

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790334  
 研究課題名（和文） 表皮バリア形成における小胞体膜貫通型新規リパーゼ様タンパク質の役割  
 研究課題名（英文） Function of a novel ER-localized transmembrane lipase-like protein in epidermal barrier formation.  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

表皮バリアは生存に必須の生体機能である。新規リパーゼ様因子 LOG1 の遺伝子ホモ欠損マウスは、皮膚からの過剰な水分蒸散を示し生後 1 日で致死となるがその機序は明らかにされていない。本研究は LOG1 遺伝子欠損が角質の水透過性を上昇させることを明らかにし、表皮バリア破綻の原因と考えられる角質脂質組成の変動の一端を明らかにした。LOG1 はケラチノサイトに発現する細胞膜型リパーゼとして角質細胞間脂質代謝に与り、表皮バリアに必須の役割を果たすものと考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Epidermal barrier is crucial for survival of organisms. Homozygous gene disruption of a lipase-like protein LOG1 in mouse is associated with an abnormal water loss from skin and results in lethality at one day post-partum although the detailed mechanism is unknown. This study revealed an augmentation in water permeability and an abnormal lipid composition of stratum corneum in gene knockout mice. It was suggested that LOG1 is a novel transmembrane-type lipase which is involved in the metabolism of intercellular lipids of stratum corneum and is fundamentally important for epidermal barrier.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：リパーゼ、表皮バリア、角質細胞間脂質、脂質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚に存在する表皮バリアは物理的な障害および細菌等の異物に対する生体防御や、水分蒸散量の調節といった生体に必須の機能を担っている。角質細胞間にラメラ状に規則的に充填する角質細胞間脂質の疎水性バリアは、この表皮バリアにおいてその実体を成す重要な生体構造である。角質層直下の顆

粒層細胞が保持する層板顆粒から分泌された前駆体脂質は、角質細胞間隙において代謝されてセラミド、コレステロール、脂肪酸といった中性脂質に富んだ角質細胞間脂質となる。過去の研究では、セラミドを合成するβ-グルコセレブロシダーゼやスフィンゴミエリナーゼ、リン脂質の代謝を担うホスホリパーゼ A2、硫酸コレステロールエステルの分

解に携わるステロイドスルファターゼといった、角質細胞間脂質の合成や分解に与る各種脂質代謝酵素が表皮バリアに重要な寄与を果たしていることが報告されている。しかし、特定の脂質分子種が蓄積したり不足したりすることで全体としてどのような脂質組成の変動が引き起こされ、それが角質細胞間脂質ラメラの機能や構造にどのように影響して最終的に表皮バリアの異常に繋がるのか、その詳細は充分には解明されていない。研究代表者は、膜輸送体の分子同定研究の過程で全く偶然に、膜タンパク質であることが予想される新規リパーゼ様因子 LOG1 を見出した。293T 細胞において異所的に発現させた LOG1 は小胞体に局在した。LOG1 は皮膚において高い遺伝子発現を示し、その遺伝子ホモ欠損マウスは皮膚からの過剰な水分蒸散を示し生後 1 日で致死となることがわかった。組織学的な解析から遺伝子欠損マウスの角質が若干の肥厚を示すことが明らかになったが、LOG1 がどのような脂質代謝過程に関与し、いかにして表皮バリアに必須の機能を果たすのかは明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、表皮バリアに必須の新規因子として膜貫通型リパーゼ様タンパク質の LOG1 を見出した。本研究は、LOG1 の脂質代謝酵素としての機能特性、組織及び細胞レベルの発現と局在、角質細胞間脂質の恒常性維持に対する機能的役割を解析することで、表皮バリアにおいて LOG1 が果たす必須の役割を明らかにするとともに、表皮バリアの形成と維持に関わる新たな分子機構の解明に繋げることを目的としておこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織及び細胞内の発現と局在解析

マウス新生仔の皮膚をもちいて *In situ* ハイブリダイゼーション法および RT-PCR 法により表皮組織における LOG1 の発現部位と時期を解析した。皮膚ケラチノサイトの初代培養系を樹立し、エピトープタグを付加した LOG1 を導入して細胞内の局在を観察した。

