

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791274

研究課題名(和文) 脂腺細胞の新規分泌膜小胞セボゾームの生成、分泌機構の解明

研究課題名(英文) Structure of Sebosomes, secret membrane vesicles of cultured sebocytes

研究代表者

永井 彩子 (Nagai, Ayako)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(特定教員)

研究者番号：90420562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ラット培養脂腺細胞は、細胞内でセボゾームを生成し、細胞外へ遊離した。セボゾームは、エンドソーム、リソソーム、脂質顆粒、脂質ラフト等の複数の膜系及び、エクソソームのマーカー蛋白質を含有していた。細胞膜および、種々の内膜系を含む複合膜系と考えられ、エクソソームとは異なる分泌機構が示唆された。また、セボゾームにはセボゾーム生成中に合成された蛋白質、抗菌効果が期待できる数種類のヒストン蛋白質が検出され、更に脂腺細胞から脂質などの分子を周辺細胞へと供給および移送する機能も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rat cultured sebocytes synthesized and secreted sebosomes. The sebosomes contained multiple subcellular organelles such as exosomes, plasma membrane, endosomes, lysosomes, lipid particles and lipid rafts, suggesting that the secretory mechanism of the sebosomes was different from that of exosomes. Newly synthesized proteins including histones were detected both in the de novo synthesized sebosomes and nuclei in cultured sebocytes. It was suggested that the organelles were continuously and actively localized to the sebosomes. The sebosomes were suggested to supply multiple molecules, lipids and proteins to keratinocytes and surrounding cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：セボゾーム 脂腺細胞 ヒストン 抗菌 分泌膜小胞

## 1. 研究開始当初の背景

全身の皮膚表面に分布する皮脂腺は、スクアレンやワックスエステルを含む多量の皮脂を皮膚表面に分泌する。Zouboulis らは株化ヒト脂腺細胞で、ステロイドホルモンの合成を行うことを示して、皮脂腺を末梢の内分泌器官と位置づけた (J Invest Dermatol 2000)。皮脂 sebum は、スクアレン、ステロールの他に抗酸化活性を持つビタミン E を含むことが報告されているが、皮膚でのビタミン E 濃度が皮膚表面に近いほど濃度が高いことから、ビタミン E が分泌された皮脂から供給されていると示唆されている (Shibata ら、Proc Natl Acad Sci USA 2001)。ビタミン E の担体でもあるスクアレン結合蛋白質が、皮脂腺組織で発現していることも示された (Thiele ら、J Invest Dermatol 1999)。皮脂中に抗菌蛋白質のディフェンシン (BD) が含まれ、脂肪酸添加により BD-2 の発現が促進されることが報告された (Nakatsuji ら、J Invest Dermatol 2010)。また皮脂中に含まれる 1 価不飽和脂肪酸のパルミトオレイン酸、sapienic acid に抗菌活性があり、皮脂の主成分であるスクアレンには真菌の接着抑制効果があると報告されている (Ge ら、J Invest Dermatol 2003、Drake ら、J Lipid Res 2007、Wille ら、Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2003)。皮脂の分泌量は約 2g/日 (成人) に及ぶといわれており、皮膚表面の保湿や皮膚の恒常性維持、感染等からの防御などの機能を持つと考えられている。

申請者らは、ラットの初代培養脂腺細胞や、ハムスターの皮膚から分離した株細胞が分泌する、脂質顆粒を含む特異的な分泌膜小胞「セボゾーム」を発見した (申請者ら命名、直径 1-10  $\mu\text{m}$ : 2005 年 Endocrinology)。申請者らは、セボゾームが皮脂の主成分であるスクアレンと、抗菌活性を持つヒストン H3 を濃縮していることを明らかにした。セボゾームの分泌調節の分子機構を明らかにし、こ

れを活性化すれば、皮膚・全身の代謝改善、健康増進に効率的に役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、同セボゾームの生成・分泌機能を解析し、また同機能を活性化する天然分子や添加物を探索・特定して、皮膚・全身の健康増強・促進を目的とする。

