

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06866

研究課題名(和文) 表皮水疱症関連タンパク質Exophilin-5における細胞接着装置の制御機構

研究課題名(英文) Molecular regulation of cell adhesion machinery by epidermolysis bullosa-associated protein Exophilin-5

研究代表者

松永 耕一 (Matsunaga, Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

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)：Exophilin-5の表皮細胞での役割とその分子メカニズムを解析するため、特異的に結合するタンパク質の探索を行い、細胞接着に関わるタンパク質が複数同定された。それら新規結合タンパク質の解析を行い、ヘミデスモソーム形成だけでなく、他の接着装置形成についても機能していることがわかった。さらにExophilin-5の欠損により、ヘミデスモソームや、他の接着装置形成が阻害され、細胞接着能は低下した。ノックアウトマウスの皮膚における創傷治癒試験を行ったところ、創傷治癒に遅延がみられた。これらにより、Exophilin-5は細胞接着装置の恒常性維持において重要な役割を持っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮水疱症は、重篤な先天性疾患であり、日常生活が著しく制限され、未だに対症療法しかない難病である。Exophilin-5は単純型表皮水疱症の原因遺伝子として同定されたが、その詳細な作用機序はほとんどわかっていなかった。本研究により、Exophilin-5が複数の細胞接着装置構成タンパク質と相互作用し、細胞接着装置の恒常性維持において重要な役割を持っていることが示されたことにより、単純型表皮水疱症の治療において重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of Exophilin-5 in epidermal cells and its molecular mechanism, we have searched for specific binding proteins of Exophilin-5 and several proteins involved in cell adhesion were identified. Analysis of these novel binding proteins revealed that Exophilin-5 functions not only in hemidesmosome formation but also in the formation of other adhesion machinery. Furthermore, deletion of Exophilin-5 inhibited hemidesmosome and other adhesion machinery formation and reduced cell adhesion ability. We examined wound healing assay in knockout mouse skin and the wound healing of knockout mice was delayed compared with wild-type mice. These results indicate that Exophilin-5 plays an important role in the homeostasis of the cell adhesion machinery.

研究分野：細胞生物学

キーワード：表皮水疱症 Exophilin-5 Rab27 調節性分泌 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、外界に接する側より、表皮、真皮、皮下組織で構成され、表皮と真皮の間には表皮基底膜と呼ばれる、ラミニン 332 や IV 型コラーゲン等で構成された細胞外マトリックスの薄い膜構造が存在する。最下層にある基底細胞は、ヘミデスモソームと呼ばれる細胞接着装置を構成する、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ や XVII 型コラーゲンが、基底膜のラミニン 332 と結合することにより、強固に固定されている。また、細胞間はデスモソームやアドヘレンスジャンクション(接着結合)によって結合し、その結果強固な表皮構造が形成される。表皮水疱症は、先天的に皮膚が脆弱で、生後早期から、わずかな外力で全身に水疱、びらん¹⁾の形成が起こる遺伝性疾患である。重症化すると日常生活が著しく制限され、未だに対症療法しかない難病である。機械的刺激により生じる裂隙の形成部位により、病型が分かれ、基底細胞内に裂隙を生じるものを単純型と呼び、その原因遺伝子の一つ、ケラチン 5 と 14 は、ヘテロダイマーを形成し、トノフィラメントと呼ばれる細胞骨格を構成し、基底細胞を基底膜につなぎとめる役割をしているヘミデスモソームにつらなっており、その線維変性は、基底細胞の脆弱化を引き起こす。他、BP230 やプレクチンの変異でも、この単純型を引き起こす。また、ラミニン 332、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 、XVII 型コラーゲンの変異では、接合部型と呼ばれる表皮水疱症を引き起こすことが知られている。このように、表皮水疱症の多くは、ヘミデスモソームを中心として構成されるタンパク質の変異によって起きる。近年それとは全く別のタイプである、Exophilin-5 遺伝子の異常が単純型表皮水疱症を引き起こすことが示された (McGrath et al., *Am. J. Hum. Genet.* (2012))。