### (2) 組織学的表現型解析

各種表皮分化マーカーによる皮膚組織切片の免疫組織化学染色をおこない、遺伝子欠損マウスと野生型マウス間で表皮の分化状態を比較した。遺伝子欠損マウスで水分の蒸散量が増加していることを定量的に評価するため、皮膚丸ごとを対象に経表皮水分蒸散量の測定、角質シートを対象にトリチウム水透過性の解析を実施した。

### (3) *In vitro* リパーゼ活性解析

培養細胞にエピトープタグを付加した LOG1 を導入し、活性を保持したタンパク質精製系の構築とリパーゼ活性測定系の確立を試みた。

### (4) 脂質組成変動解析

質量分析により角質抽出脂質の網羅的な比較リピドミクス解析を実施し、遺伝子欠損マウスと野生型マウス間での脂質組成の変動を解析した。

## 4. 研究成果

(1) LOG1 遺伝子の発現は表皮基底層の細胞には見られず、有棘層および顆粒層の細胞層において高い発現を示した。また、遺伝子発現の時期は表皮の重層化が始まる時期と一致しており、LOG1 が終末分化の過程にあるケラチノサイトで発現することが明らかになった。作成した抗 LOG1 ウサギポリクローナル抗体では明確な免疫染色像を得ることができず、タンパク質レベルでの局在の解明は今後の課題となった。エピトープタグを付加した LOG1 はケラチノサイト初代培養の

細胞膜上に局在した。抗体の細胞膜透過処理をおこなわない染色条件でもリパーゼドメインに付加したエピトープタグが抗体に反応して細胞膜上に染色シグナルが得られたことから、リパーゼドメインが細胞外に露出していることが明らかになった。293T 細胞における小胞体局在とは大きく異なっており、ケラチノサイト特有の細胞内タンパク質選別機構が LOG1 の細胞膜への移行に寄与していることが予想される。

(2) ケラチンその他の表皮分化マーカーの免疫組織化学染色では、遺伝子欠損マウスと野生型マウスの表皮の分化状態に目立った違いは見られなかった。経表皮水分蒸散量の測定と角質シートの透過性解析では、遺伝子欠損マウスの皮膚および角質の水に対する透過性が、野生型のものに比して顕著に高い(約 3 倍程度)ことが明らかになった。このことから、LOG1 遺伝子欠損マウスでは表皮組織の中でも特に角質細胞間脂質が異常をきたし、正常な疎水性バリアが機能していないことが強く示唆された。

(3) 培養細胞で発現させた LOG1 を部分的に精製する系を確立した。In vitro でリパーゼ活性の指標となる p-ニトロフェノールパルミチン酸のエステル結合加水分解活性が弱いながらも検出されたことから、精製した LOG1 は活性を保持しているものと考えられる。今後、LOG1 の脂質代謝酵素としての機能特性の解析をするため、この発現系と精製系にさらなる改良を加えていくことを予定している。

(4) 遊離脂肪酸、モノアシルグリセロール、セラミドを中心に多くの脂質サブクラスにまたがって LOG1 遺伝子欠損の影響が確認された。特に顕著な影響はセラミドにおいて見られ、遺伝子欠損マウスの角質ではセラミド総量が半減していることが明らかになっ

た。網羅的な脂質組成変動が明らかになったことで、今後 LOG1 が関与する脂質代謝過程の反応基質と反応生成物の絞り込みに非常に重要な情報を取得することができた。

(5) まとめ：本研究により、LOG1 がケラチノサイトに発現する細胞膜型リパーゼとして角質細胞間脂質代謝に関与していることが示唆された。また、LOG1 遺伝子欠損マウスにおいて表皮バリア破綻の直接的な原因になっていると考えられる、角質脂質組成の変動の一端を明らかにした。本研究の成果は、表皮バリアの形成と維持に関わる新たな分子機構の解明に貢献するのみならず、表皮バリア機能不全を伴う皮膚疾患の病態解明や治療の開発へとつながる潜在的な意義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 6 件)

- 1). Hagiwara K, Nagamori S, Umemura YM, Ohgaki R, Tanaka H, Murata D, Nakagomi S, Nomura KH, Kage-Nakadai E, Mitani S, Nomura K, Kanai Y. NRFL-1, the *C. elegans* NHERF orthologue, interacts with amino acid transporter 6 (AAT-6) for age-dependent maintenance of AAT-6 on the membrane. *PLoS One*. 2012; 7: e43050.
- 2). Khunweeraphong N, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Nishinaka Y, Wongthai P, Ohgaki R, Tanaka H, Tominaga H, Sakurai H, Kanai Y. Establishment of stable cell lines with high expression of heterodimers of human 4F2hc and human amino acid transporter LAT1 or LAT2 and

