベース検索を用いて解析することにより、複雑な試料から網羅的に isoAsp 化タンパク質を探索できる技術を開発した。

4. 研究成果

(1) アクネ菌が産生する D-アミノ酸について、グリシンを除くタンパク質構成アミノ酸 19 種類について D-アミノ酸分析を行ったところ、D-アラニンのみ検出され、その量は L-アミノ酸とほぼ同等量分泌されていることが分かった (図 1)。

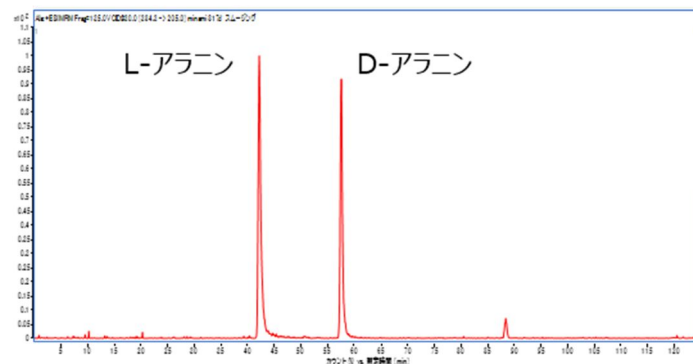


図1 アクネ菌培養上清中のD-アラニンの分析

(2) 続いて、表皮角化細胞のフィラグリン産生についての基礎検討を行った。正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) はリゾホスファチジン酸 (LPA) の添加により、フィラグリン遺伝子の発現量が著しく増加することが報告されている。しかしながら、NHEK は継代可能数が少なく、多種類の薬物をスクリーニングするには適していない。そこで、不死化細胞であるヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) を用いて、NHEK と同様の反応性が得られるかを検討した。その結果、HaCaT においては、NHEK で報告されているような LPA による顕著なフィラグリン産生促進作用は認められなかった (図 2)。HaCaT の分化に関して検討したところ、HaCaT は増殖培地中で培養を続けるだけで分化マーカーの一つであるケラチン 10 の遺伝子発現量が著しく増加することが明らかとなった。フィラグリンは分化細胞が産生するタンパク質であるため、増殖培地にて最大 10 日間培養し、分化誘導後の HaCaT に対して LPA を作用させてみたが、LPA によるフィラグリン産生促進作用は認められなかった。一方、NHEK では LPA によってフィラグリン発現が促進されることが確認されたことから、HaCaT を用いた皮膚バリア機能の評価は難しいことが分かった。

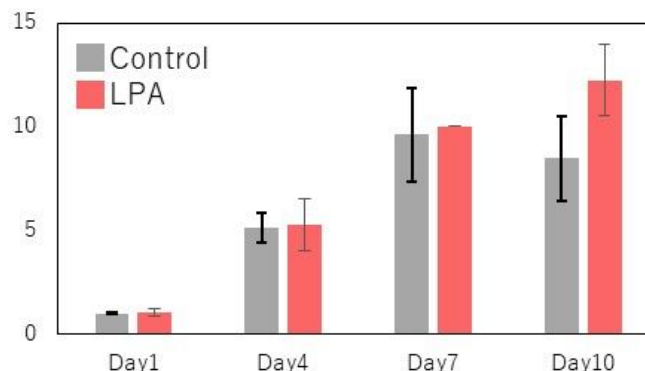


図2 HaCaTのフィラグリン発現に対するLPAの影響

(3) 表皮は内側から基底層、有棘層、顆粒層、角層の4層構造になっており、外側に向かうにつれて細胞の分化度は高くなる。各層において発現しているタンパク質は異なっており、例えば増殖性の未分化細胞が存在する基底層では、ケラチン5やケラチン14が発現し、より分化の進んだ有棘層ではケラチン1やケラチン10へとタンパク発現が変化する。さらに分化の進んだ顆粒層においてはフィラグリンやプレオマイシン水解酵素が発現する。このように発現するタンパク質を解析することにより、細胞の分化度を計り知ることが可能である。そこで、より詳細な分化状態の評価のために、ケラチンパターンであるケラチン1、ケラチン5、ケラチン10、フィラグリンおよびプレオマイシン水解酵素、コーニファイドエンベロープを構成するインボルクリン、ロリクリン、およびトランスグルタミナーゼ、角質間脂質を合成するセラミド合成酵素3の9個のマーカについて、プライマーを合成し、LPAによって誘導させた正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)の分化状態を経時的(0, 3, 6, 24, 72h)に解析した。

