

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870403

研究課題名(和文)新規膜型リパーゼが関与する角質細胞間のセラミド保持に不可欠な脂質代謝過程の解明

研究課題名(英文)Lipid metabolism in stratum corneum essential for the maintenance of intercellular ceramides mediated by a novel transmembrane lipase

研究代表者

大垣 隆一(Ohgaki, Ryuichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20467525

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)：新生仔マウス角質層脂質を用いて、網羅的リポミクスを実施した。野生型マウスと当該リパーゼ遺伝子ホモ欠損マウスの比較の結果、広範なサブクラスの脂質分子種の変動が見られた。単一リパーゼの欠損が多くの脂質分子種の組成に影響し、表皮バリア機能の破綻に繋がることを明らかにした。皮膚のX線小角散乱測定や電子顕微鏡による構造的な解析でも、脂質ラメラ構造の異常が確認された。以上により当該リパーゼが関与する脂質代謝過程は、角質細胞間脂質のセラミド保持に重要であり、脂質ラメラ構造の形成に必須であることを明らかにした。本研究の成果は、新たな皮膚疾患の原因遺伝子の同定へと発展する可能性を有するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Stratum corneum lipids were extracted from both wild type- and lipase knockout neonates, and analyzed by mass-spectrometry. This lipidomics revealed that the deletion of the lipase gene alters a wide variety of lipid molecules ranging over several subclasses including ceramides, cholesterol, cholesterol esters, free fatty acids, monoglycerides and so on. Structural analyses by small angle X-ray diffraction and transmission electron microscope indicated that the lamellar lipid structure in stratum corneum was significantly disturbed whereas the overall organization of epidermal tissue was not apparently altered. These results demonstrate that the process of lipid metabolism mediated by the lipase is critically important for the maintenance of the overall lipid composition and lamellar structures of lipids in stratum corneum. The outcome of this study may contribute to identify a novel causative gene for dermatosis and to understand its pathological condition.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：表皮バリア 脂質代謝 リパーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

生体と外界の境界をなす表皮は、物理的障害・異物の侵入に対する防御、水分蒸散の調節などの重要バリア機能を有する。特に角質層の死細胞間に充填する角質細胞間脂質ラメラは、表皮バリアに必須の構造である。角質細胞間脂質の約 50%を占めるセラミドが表皮バリアに極めて重要であることは良く知られているが、角質層においてセラミドを秩序だったラメラ構造に保持し、表皮バリアの恒常性を保つ分子機構についてはいまだに不明な点が多く残されている。

研究代表者は、新規リパーゼ LOG1 を見出した。Log1 遺伝子は有棘層・顆粒層のケラチノサイトに高発現し、遺伝子ホモ欠損マウス (Log1 K0 マウス) は、過剰な経表皮水分蒸散により生後 1 日で致死となる。表皮ケラチノサイト初代培養では、LOG1 が細胞膜上でリパーゼドメインを細胞外に提示することを示す結果を得ている。また LOG1 は N 末端に膜貫通領域様の配列を持つ。以上より、LOG1 は角質層の膜型リパーゼであり、顆粒層の層板顆粒から分泌される前駆体脂質を代謝して角質細胞間脂質を生成する過程に与るものと予想される。興味深いことに、質量分析による解析では、Log1 K0 マウスにおいて角質層のセラミド総量が野生型に比べて半減していた。このセラミド保持の異常が表皮バリア破綻の直接の要因になっていると考えられる。しかし、リパーゼである LOG1 がセラミドの生成過程に直接関与している可能性は低いと考えられ、むしろ LOG1 はセラミド保持に不可欠な、他の何らかの脂質分子種の生成に関与することが想定される。しかしながら、LOG1 が関与する脂質代謝過程、及びその欠損により角質層のセラミド量が著しく減少する機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、質量分析計を用いた包括的リピドミクス解析により LOG1 が直接関与する脂質代謝過程を明らかにし、また LOG1 の欠損が引き起こす角質層の脂質組成変動を網羅的に解明して、角質細胞間のセラミドの保持に関わる分子機構を解明することを目的とした。また、in vitro での活性測定により LOG1 のリパーゼ活性を実証するほか、LOG1 欠損による角質細胞間脂質ラメラの構造的異常を明らかにすること、さらには相補実験をおこなって表皮バリア形成における LOG1 の機能的意義の統合的理解へと繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