### (1) セボゾームへの蛋白質局在化機構とセボゾーム生成機構の解明

蛍光オルガネラトレーサー、蛍光脂質トレーサー、蛍光蛋白質融合蛋白質によるセボゾームへの蛋白質局在化のタイムラプス観察、LC-MS/MS により得られた構成蛋白質を用いたセボゾーム構成蛋白質の局在・機能の解析、

### (2) 培養脂腺細胞での細胞内カルシウム濃度変化の測定と、セボゾーム生成機構の検討

### (3) 解明したセボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索とその作用メカニズムの解析

### (4) セボゾームの周辺細胞への物質運搬機能の解明

## 3. 研究の方法

### (1) セボゾームへの蛋白質局在機構とセボゾーム生成機構の解明

脂腺細胞は EGF 添加 DMEM で培養維持した。脂質ラフトは cholera toxin B-Alexa Fluor 555 conjugate を、lysosomes は LysoTracker を、細胞膜は wheat germ agglutinin-CF488 conjugate、CellMask Orange Plasma membrane stain を、それぞれ培養液に添加し、各々の細胞内の蛍光の局在をライブ観察、タイムラプス観察した。新規合成蛋白質の代謝ラベルには Click-iT® AHA (L-azidohomoalanine) (Life Technologies) を用いた。

LC-MS/MS により得られたセボゾーム構成蛋白質及び同蛋白質に関連する蛋白質を用い、セボゾーム構成蛋白質の局在・機能の解析を行った。小胞輸送に関連する蛋白質 Rab4、Rab5、Rab18、CD63 の分布および、ヒストン H1、H2B、H3、H4 の分布を、脂腺細胞を固定した後、蛍光免疫染色法で検出した。1 次抗体は抗ヒストン (H1、H2B、H3、H4)ウサギ抗体、抗 Rab4、抗 Rab18 ウサギ抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 Rab5 マウス抗体 (BD Transduction)、抗 CD63 ウサギ抗体 (SantaCruz biotechnology, inc.)、2 次抗体は AlexaFluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies)、CF555 標識ロバ抗マウス抗体 (Biotium) を用いた。

(2) 培養脂腺細胞での細胞内カルシウム濃度変化の測定と、セボゾーム生成機構の検討  
細胞内カルシウムインジケータの導入条件、観察条件の検討を進めた。

(3) 解明したセボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索とその作用メカニズムの解析

セボゾームの生成・分泌を促進すると考えられる因子の作用メカニズムについて、これまでの研究成果からセボゾームに局在することが明らかになった蛍光トレーサーをマーカーとして用い、検討した。

(4) セボゾームの周辺細胞への物質運搬機能の解明

EGF 添加培地で培養維持した脂腺細胞の培養液に、蛍光脂肪酸 (FA)、蛍光コレステロール (Chol)、蛍光標識 cholera toxin subunit B (CT)、DiI をそれぞれ添加した。その後、生成された標識分子を持つセボゾームを単離した。これをヒト角化株細胞、HaCaT 細胞の培養液に添加し、細胞内への蛍光分子の移行を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) セボゾームへの蛋白質局在化機構とセボゾーム生成機構の解明

セボゾームの生成・分泌機構を検討する目的で、種々の細胞膜小胞のマーカーを解析した。その結果、脂腺細胞に添加した各マーカー分子は、生成後分泌されたセボゾーム膜に局在が認められた。また、セボゾームには Rab4、Rab5、Rab18、CD63 など種々の膜系のマーカーおよび、エクソソームのマーカー蛋白質を含有していた。以上より、セボゾームは細胞膜および、種々の内膜系を含む複合膜系と考えられ、開口分泌で分泌されるエクソソームとは異なる分泌機構が示唆された。

セボゾームへの物質の局在化を検討するため、セボゾームへの新規合成蛋白質とヒストン蛋白質の局在などを検討した。抗ヒストン H1、H2B、H3、H4 抗体により、それぞれ、脂腺細胞の核及び、セボゾームが染色された。セボゾーム生成中および生成後に Click-iT<sup>®</sup> AHA でラベルされた、新規合成蛋白質の蛍光シグナルは、脂腺細胞の細胞質、核とセボゾームに検出された。これまでの質量 (MS) 解析などの研究結果から示唆されていた、セボゾーム画分の数種類のヒストン蛋白質が、今回の染色の結果からも確認出来た。セボゾーム生成中も、脂腺細胞は蛋白質合成を盛んに行い、セボゾームにも局在化することから、セボゾームの活発な合成、分泌機構が示唆された。