LPA処理群と非処理群(control)での各遺伝子の発現量を比較すると、未分化マーカであるケラチン5は0-72時間における経時変化を計測しても変化が認められない一方で、フィラグリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ、セラミド合成酵素3の遺伝子発現は24時間後に上昇し、72時間後にはさらに遺伝子発現が増強されていた(図3)。



図3 LPAの処置に対するヒト表皮角化細胞の各遺伝子発現量変化

このことから、処理時間は24時間程度が適当であると考え、D-アラニンおよびD-グルタミン酸を10 μMで処理したところ、いずれもコントロールよりもフィラグリンの発現を上昇させることが確認できた(図4)。

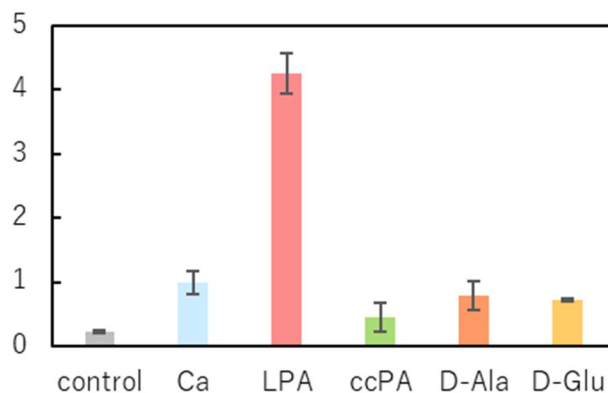


図4 HaCaTのフィラグリン発現に対するLPAの影響

(4) TVLDSGISEVR という配列を有するペプチドのうち、4番目の Asp を L-Asp、L-isoAsp、D-Asp、D-isoAsp に置き換えた 4 種類のペプチドを合成した。この 4 種類のペプチド混合物に対して AspN を作用させることにより、特異的に L-Asp ペプチドを分解できることが明らかになった (図 5a, 5b)。さらに、このペプチド溶液に対して、連続的に PIMT 反応を行うと、L-isoAsp ペプチドのシグナルが消失し、L-Asp ペプチドのシグナルが生じた (図 5b, 5c)。PIMT 反応後のペプチドの質量を分析すると +2Da の質量変化が生じており、 $H_2^{18}O$ と PIMT を用いることにより L-isoAsp ペプチドを特異的にラベル化することに成功した。

