

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11641

研究課題名(和文) 脂肪酸結合タンパク(FABP)による胸腺上皮細胞の機能制御

研究課題名(英文) Regulation of thymic epithelial cells by fatty acid-binding protein (FABP)

研究代表者

安達 泰弘 (Adachi, Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10346546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸結合タンパク質(FABP)は、細胞内で脂肪酸に結合・可溶化することで代謝や脂肪酸シグナル伝達など多様な細胞内プロセスに関与する。FABP5の標的遺伝子候補として見出した、細胞骨格に関わると思われるKeratin-42(Krt42)について、特異的な抗体の作製、組織での発現解析および遺伝子転写調節機構の解析を行った。その結果、高い特異性を有する抗体を得ることができ、Krt42産物は胸腺上皮細胞に発現することが判明した。Fabp5遺伝子発現をノックダウンするとKrt42遺伝子発現は亢進することから、FABP5が関与するシグナル伝達系はKrt42遺伝子発現を抑制的に制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪酸結合タンパク(FABP)分子群は、細胞内エネルギー代謝、生理活性脂質の合成、シグナル伝達など多様な細胞内プロセスに関与している。FABPが関与する脂肪酸シグナル伝達経路の標的遺伝子は、脂肪酸代謝関連酵素や増殖・分化関連遺伝子群であるといわれているが、その全貌は明らかではない。本研究結果は、細胞骨格の形成に関与すると思われるKeratin-42の遺伝子が、脂肪酸シグナル伝達系の調節を受けている可能性を示すものである。

今後、FABP分子群と細胞骨格形成の制御及び脂肪酸分子種の関係が明らかになれば、特定の栄養素と遺伝子発現調節メカニズムの基礎的理解に大きく貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid-binding proteins (FABPs) are involved in various cellular processes such as metabolism and fatty acid signal transduction. Generation of specific antibody, expression in tissues, and regulation mechanisms of gene transcription were analyzed for Keratin-42 (Krt42) which was identified as a candidate target gene for FABP5. The results showed that Krt42 gene product was expressed in thymic epithelial cells, and that knockdown of Fabp5 enhanced Krt42 gene expression, suggesting that the signaling pathway involving FABP5 may act in a repressive manner on Krt42 gene expression in the thymic epithelial cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脂肪酸結合タンパク質 FABP 胸腺上皮細胞 細胞骨格 ケラチン

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸を含む脂質は重要な栄養物質である。このうち n-3 系長鎖不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) や n-6 系であるアラキドン酸は、その摂取バランスにより炎症性皮膚疾患や自己免疫疾患、さらには一部の精神疾患や生活習慣病の病態形成・制御に重要であることは、免疫学的、栄養学的に広く知られているところである。加えて近年では、栄養物質は細胞内情報伝達系とクロマチン構造制御を介して遺伝子発現を制御することが多数報告されている。すなわち、脂肪酸は栄養物質であると同時に情報担体という面も有する。

しかしながら、脂肪酸を含む脂質は一般的に水に不溶であるため、細胞内では脂肪酸結合タンパク質 (FABP) 分子群に結合することで可溶化され、その細胞内局在が決定されていると考えられている。FABP は脂肪酸代謝、生理活性脂質 (エイコサノイド) 産生や脂肪酸シグナル伝達など多様な細胞内プロセスに関与することが明らかにされつつあるが、その全貌はわかっていない。

申請者は、脂肪酸の情報担体という面とその細胞内キャリアである FABP との関係に注目し、「1 次リンパ器官である胸腺における FABP の機能は何か？」という観点で発現解析と分子機能解析を行ってきた。胸腺における FABP 発現は胸腺上皮細胞で dominant であり、胸腺細胞に作用するサイトカインの産生を調節し得ることが分かっている (Owada Y. et al., 2002, Adachi Y. et al., 2012) ことから、脂肪酸と FABP は胸腺上皮細胞の機能に関する何らかの重要な役割があると考えられる。胸腺上皮細胞は皮質および髄質上皮細胞の 2 群に大別され、それぞれケラチン (Krt) 5 および 8 を発現している。申請者は、これまでの FABP 機能解析の中で FABP5-KO 胸腺上皮細胞において Krt42 遺伝子発現変動を見出している (未発表) が、この分子に関しての解析例は数報しかなく、胸腺における解析例はない。また、Krt42 遺伝子はマウス ES 細胞で特異的に発現する遺伝子群にも含まれており (Mitsui K. et al., 2003)、これが胸腺上皮細胞の機能においてどのような意味を持つのか興味深いところである。