LOG1 が関与する、セラミド保持に不可欠な脂質代謝過程及び基質と生成物の候補となる分子群を絞り込むため、野生型マウスおよび Log1 K0 マウスの新生仔マウスの角質から脂質成分の抽出をおこない、質量分析計を用いたリピドミクス解析による脂質組成変動

比較解析を試みた。

さらに、哺乳類の培養細胞を用いて組換え LOG1 タンパク質の発現・精製系を構築し、in vitro リパーゼ活性測定によって、リパーゼとしての活性の実証と、リピドミクス解析で絞り込んだ脂質分子種が、真の生体内基質および生成物であることを示すことを試みた。

また、構造的な解析としては、透過型電子顕微鏡と X 線小角散乱法による角質細胞間脂質ラメラの構造的解析を実施し、上記脂質代謝過程の欠損に起因したセラミドの保持能の低下が引き起こす形態的異常を記述することを試みた。

反応生成物による表皮バリア相補実験では、Log1 K0 仔マウス個体、及び 3 次元培養表皮モデルにおいて、上記脂質代謝過程の反応生成物の脂質分子を用いて表現型の相補を試みる。以上の研究成果をもって、新規膜型リパーゼ LOG1 が関与する角質細胞間のセラミド保持に不可欠な脂質代謝過程を解明することを試みた。

### 4. 研究成果

新生仔マウスの角質層から抽出した脂質を用いて、網羅的なリピドミクス解析を実施した。野生型マウスと当該リパーゼ遺伝子ホモ欠損マウスの比較の結果、セラミド等の広範な脂質サブクラスにおいて、脂質分子種の変動が見られた。本解析により単一リパーゼの欠損が多くの脂質分子種にわたって組成を大きく変動させ、表皮バリア機能の破綻に繋がることを明らかにした。しかしながら、LOG1 欠損によって変動が見られた脂質分子種が多数存在しており、LOG1 が直接関与する脂質代謝過程を同手法により詳細に絞り込むことは容易ではないことが想定された。

そこで、In vitro リパーゼ活性測定系の確立が、基質及び生成物の絞り込みにおいて非常に重要になると判断した。すなわち、精製した組換え LOG1 タンパク質といくつか脂質サブクラスの代表的な脂質分子種を反応させて、基質と生成物の絞り込みに繋げることができるものと期待した。そのために、哺乳類培養細胞株を用いて Flag タグを付加した組換えタンパク質の発現・精製系を構築した。今後、同精製タンパク質を用いた in vitro リパーゼ活性測定に着手する予定である。また、当初予定していなかった解析ではあったが、同組換えタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。ウエスタンブロット解析により内在性リパーゼが表皮組織に特異的に発現していることを明らかにした。また生化学的分画実験により、当該のリパーゼが膜蛋白質であることを示した。

角質細胞間脂質ラメラの構造的解析をおこなうため、公益財団法人高輝度光科学研究センターの大型放射光施設 Spring-8 において、新生仔マウスの皮膚の X 線小角散乱測定を実施した。リパーゼ遺伝子ホモ欠損マウスの角質最表層において、角質細胞間脂質ラメ

ラ構造に由来する散乱が確認されないことから、脂質ラメラの構造が大きく変性していることが示唆された。併せて、広角散乱の測定と解析を実施し、水平方向の脂質の配向性については有意差が無いことを示唆するデータを得た。

電子顕微鏡による超微細構造の観察をおこなった結果、これと一致するかたちで脂質ラメラ構造の異常が確認された。以上により当該パーゼが関与する脂質代謝過程は、角質細胞間脂質のセラミド保持に重要であり、正常な脂質ラメラ構造の形成に必須であることを明らかにした。

本研究の成果は、角質細胞間脂質におけるセラミド保持の機構の理解に貢献するだけでなく、新たな皮膚疾患の原因遺伝子の同定へと発展する可能性を有するものであると考える。

#### 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1件)

1. Oda A, Yamagata K, Nakagomi S, Uejima H, Wiriyasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Kanai Y, Tanaka H. Nicotine induces dendritic spine remodeling in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2014; 128: 246-255. DOI: 10.1111/jnc.12470.