Exophilin-5 は、細胞内小胞を細胞膜に融合させて、細胞膜や細胞外に生理活性分子や細胞膜タンパク質等を供給する、調節性分泌経路を制御する単量体 GTPase Rab27 (Rab27a と Rab27b がある) のエフェクタータンパク質として発見された、Exophilin (エキソフィリン) ファミリーの一つである (Izumi et al., *Cell Struct. Funct.* (2003))。Exophilin-5 は、2000 近いアミノ酸数から成る巨大なタンパク質であるが、Rab27 結合領域以外に明らかな機能ドメインは知られておらず、その作用機序はわかっていない。調節性分泌経路とは、生理活性分子や細胞膜タンパク質等を、外的刺激に応じて細胞外、細胞膜に輸送する経路であり、厳密に制御されている。細胞内小胞輸送 (メンブレントラフィック) に機能する単量体 GTPase であり、60 種程度存在する Rab ファミリーの中で、Rab27 は 10 種以上のエフェクターとそれぞれ結合して、調節性分泌経路を制御する。そのエフェクターの一つである Exophilin-5 は、その遺伝子変異が常染色体劣性遺伝性の表皮水疱症を引き起こすことが報告されているが、具体的な機能や作用機序はほとんどわかっていない。これまでにヒト表皮水疱症における Exophilin-5 遺伝子変異は、数例報告されているが、遺伝子変異と患者の症候の記述がほとんどであり、分子機能にまで迫る例はない。細胞生物学的なものでは、HeLa 細胞でのノックダウンにより、エキソソームの分泌が抑制されるという報告 (Ostrowski et al., *Nat. Cell. Biol.* 2012) があるが、この研究では、抗体などで内在性 Exophilin-5 タンパク質を確認しておらず、タンパク質の解析はほとんど行われていない。近年、表皮ケラチノサイトと Exophilin-5 の関係が報告されたが (Bare et al., *J. Invest. Dermatol.* 2020)、ケラチノサイトの接着と遊走の減弱が、Exophilin-5 のエキソソーム分泌制御系と関係があるだろうという報告だけであり、分子機構解明には遠く及ばないのが現状である。

本研究を遂行することにより、表皮水疱症病態生理解明だけではなく、皮膚組織の恒常性維持の基となる、基底細胞の生理機構を解明する可能性を考えた。また、異なる細胞接着系それぞれが機能するのではなく、Exophilin-5 を介した未解明の機能関連システムが存在する可能性も考え、ノックアウトマウスとケラチノサイト細胞株の両面で行われる本研究の成果を期待した。

2. 研究の目的

本研究では、調節性分泌経路を制御する Rab27 エフェクターの一つである、Exophilin-5 による新たな細胞接着装置制御機構の解明をすることにより、表皮水疱症の病態生理における新しい知見を得ると共に、表皮形成の恒常性維持の仕組みを明らかにすることである。

3. 研究の方法

3-1 プルダウン法による、新規 Exophilin-5 結合タンパク質の同定

現在、Exophilin-5 が結合活性を示す分子として、GTP 結合型 (活性化型) Rab27 のみが知られている。しかしこれら相互作用のみでは、どのようなメカニズムで表皮水疱症に関与しているかを説明するのは難しく、さらに機能未知の領域もあることから、他にも結合パートナーが存在することを予想し、新規結合タンパク質の探索を行った。方法は Exophilin-5 の N 末に Strep-Tactin-tag を付与したタンパク質を発現するアデノウイルスを作成し、それを A549 ヒト肺胞基底上皮細胞に感染させ、Strep-Tactin-tag を利用したプルダウン法により行った。