2. 研究の目的

本計画では、先に見出している Krt42 遺伝子発現は FABP5-が関与する脂肪酸シグナル伝達系の制御下にあるか否か、そして胸腺における発現様式、および胸腺上皮細胞における機能は何かについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Krt42 遺伝子発現の検証

野生型および FABP5-KO マウス胸腺より total RNA を抽出し、それを鋳型に cDNA を合成しサンプルとした。本学共同利用研究センターに既設の定量 qRT-PCR 装置にて Krt42 遺伝子産物の発現量比を算出した。

(2) 組織における Krt42 遺伝子発現の検出

Krt42 に対する特異抗体は殆ど市販されていないことから、Krt42 発現検出の第 1 選択肢として ISH (in situ hybridization) による組織内での Krt42 遺伝子発現の検出を試みた。既報 (Tong et al., 2004) を参考に probe 用ベクターを作製し (pGEM-T Easy, Promega)、DIG-cRNA probe を合成した (DIG RNA Labeling Kit, Roche)。反応は一般的な条件で行い、キット (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche) を用いて検出を行った。

(3) Krt42 特異的抗体の作製と特異性の検証

ISH と並行して、外部委託によるウサギ抗マウス Krt42 ポリクローナル抗体 (抗 Krt42 抗体) の作製を行った (コスモバイオ株式会社)。

作製した抗 Krt42 抗体の特異性について、Western blot (WB) による検定を行った。胸腺で発現する Krt5 と 8、Krt42 とアミノ酸配列の相動性が高い Krt17、及び Krt42 の cDNA を pCMV-HA ベクター (Clontech) にクローニングし、遺伝子導入試薬 (Fugene HD, Promega) にて NIH3T3 株に導入した。48 時間後に総タンパク質を回収し、電気泳動用サンプルとした。定法にて PVDF 膜を使用した blot を作製し、各種 1 次抗体、対応する 2 次抗体および化学発光試薬 (ECL prime, Cytiva) を反応させ、本学既設の発光検出装置 (Ez-Capture, ATTO) にて検出を行った。

使用した抗体は以下の通りである：ウサギ抗 Krt5 ポリクローナル抗体 (28506-1-AP, Proteintech, x5000)、ウサギ抗 Krt5 ポリクローナル抗体 (AF138, Covance, x5000)、ラット抗マウス EndoA (Krt8) モノクローナル抗体 (TROMA-1, DSHB, x500)、ウサギ抗 Krt17 ポリクローナル抗体 (ab53707, Abcam)、およびウサギ抗マウス Krt42 ポリクローナル抗体 (カスタム, Cosmobio)。検出用 2 次抗体は、ヤギ抗ウサギ IgG/HRP 標識 (x10000, Proteintech)、ヤギ抗ラット Ig/HRP (x10000, Proteintech) を使用した。

(4) 胸腺における Krt42 の発現

8~10 週齢の野生型および FABP5-KO マウス胸腺のパラフィン包埋切片を作製し、種々の濃度で抗 Krt42 抗体を反応させ、HRP 標識二次抗体で検出 (VectorLab)を行った。

4. 研究成果

(1) Krt42 遺伝子発現の検証

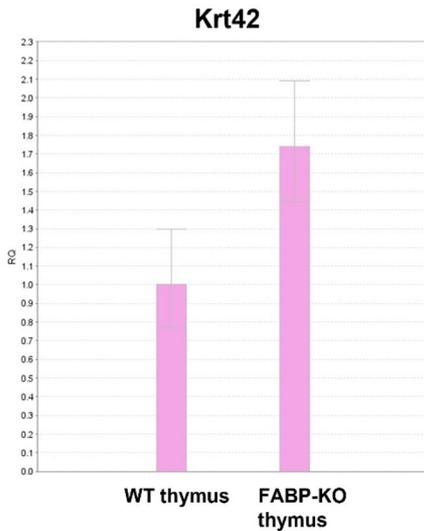


図1 定量 RT-PCR による Krt42 遺伝子発現レベルの検証

先に得られている DNA アレイ実験における Krt42 遺伝子発現レベル差を検証するため、作製した野生型および FABP5-KO 胸腺 cDNA 使用し、定量 RT-PCR を行った。DNA アレイ実験では FABP5-KO 胸腺上皮細胞で野生型の約 8 倍の遺伝子発現を検出していたが、定量 RT-PCR では最大 2.1 倍であった (図 1)。FABP5-KO 胸腺において遺伝子発現が増強されていたことから、Krt42 遺伝子発現は FABP5 が関与するシグナル伝達系の下流に位置し、FABP5 は抑制的に作用している可能性が示唆された。