- delineation of their differential interaction with  $\alpha$ -alkyl moieties. *J Pharmacol Sci.* 2012; 119: 368-380.
- 3). Wiriyasermkul P, Nagamori S, Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H, Kitashoji T, Ohgaki R, Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H, Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L-alpha-methyl-tyrosine by tumor-upregulated L-type amino acid transporter 1: a cause of the tumor uptake in PET. *J Nucl Med.* 2012; 53: 1253-1261.
  - 4). Tanaka H, Takafuji K, Taguchi A, Wiriyasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Suh PG, Kanai Y. Linkage of N-cadherin to multiple cytoskeletal elements revealed by a proteomic approach in hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2012; 61: 240-250.
  - 5). Juuti-Uusitalo K, Klunder LJ, Sjollem KA, Mackovicova K, Ohgaki R, Hoekstra D, Dekker J, van Ijzendoorn SC. Differential effects of TNF (TNFSF2) and IFN- $\gamma$  on intestinal epithelial cell morphogenesis and barrier function in three-dimensional culture. *PLoS One.* 2011; 6: e22967.
  - 6). Ohgaki R, van Ijzendoorn SC, Matsushita M, Hoekstra D, Kanazawa H. Organellar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry.* 2011; 50: 443-450.
- [学会発表] (計 8 件)
- 1). 永森收志, 奥山裕久, Pattama Wiriyasermkul, 中込咲綾, 西中由美子, 高藤和輝, 大垣隆一, 金井好克. 質量分析計と再構成プロテオリポソームを用いた新規トランスポーター複合体の解析—腎尿細管に残された第二のシスチントランスポーターの分子同定. 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日 福岡、日本.
  - 2). 永森收志, 奥山裕久, Pattama Wiriyasermkul, 中込咲綾, 西中由美子, 高藤和輝, 大垣隆一, 金井好克. 腎近位尿細管の第二のシスチントランスポーターの分子同定と機能解析. 2012年度 生理研研究会 2012年12月1日 愛知、日本.
  - 3). 田中秀和, Pattama Wiriyasermkul, 忠垣憲次郎, 大垣隆一, 永森收志, 金井好克. ニコチンによる海馬神経細胞スパインの形態変化(3). 第122回日本薬理学会近畿部会. 豊中市. 2012年11月16日.
  - 4). 大垣隆一, 奥山裕久, Pattama Wiriyasermkul, 中込咲綾, 西中由美子, 高藤和輝, 永森收志, 金井好克. 腎尿細管に残された第二のシスチントランスポーターの分子同定. 第3回分子腎臓フォーラム 2012年9月1日 東京、日本.
  - 5). Nagamori S, Umemura Y, Wiriyasermkul P, Nakagomi S, Nishinaka Y, Takafuji K, Ohgaki R, Kanai Y. Functional coupling between a Na<sup>+</sup>-dependent anion transporter SMCT2 and a urate-anion exchanger URAT1 through a scaffold protein PDZK1. Gordon Research Conferences Membrane Transport Proteins 2012年7月4日~2012年7月5日 Les Diablerets, Switzerland.
  - 6). 金井好克, 永森收志, 大垣隆一, 中込咲綾, Wiriyasermkul Pattama, 西山俊. 腎

特異プロスタグランジン輸送体OAT-PG  
ノックアウトマウスの食塩応答性血圧変  
動の機序の解明. ソルト・サイエンス研  
究財団「第24回助成研究発表会」. 東京.  
2012年7月18日

- 7). 大垣隆一. 表皮バリア形成に必須の新規  
リパーゼ様タンパク質mYEH2の役割.  
花王芸術科学財団 第14回 助成研究発  
表・交流会 2012年6月6日 東京、日本.
- 8). 大垣隆一, Li Yuewei, 永森收志, 田中秀  
和, 金井好克. System L amino acid  
transporter LAT1 is essential for  
embryonic angiogenesis. 第 84 回日本  
生化学会大会 2011 年 9 月 22 日 日本、  
京都.

#### 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：