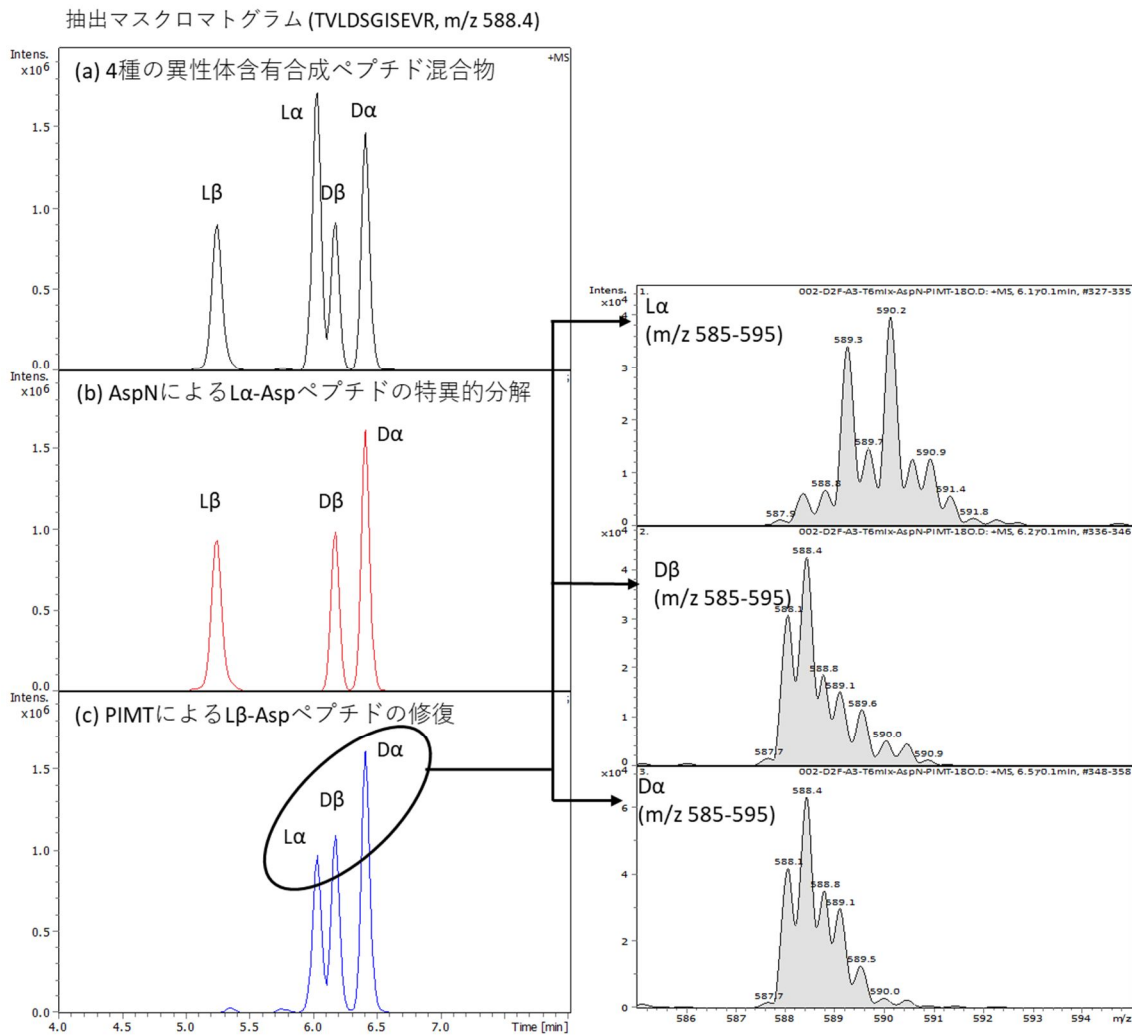


図5 L β -Aspペプチドの特異的ラベル化反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tanaka Shiho, Sakaue Hiroaki, Koiwai Toshikazu, Okuda Natsuki, Okuyama Katsuki, Horioka Yoshihiko, Hiramatsu Yasunari, Kawashima Makoto, Ishiguro Naoko, Sato Takashi	4. 巻 32
2. 論文標題 Near infrared radiation causes sebaceous gland enlargement along with an ROS dependent augmentation of epidermal growth factor receptor expression in hamsters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1717 ~ 1724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14878	査読の有無 有
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 Okuyama Katsuki, Mizuno Koji, Nittami Keisuke, Sakaue Hiroaki, Sato Takashi	4. 巻 139
2. 論文標題 Molecular mechanisms of cyclic phosphatidic acid-induced lymphangiogenic actions in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microvascular Research	6. 最初と最後の頁 104273 ~ 104273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mvr.2021.104273	査読の有無 有
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 Mizuno Koji, Sakaue Hiroaki, Kohsaka Keita, Takeda Hidetomo, Hayashi Nobukazu, Sato Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 An increase in normetanephrine in hair follicles of acne lesions through the sympatho adrenal medullary system in acne patients with anxiety	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1281 ~ 1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15935	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂上弘明、久野敦	
2. 発表標題 L-Asp化ペプチドの網羅的ラベル化とデータベース検索を利用した大規模解析	
3. 学会等名 日本薬学会	
4. 発表年 2024年	

1. 発表者名 坂上弘明、久野敦
2. 発表標題 データベース検索を指向したL-Asp化ペプチドの大規模解析技術の開発
3. 学会等名 D-アミノ酸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂上弘明、久野敦
2. 発表標題 タンパク質中のアミノ酸異性体解析技術の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅利亜由美、熊谷瞳子、尾関茉弥、坂上弘明、佐藤隆
2. 発表標題 UVB によるコラーゲンのカルボニル化修飾と真皮線維芽細胞の足場形成への影響
3. 学会等名 日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 イソアスパラギン酸（L-アスパラギン酸）残基を標識する方法	発明者 坂上弘明、久野敦	権利者 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-115213	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------