3-2 複合体解析

新規 Exophilin-5 結合タンパク質候補群を、それぞれの特異抗体を用いたウエスタンブロット法にて結合の確認を行った。

3-3 shRNA 発現レンチウイルスによる、Exophilin-5 安定ノックダウン HaCaT 細胞の作製

HaCaT ヒトケラチノサイト細胞株に対して、レンチウイルス感染による安定的 shRNA 発現を用いた RNAi による、Exophilin-5 ノックダウンを行った。その後免疫染色法によるヘミデスモソームやデスモソーム、アドヘレンスジャンクション形成を観察した。

3-4 CRISPR/Cas9 法による Exophilin-5 ノックアウト HaCaT 細胞の作製

gRNA 及び Cas9 発現レンチウイルスを作成し、HaCaT ヒトケラチノサイト細胞株に感染させ、その後単一細胞をクローン化して Exophilin-5 の発現がノックアウトされている細胞を単離した。その後ノックダウン細胞で行われた同様の実験を行った。

3-4 ヘミデスモソーム、デスモソーム、アドヘレンスジャンクション形成の観察と Exophilin-5 の局在観察

Exophilin-5 およびその結合たんぱく質の細胞内局在を、A549 ヒト肺胞基底上皮細胞及び HaCaT ヒトケラチノサイト細胞株に対して調べた。方法はそれぞれの特異抗体を用いた間接蛍光抗体法と、Strep-Tactin-tag を付与した Exophilin-5 を発現させるアデノウイルスを感染させ、その後 tag を認識する抗体を用いた方法を用いた。

3-5 Exophilin-5 ノックアウトマウスの解析

Exophilin-5 ノックアウトマウスを作成し、マウス背部の円形皮膚全層欠損創による創傷治癒アッセイを行った。

4. 研究成果

研究代表者は、なぜ Exophilin-5 の欠損が単純型表皮水疱症を引き起こすのか、その分子機構の手がかりを得るため、Exophilin-5 に特異的に結合するタンパク質の網羅的探索を行った。その結果、ヘミデスモソームやデスモソームを構成するたんぱく質群に加え、アドヘレンスジャンクションを構成するたんぱく質を同定し、さらにこれまでにあまり機能のわかっていないケラチン結合タンパク質の一つを同定した(図1)。これらと Exophilin-5 との結合は、平常な細胞接着装置形成に機能する可能性が示唆された。

次に Exophilin-5 の表皮細胞での役割とその分子メカニズムを解析するため、shRNA 発現レンチウイルスによる、Exophilin-5 安定ノックダウン HaCaT 細胞、及び CRISPR/Cas9 系を用いて Exophilin-5 ノックアウト細胞を樹立した。Exophilin-5 ノックアウト細胞では、ノックダウン細胞での解析結果と同様に、細胞接着能は低下し、細胞遊走能は逆に促進することを確認した。

ケラチノサイトは、カルシウム濃度の変化によって角化細胞への分化が制御されており、低(30 μ M)・高(2.8mM)カルシウム濃度での接着装置の形成が変化する、カルシウムスイッチと呼ばれる機構が存在する。低カルシウム濃度では基底細胞様の形態を示し、ヘミデスモソームを多数形成する。一方で高濃度カルシウム濃度ではヘミデスモソームは著しく減少し、代わりにデスモソームやアドヘレンスジャンクションの細胞膜上への形成が促進される。それぞれの条件下で、Exophilin-5 KO HaCaT 細胞を観察したところ、低カルシウム濃度での、ヘミデスモソームマーカーであるインテグリン 6 やインテグリン 4 の抗体を用いた細胞染色を行い、細胞内局在を調べたところ、通常の細胞とは異なる