(2) 組織における Krt42 遺伝子発現の検出

上述の通り、Krt42 の発現解析および機能解析は殆ど行われておらず、また特異的な抗体も 2 種類しか市販されておらず、論文で使用された形跡も見られない。この状況において生体内での Krt42 遺伝子発現を検出するための第 1 選択肢は ISH であり、恐らく唯一の報告である Tong et al., 2004 を参考に ISH を試みた。

Probe 作製のプラスミドとして、Krt42 mRNA の 3' 末端側を標的にした以下を作製した (図 2)。このプラスミドを鋳型に DIG 標識 cRNA probe を合成し (図 3)、DIG 標識効率の検定 (図 4) 後に ISH を行った。

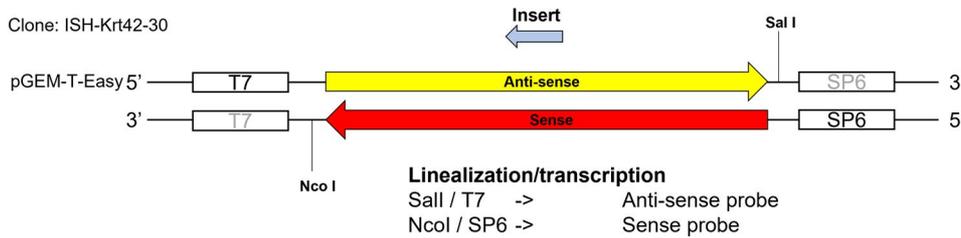


図2 ISH probe 作製用プラスミド

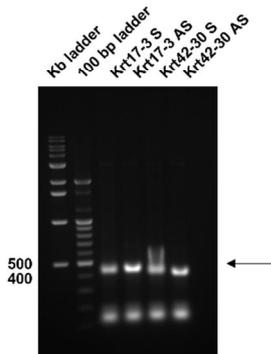


図3 電気泳動による cRNA probes の確認

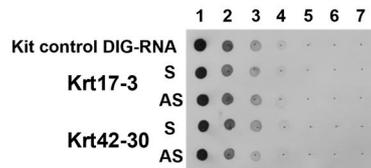


図4 Dot blot による DIG 標識効率の検定
1~7 は RNA 量を示す。それぞれ 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0 pg

野生型マウス指 (digits) のパラフィン包埋切片に対し ISH を行ったところ、Krt42 遺伝子発現は爪床 (nb) および nail matrix (mat) で強い陽性反応が検出された (図 5a および b)。また、指先端部の表皮においては顆粒層の細胞質において陽性反応が検出された (図 5c)。指背側の表皮においても顆粒層で弱い陽性であったが、皮下組織や骨組織においては陰性であった。これらの結果は既報と同様であったことから、検出は正しく行われたと考えられた。

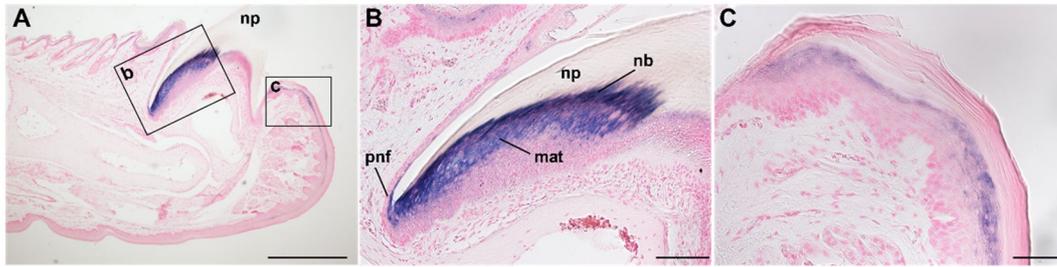


図5 WT mouse digits におけるKrt42遺伝子発現の検出 (ISH)

A; 指中央部の断面。Rectangle b および c の拡大像は B および C に示す。Bar = 500 μ m。
 B; rectangle b の拡大像。np; nail plate, nb; nail bed, mat; nail matrix, pnf; proximal nail fold, bar = 100 μ m。C; rectangle c の拡大像。Bar = 50 μ m。核染色は nuclear fast red。

(3) Krt42 特異的抗体の作製と特異性の検証

上記 ISH 実施と同時に、申請者独自の KRT42 特異的な抗体を得るため、外部委託で抗体作製を行った。抗原は KRT42 の C 末端側に存在する 20 アミノ酸残基を選定し(図6)、最終的にウサギ抗マウス KRT42 ポリクローナル抗体(ペプチド抗体)を得た。



Target a.a. seq.: pos. 408-426

C*QYSSSLASQPSREGMVTSR

*additional Cys-residue for binding to carrier protein.