[学会発表](計12件)

1. 村田 大輔、大垣 隆一、萩原 浩平、Kanokporn Phetdee、永森 收志、平田 拓、野村 和子、野村 一也、三谷 昌平、金井 好克 線虫腸管細胞におけるアミノ酸トランスポーターAAT-6の頂端膜局在に寄与するトランスポートソーム。第8回トランスポーター研究会年会 2013年06月15日~2013年06月16日、熊本。
2. Kohei Hagiwara, Shushi Nagamori, Yasuhiro M. Umemura, Ryuichi Ohgaki, Yoshikatsu Kanai. Age-dependent maintenance of transportsome in *C. elegans*. 第1回 Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications 2013年06月16日~2013年06月18日、淡路。
3. Shushi Nagamori, Pattama Wiriyasermkul, Meritxell Espino Guarch, Kazuhisa, Okuyama, Saya Nakagomi, Kenjiro Tadagaki, Kazuaki Takafuji, Ryuichi Ohgaki, Manuel Palacin, Yoshikatsu Kanai. A novel cystine transporter in S3 segment of the renal proximal tubule is an

"unknown-partner" of Slc3a1 (rBAT). 2nd HDP international symposium on Multi-Level Systems Biology 2013年06月28日~2013年06月29日、東京。

4. Ling Wei、富永 英之、Pattama Wiriyasermkul、大垣 隆一、忠垣 憲次郎、永森 收志、金井 好克. 3-Fluoro-L-a-methyltyrosine (FAMT), a positron emission tomography probe for cancer diagnosis, is a selective substrate of cancer-specific amino acid transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). 第123回日本薬理学会近畿部会 2013年07月12日、名古屋。
5. 大垣 隆一、李 悦、原 沙織、中込 紗綾、永森 收志、金井 好克. Midgestational lethality in mice lacking LAT1, large neutral amino acid transporter 1, is associated with abnormal blood vessel formation and defective placental development. 第86回日本生化学会 2013年09月11日~2013年09月12日、横浜。
6. Pattama Wiriyasermkul, Shushi Nagamori, Noriyoshi Isozumi, Ryuichi Ohgaki, Hideyuki Tominaga and Yoshikatsu Kanai. Expression and functional profiles of amino acid transporters in cancer cell lines. 第86回日本生化学会 2013年09月12日、横浜。
7. 原 早織、大垣 隆一、Printip Wongthai、中込 咲綾、永森 收志、金井 好克. アミノ酸トランスポーターLAT1阻害による血管内皮細胞チューブ形成への影響についての検討。第124回日本薬理学会近畿部会 2013年11月01日、京都。
8. Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Yurika Miyoshi, Pattama Wiriyasermkul, Ryuichi Ohgaki, Kenjiro Tadagaki, Kenji Hamase, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Transport of 4-borono-L-phenylalanine, a 10B carrier of boron neutron capture therapy, by system L amino acid transporters. 第124回日本薬理学会近畿部会 2013年11月01日、京都。
9. Saori Hara, Ryuichi Ohgaki, Printip Wongthai, Saya Nakagomi, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Involvement of amino acid transporter in vascular endothelial cell tube formation. 生理学研究所研究会「細胞

センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会」2013年11月28日～2013年11月29日，岡崎。

10. 村田 大輔、大垣 隆一、萩原 浩平、Kanokporn Phetdee、永森 收志、魏 玲、平田 拓、野村 一也、三谷 昌平、金井 好克。線虫アミノ酸トランスポーター AAT-6 の輸送機能および細胞内局在の解析。第36回日本分子生物学会年会 2013年12月04日，神戸。
11. Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Yurika Miyoshi, Pattama Wiriyasermkul, Pornparn Kongpracha, Isozumi Noriyoshi, Ryuichi Ohgaki, Kenjiro Tadagaki, Kenji Hamase, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Mechanisms of tumor cell uptake of 4-borono-phenylalanine, a 10B carrier of boron neutron capture therapy, mediated by system L amino acid transporters. 第87回日本薬理学会年会 2014年03月19日，仙台。
12. 永森 收志、Pattama Wiriyasermkul、五十棲 規嘉、Pornparn Kongpracha、大垣 隆一、金井 好克。Evaluation of amino acid transporter LAT1 as a molecular target of anti-tumor therapy by means of the combination of comprehensive proteomics and transport assay. 第87回日本薬理学会年会 2014年03月21日，仙台。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：