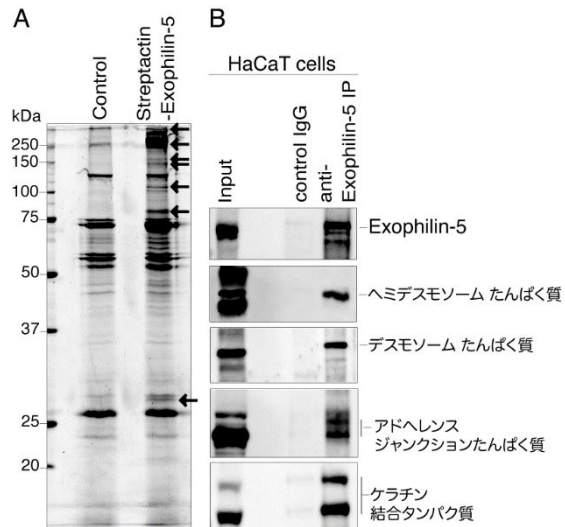


図1:A. Exophilin-5 結合タンパク質の探索。矢印は特異的バンド。

B. Exophilin-5 抗体による免疫沈降実験と、イムノプロットの図。

Exophilin-5ノックアウトケラチノサイトでは、ヘミデスモソーム形成が著しく減少する

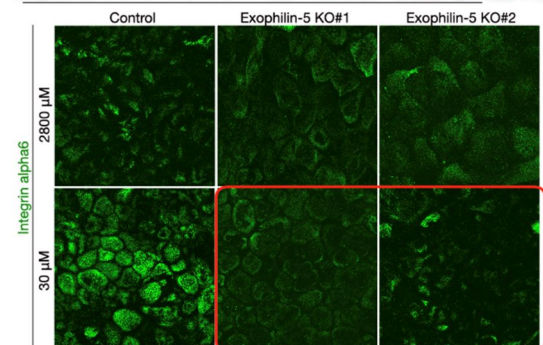


図2: Integrin 6 染色によるヘミデスモソームの観察。

り、Exophilin-5 ノックアウト細胞では、ヘミデスモソーム形成が著しく減少していることがわかった(図2)。さらに新規 Exophilin-5 結合タンパク質の知見から、デスモソーム形成やアドヘレンスジャンクション形成においても機能する可能性を考え、高カルシウム濃度下で、デスモソームマーカーであるデスモブラキン3や、アドヘレンスジャンクションマーカーである E-カドヘリンの抗体による細胞染色を行い、細胞内局在を調べたところ、これらの形成においても阻害されていることがわかった(図3、図4)。これらの知見から、Exophilin-5 は表皮ケラチノサイトが基底細胞から角化細胞へと分化していく過程の中で、必要な接着装置の機能発現をスイッチさせる機能がある可能性が考えられた。

次に Exophilin-5 の細胞内局在を調べた。Strep-Tactin-Exophilin-5 発現アデノウイルスを HaCaT 細胞に感染させ、その後 Strep-tag 抗体と、各種マーカー抗体を用いた共染色を行ったところ、Exophilin-5 は後期末ソーム・リソソームに局在することが分かった。さらに各種細胞接着装置マーカーと共局在した。

次に Exophilin-5 ノックアウトマウスを用いた実験を行った。マウス皮膚における創傷治癒試験を行い、野生型と Exophilin-5 ノックアウトマウスを比べたところ、ノックアウトマウスでは創傷治癒に遅延がみられた(図5)。これらの結果より、Exophilin-5 は細胞接着装置の恒常性維持において重要な役割を持っていることが示された。