(2) 培養脂腺細胞での細胞内カルシウム濃度変化の測定と、セボゾーム生成機構の検討  
申請者は既知の分泌機構の性質と予備実験の結果から、セボゾーム分泌機構にも細胞内カルシウムイオン濃度変化が関与していると考えた。分泌に関する細胞内カルシウムの作用機構はいくつか知られているものが有

り、それらの機構がセボゾーム分泌に関与しているかどうかの検討を進めた。また、低分子カルシウムインジケーターの導入、測定条件も考えられるカルシウム調節機構のそれぞれに合わせて変更、調節が必要であった。更に次年度以降も検討を進める予定である。

### (3) 解明したセボゾーム分泌機構を促進・阻害する因子の探索とその作用メカニズムの解析

本研究により、セボゾームの生成・分泌に関わる因子を数種類発見し、その作用メカニズムについて検討を進めた。遺伝子や蛋白質レベルでの発現調節等、更に詳細な検討を進めている。

### (4) セボゾームの周辺細胞への物質運搬機能の解明

分泌後のセボゾームの脂腺細胞外での機能を検討する目的で、あらかじめ蛍光標識したセボゾームを用いて、セボゾームから周辺細胞画分への標識分子の局在化を検討した。その結果、各種蛍光標識分子は、分泌されたセボゾーム画分に局在し、これらは HaCaT 細胞の培養液中に添加すると、HaCaT 細胞に取り込まれ、細胞内へと取り込まれた。FA、Chol、CT、DiI はいずれも、主に核周囲の脂肪滴に移行して局在した。以上より、セボゾームは、種々の細胞膜系を含有する複合膜系である事が示唆された。また、脂腺細胞から脂質などの分子を、HaCaT 細胞などの周辺細胞へと供給および移送する機能が示唆された。

以上のように、セボゾームの生成分泌機構は、は既知の分泌膜小胞とは異なる、特異的な分泌機構であることが、本研究により明らかになった。また、周辺細胞への抗菌性を持つ蛋白質や皮脂成分を含む脂質顆粒の供給機能を有することが示唆されるなど、その生理的意義の解明も大きく進展したと考えられる。

従来、皮脂は細胞が崩壊した結果、分泌されると説明されていたが、セボゾームは細胞死を伴わない新しい皮脂成分の分泌経路と考えられる。本研究は、皮膚の代謝調節や保湿効果増強の一つの経路として、セボゾームの分泌調節の実用化へ大きく寄与したと考えられる。

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

永井 彩子、澄田 道博、

Histones in the Sebosomes, the secretory membrane vesicles of sebocytes.

2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日、第 36 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、兵庫県神戸市

永井 彩子、澄田 道博、

Components of Sebosomes, membrane vesicles of sebocytes.

2012 年 12 月 11 日～12 月 14 日、第 35 回日本分子生物学会年会、ワークショップ口頭発表、福岡県福岡市

永井 彩子、澄田 道博、

Components of Sebosomes, membrane vesicles of sebocytes.

2012 年 12 月 11 日～12 月 14 日、第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、福岡県福岡市

永井 彩子、澄田 道博、

Function of Sebosomes in Sebocytes  
“ Supply Molecules to Surrounding Cells ”  
the secretory membrane vesicles of sebocytes.

2011 年 12 月 15 日、第 34 回日本分子生物学会年会、口頭発表、神奈川県横浜市

永井 彩子、澄田 道博、  
培養脂腺細胞の分泌膜小胞セボゾームの機能-周辺細胞への分子の供給  
2011年12月15日、第34回日本分子生物学会年会、ポスター発表、神奈川県横浜市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 彩子 (Nagai, Ayako)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(特定教員)

研究者番号: 90420562

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし