

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890082

研究課題名(和文)プロフィラグリンC末端領域の機能解析：プロセッシングにおける分子機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of human profilaggrin C-terminus region: Identification of molecular mechanism in profilaggrin processing

研究代表者

坂部 純一 (Sakabe, Jun-ichi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30631494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：プロフィラグリン(FLG)の分解産物であるフィラグリンモノマーは、表皮バリア機能において重要な分子である。最近、遺伝子変異によりFLGのC末端領域が欠損する蛋白を有するヒトでは、フィラグリンモノマーの産生が著しく低下することが明らかとなった。そこで我々は、C末端領域がFLGのプロセッシングに及ぼす影響を検討した。その結果、1) FLGのC末端領域の突然変異は、mRNAや蛋白発現に影響しないことを示すデータを得た。従って、C末端領域は、FLGのプロセッシングに影響を及ぼすと考えられる。さらに、2) 質量分析によりFLGのC末端領域と相互作用するガレクチン7などの候補分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Filaggrin monomers are produced through profilaggrin (FLG) processing, and they are considered to be crucial in epidermal barrier function. Recently, lack of FLG C-terminus region in filaggrin gene mutation carriers was shown to be associated with significant reduction in filaggrin monomer production. To this end, we sought to evaluate the function of FLG C-terminus region in FLG processing. 1) Three types of C-terminus expression vectors were constructed, and these constructs were transfected to COS-7 cells followed by RT-PCR and Western blot analysis. 2) By pull-down assay using FLG C-terminus protein, molecules with interacting potential were searched. As result, 1) deletion of FLG C-terminus region did not alter the FLG mRNA/protein expression, suggesting that FLG C-terminus region is possibly involved in the processing of FLG, and not with the production of FLG itself. 2) Candidate proteins that interact with FLG C-terminus region were identified, such as galectin-7, etc.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：C末端領域の機能 C末端領域結合タンパク

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の発症には、皮膚バリア機能の異常が病因の一つとして関わっている。バリア機能を担う重要なタンパク質の一つとして、プロフィラグリンがある。プロフィラグリンは化学的消化を経て複数のフィラグリンモノマーに分解される。フィラグリンモノマーは、保水を始めとして角層機能を維持する働きがある。アトピー性皮膚炎の症例では、フィラグリン遺伝子 (*FLG*) に突然変異を有する場合がある。フィラグリンを対象とした分子疫学研究より、日本人の約 20-30% および欧米人の約 40% で、フィラグリン遺伝子に突然変異を有することが報告された。

FLG はプロフィラグリンをコードし、その産物は約 460kDa を成す巨大分子である。*FLG* の突然変異の多くがナンセンス変異で、これまでに 27 箇所同定されている。突然変異が挿入されている位置は、フィラグリンのリピード領域が主である。変異をもつ *FLG* からは、不完全プロフィラグリンが産生される。しかし、プロフィラグリンのプロセッシングは阻害され、フィラグリンモノマー (37kDa) は僅かに合成されるか、あるいは全く産生されない。さらに最近、アトピー性皮膚炎の患者で C 末端領域におけるナンセンス変異 (K4022X) が同定された (Nemoto-Hasebe I et al. *Br J Dermatol.* 2009)。興味深いことに、この症例では表皮顆粒層に不完全プロフィラグリンが発現しているものの、フィラグリンモノマーが全く産生されないか、あるいは僅かにしか作られない。従って、C 末端領域はプロフィラグリンが正常なプロセッシングを経る上で、極めて重要な要素であると考えられる。しかし、プロフィラグリン C 末端領域の機能は不明であり、学術的な報告が全く存在しない。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚バリア機能において重要な因子であるプロフィラグリンの成熟機構を解明し、C 末端領域の機能を明らかにすることを目的とした。アトピー性皮膚炎の発症の一因として、皮膚バリア機能関連分子であるフィラグリン遺伝子 (*FLG*) の突然変異が同定されている。フィラグリンは皮膚表皮の顆粒層から角層に至る過程で、その前駆体であるプロフィラグリンが酵素によるプロセッシングを受け産生される。申請者は、プロフィラグリンの切断酵素の一つとしてカリクレイン 5 を同定した (Sakabe J et al. *J Biol Chem.* 2013)。そこで本研究課題は、プロフィラグリンの C 末端領域に着目し、この C 末ペプチドがカリクレイン 5 をはじめとする酵素の認識部位であることを示す。すなわち、本申請課題の目的は、プロフィラグリンの C 末ペプチドがフィラグリンモノマーを産生するプロセッシングに必須の働きを持つことを示すことである。この研究成果は、アトピー性

皮膚炎に見られるバリア機能異常の一端を解明する可能性があり、治療の基盤を創出する上で極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) 野生型及び変異型プロフィラグリン C 末領域発現ベクターを構築する。構築したベクターは、ほ乳類細胞発現用である。従って、正常ヒト表皮角化細胞などにリポフェクション法により遺伝子導入する。その後、cell lysate を回収し、real-time 定量的 RT-PCR 法により mRNA の発現を評価する。さらに、Western blot 法により、発現タンパクを評価する。プロフィラグリン C 末端領域タンパクの発現は、フィラグリン・リピードを認識するモノクローナル抗体 (クローン名: AKH-1) あるいは我々が作成した C 末端領域を認識する抗体 (Sakabe J et al. *J Biol Chem.* 2013)。を用いて確認する。以上より、野生型及び C 末ペプチド変異型タンパクは、同等に発現することを確認する。以上の実験により、プロフィラグリン C 末領域の突然変異が、タンパク発現に影響しないことや C 末領域がプロフィラグリンのプロセッシングに何らかの機能を有することが証明出来る。

(2) 次に、野生型及び変異型 (Δ C) プロフィラグリン C 末端領域に Flag-tag を融合した哺乳類細胞発現コンストラクトを構築する。構築したベクターを、episomal expression が可能な細胞株 293EBNA へ、Lipofectamin2000 試薬を用いてトランスフェクションする。細胞は無血清培地で培養し、48 時間後、培養上清から発現タンパクを抽出する。方法は、Flag-tag に対するアフィニティー精製に基づき、N 末端に存在する Flag-tag に対する抗体を吸着した ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma) と培養上清を反応させる。反応後、目的のタンパクを洗浄・溶出の過程を経て精製する。精製には FLAG Immunoprecipitation kit (Sigma) を使用する。各タンパクを精製し、野生型タンパクのプロセッシングは KLK5 によって進むことを確認する。一方、変異型 (Δ C) タンパクのプロセッシングは阻害されることを示し、C 末ペプチドが KLK5 の認識部位であることを同定する。方法は、ブルダウンアッセイにより行い、タンパクの検出は、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色あるいは Western blot 法により評価する。

4. 研究成果

(1) プロフィラグリン C 末領域の突然変異は、mRNA やタンパク発現に影響しないことを示すデータが得られた (図 1)。さらに追加実験により、K4022X 変異が mRNA やタンパク発現に影響を及ぼさないことも明らかとなった (図 1)。従って、C 末端領域はプロフィラグリンのプロセッシングに重要な機能を有することが考えられる。

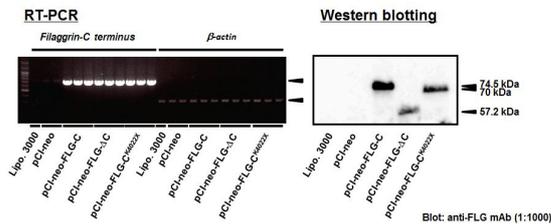


図1 3種類のフィラグリンC末端領域発現ベクターを導入したCOS-7細胞におけるmRNAおよび蛋白の発現

完全なフィラグリン C 末端領域を含むベクター (pCIneo-FLG-C)、C 末端領域を欠損するベクター (pCIneo-FLG-ΔC)、C 末端領域に変異(K4022X)を挿入したベクター (pCIneo-FLG-C^{K4022X}) の3種類を Lipofectamine3000 (Life Technologies 社) 遺伝子導入試薬を用いて、COS-7 細胞へ導入した。その後、RT-PCR 法では、センスプライマー: 5'-Tgg gCA ggT gTC CAC TCC-3'、アンチセンスプライマー: 5'-Cgg CTC TgT CTT CgT gAT ggg ACg T-3'を用いて mRNA の発現を確認した。Western blot 法では、タンパクを検出するために、マウス抗ヒト FLG モノクローナル抗体(クローン名: AKH1) (1:1000, サンタクルーズ社)を使用した。