Exophilin-5ノックアウトケラチノサイトでは、デスモソーム形成が減少する

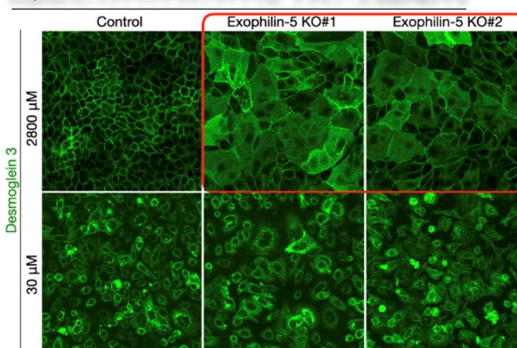


図3:Desmoglein3 染色によるデスモソームの観察。

Exophilin-5ノックアウトケラチノサイトでは、アドヘレンスジャンクション形成が減少する

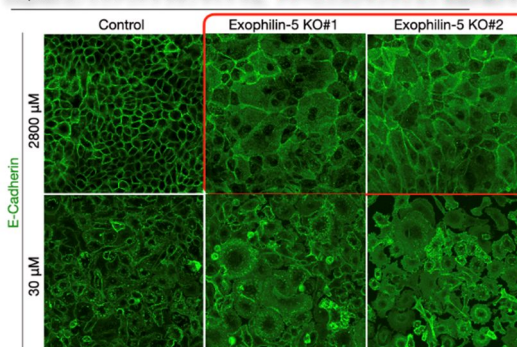


図4:E-cadherin 染色によるアドヘレンスジャンクションの観察。

Exophilin-5の欠損は皮膚の創傷治癒を遅延させる (Exophilin-5 KO マウス)

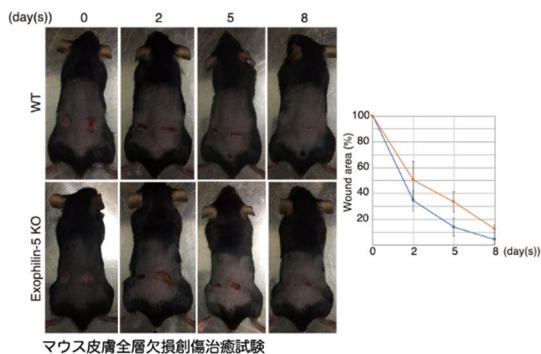


図5:Exophilin-5 KO マウスの皮膚全層欠損創傷による創傷治癒アッセイ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kunli Zhao, Kohichi Matsunaga, Kouichi Mizuno, Hao Wang, Katsuhide Okunishi, and Tetsuro Izumi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional hierarchy among different Rab27 effectors involved in secretory granule exocytosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.82821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takafumi Tozawa, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Naotake Shigehisa, Takamasa Uekita ¹ , Masato Taoka, Tohru Ichimura.	4. 巻 -
2. 論文標題 Ubiquitination-coupled liquid phase separation regulates the accumulation of the TRIM family of ubiquitin ligases into cytoplasmic bodies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saegusa K, Matsunaga K, Maeda M, Saito K, Izumi T, Sato K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Cargo receptor Surf4 regulates endoplasmic reticulum export of proinsulin in pancreatic cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03417-6	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 Miao-Miao Zhao., Jing Lu, Sen Li., Hao Wang., Xi Cao., Qi Li., Ting-Ting Shi., Kohichi Matsunaga., Chen Chen., Haixia Huang., Tetsuro Izumi., and Jin-Kui Yang.	4. 巻 29
2. 論文標題 Berberine is an insulin secretagogue targeting the KCNH6 potassium channel.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26635-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松永耕一、石崎玲、泉哲郎
2. 発表標題 Exophilin-5は、皮膚角化細胞において複数の細胞接着分子の輸送を制御する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 一般演題
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永耕一、本田香織、近藤 恭光、長田裕之、泉哲郎、白川純
2. 発表標題 ケミカルライブラリから同定された新規インスリン分泌促進化合物の作用機構解明
3. 学会等名 第37回糖尿病肥満動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 王暉子、松永耕一、小野正人、井上亮太、都野貴寛、寺内康夫、白川純
2. 発表標題 FGF21による膵 細胞保護作用の解析
3. 学会等名 第37回糖尿病肥満動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 趙クンリ、松永耕一、水野公一、王昊、奥西勝秀、泉哲郎
2. 発表標題 複数のRab27エフェクターExophilinsが制御する、インスリン顆粒開口放出機構
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 一般演題
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三枝慶子, 松永耕一, 前田深春, 斎藤康太, 泉哲郎, 佐藤健
2. 発表標題 インスリン分泌経路における積み荷受容体Surf4の機能解析
3. 学会等名 第7回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------