図6 ペプチド抗体作製における抗原部位の決定

作製した抗体の特異性を確認するため、胸腺で発現する主なケラチン分子種を強制発現させた細胞 (NIH3T3) の総タンパク質をサンプルとした WB 解析を行った。各リコンビナントケラチン (HA-Krt8, HA-Krt17, HA-Krt42) は、それぞれの特異抗体により、予想された分子量の単一バンドとして検出された(図7B-D)。従って、作製した抗 Krt42 抗体は Krt42 タンパク分子を認識していると考えられた。しかし、抗 Krt5 抗体 (AF138) による HA-Krt5 の検出においては多数のバンドが出現した(図7A)。2次抗体のみで反応させた blot ではバンドは出現しなかったことから、この結果は1次抗体 (AF138) の性状によるものと考えられた。ウサギ抗 Krt5 抗体 (28506-1-AP) を使用した場合でも同様であった。

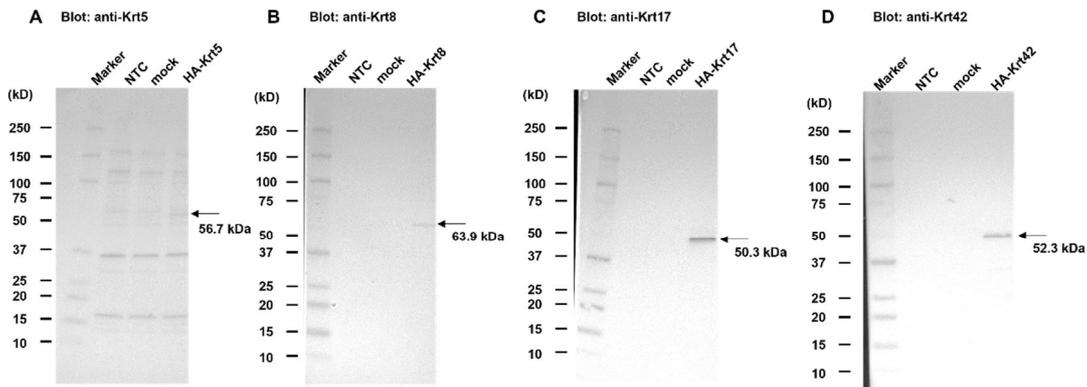


図7 Western blot による抗体の特異性の確認 - 1

NTC; non-treated control, mock; empty vector transfected control.

次に、作製した抗 Krt42 抗体が他のケラチン分子を認識する可能性、および他抗体により Krt42 が認識されるの可能性を検討するため、更に WB を行った。抗 HA-tag 抗体を使用した図8A では全てのリコンビナントケラチン分子が予想分子量で認識されていたが、他に多数のバンドも検出された。図7Aの結果と同様に抗体の性状によるものと考えられたことから、HA-tag 融合タンパク分子の検出では別の抗 HA-tag 抗体の使用が望ましい。一方、今回作製した抗 Krt42 抗体を使用した場合は他のリコンビナントケラチン分子は認識されず、予想分子量の Krt42 タンパク分子が検出された(図8B)。35kD 付近に extra band が検出されているが、transcriptional variant の産物、或いは PTM (post-translational modification) の可能性も含めて今後改め

て検討する予定である。更に、Krt42 とアミノ酸配列の相同性が高い Krt17 に対する抗体が Krt42 を認識する可能性を検討したところ、抗 Krt17 抗体 (ab53707) は Krt17 タンパク分子と共に extra band を含む Krt42 タンパク分子を強く認識することが判明した (図 8C)。