(2) 当初の予定では、C 末ペプチドが KLK5 の認識部位であることを同定することを目的として、実験を進める予定であったが、他の分子が C 末端領域を認識する可能性も考慮し、網羅的な解析が行えるように実験系を構築した。最初に、手術により採取されたヒトの余剰皮膚より細胞溶解緩衝液を用いてタンパクを抽出した。ヒト皮膚組織の使用に関して、浜松医科大学医の倫理委員会において承認を得た。次に、N 末端側に Flag-tag を標識した完全なフィラグリン C 末端領域を含むベクター (pCEP-Pu-Flag-FLG-C)、C 末端領域を欠損するベクター (pCEP-Pu-Flag-FLG-ΔC) を構築した (図2)。

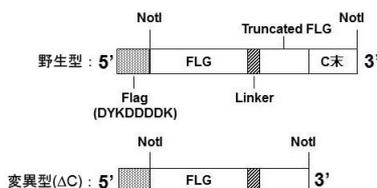


図2 変異型(ΔC)及び野生型フィラグリン C 末端領域発現ベクター: Flag-tag による標識

発現タンパク精製用に用いる Flag-tag vector の構築を示す。

構築した2種類のベクター (図2) を episomal expression が可能な細胞株 293EBNA 細胞へ、Lipofectamin2000 試薬を用いてトランスフェクションした。細胞を無血清培地で培養し、48時間後、目的のタンパクを含む培養上清を回収した。回収した培養上清を N 末端に存在する Flag-tag に対する抗体を吸着した ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma 社) と反応させた。さらに、ヒト皮膚表皮より抽出したタンパクと反応させ、フィラグリン C 末端領域と高親和性

を示す候補タンパクを単離した (図3)。

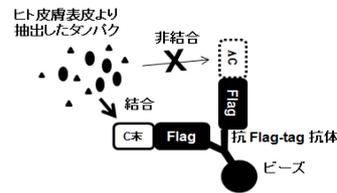


図3 Flag-FLG-C および Flag-FLG-ΔC タンパクをプローブとしたプルダウンアッセイ

最後に、単離したタンパクをトリプシン消化し、消化産物のカラム精製を行った後、LC/MS/MS 解析 (質量分析) によりフィラグリン C 末端領域と高親和性を示す幾つかの候補分子を同定した (表1)。

表1 フィラグリンC末端領域と高親和性を示す候補タンパク

Accession no.	Description	C	ΔC
P47929	Galectin-7	○	-
P20930	Filaggrin	○	○
Q96L21	60S ribosomal protein L10-like	○	-
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	○	-
P46776	60S ribosomal protein L27a	○	-
P08865	40S ribosomal protein S4	○	-
P06702	Protein S100-A9	○	-
P61247	40S ribosomal protein S2a	○	-
Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36	○	-
P62888	60S ribosomal protein L30	○	-
Q8UHL9	General transcription factor k-i repeat domain-containing protein 1	○	-
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	○	-
Q8ZS81	WD repeat- and FYVE domain-containing protein 4	○	-
P46782	40S ribosomal protein S5	○	-
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	○	-
P62081	40S ribosomal protein S7	○	-
P49327	Fatty acid synthase	○	-
P46783	40S ribosomal protein S10	○	-
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	○	-

○: 検出、-: 不検出

その結果、1) 特定のリボソームの構成要素が C 末端に特異的に結合していることから、リボソームの構成要素となっているか、タンパク合成を制御している可能性が考えられる。また、2) Galectin-7 が結合することから、アポトーシスの誘導を介したケラチノサイトの脱核や最終分化への関与の可能性が考えられる。

現在、上記の2つの点に着目して、C 末端領域の機能をさらに詳細に検討している最中である。

本研究で得られた結果は、アトピー性皮膚炎などの表皮バリア機能異常疾患の病態解明や治療法を開発する上で重要な知見になると考えられる。

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 1 件)

Sakabe J, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y: Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes. J Biol Chem 288: 17179-17189, 2013. DOI: 10.1074 [査読有]

〔学会発表〕(計 1 件)

Sakabe J, Yamamoto M, Motoyama A, Ohta I, Hirakawa S, Hibino T, Tokura Y: Involvement of kallikrein-related peptidase 5 in profilaggrin processing. International Investigative Dermatology (IID) 2013, 2013. 05. 08-11, Edinburgh.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂部 純一 (SAKABE, Jun-ichi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：3 0 6 3 1 4 9 4