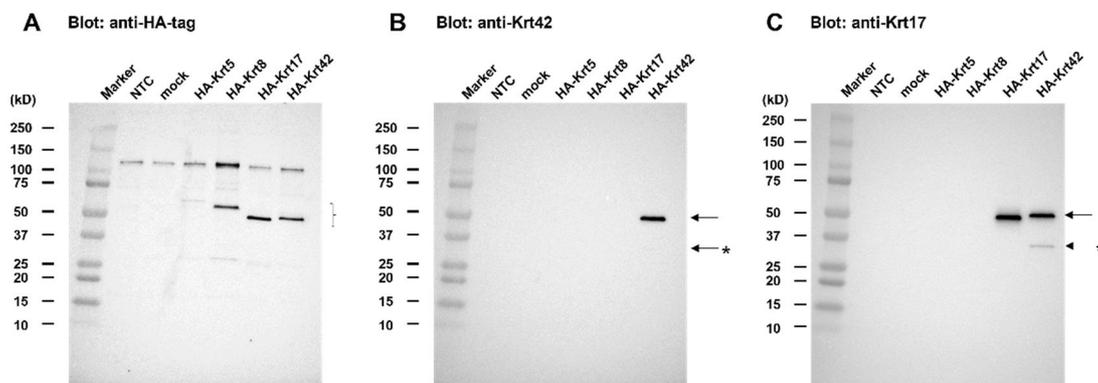


図 8 Western blot による抗体の特異性の確認-2

NTC; non-treated control, mock; empty vector transfected control, *; extra band recognized by anti-Krt42 antibody.

ここまでの結果から、今回作製したウサギ抗マウス Krt42 ポリクローナル抗体は Krt42 タンパク分子に対する高い特異性を有しており、少なくとも WB においては十分に使用可能であることが判明した。

(4) 胸腺における Krt42 の発現

作製した抗 Krt42 抗体を用いたマウス胸腺組織 (パラフィン包埋切片) の染色を行ったところ、野生型、および FABP5-KO マウス胸腺双方で Krt42 陽性細胞を検出した。Krt42 陽性細胞は皮質 (c) および髄質 (m) に散在する大型の核を有し、陽性反応は細胞核に見られた (図 9B および D 矢頭)。2 次抗体のみのコントロール胸腺切片においては、陽性反応は見られなかった。この実験における発色強度 (茶色) に定量性は認められていないが、FABP5-KO 胸腺における陽性細胞でより発色強度が強いように思われた。これは図 1 に示した定量 RT-qPCR による Krt42 遺伝子発現強度の比較結果と矛盾しないが、今後蛍光染色法などで定量・確認する必要がある。これらの結果から、作製した抗 Krt42 抗体は組織染色でも使用可能であることが判明した。また、上述の通り Krt42 陽性反応は細胞質よりも核に顕著であったことから、KRT42 は細胞骨格以外の機能を有する可能性が示唆された。

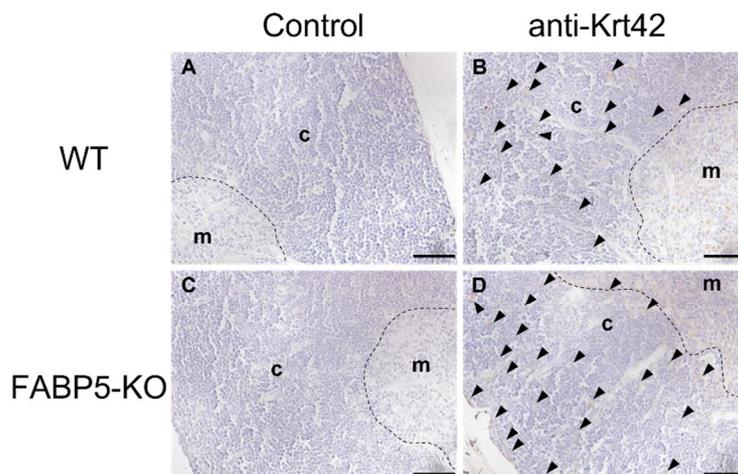


図 9 野生型および FABP5-KO マウス胸腺の抗 Krt42 抗体染色像
Control: 2 次抗体のみ、c: 皮質、m: 髄質、矢頭: Krt42 陽性細胞。Bar = 50 μ m

この他、FABP5 が関係するシグナル伝達系による Krt42 遺伝子の発現制御が行われているか否かを調べるため、Krt42 遺伝子の 5' 上流領域をクローニングし Luc アッセイで転写制御領域と転写因子の探索を行う必要があるが、この実験については諸般の事情により遅れており、本報告書作成時点で実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------