

皮膚表皮細胞におけるリポドバイオフィクターの機能発現機構

新潟大学 医学部生化学第二教室

藤井 博

Cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) has been isolated from rat skin and its cDNA has been identified. As C-FABP contains five cysteines, which is rare in other FABPs so far isolated, we examined whether or not these cysteine residues are involved in the FABP function. Determination of the locations of intramolecular disulfide bonds of native C-FABP revealed that two are present between Cys-67 and Cys-87, and between Cys-120 and Cys-127. Native C-FABP purified from rat skin exhibited the ability to bind to stearic acid whereas both native C-FABP reduced with dithiothreitol and bacterially expressed C-FABP showed little binding activity. The reduced C-FABP after renaturation showed the partial recovery of the binding activity. Ion-Spray mass spectrometry of native, recombinant, or renatured recombinant C-FABP revealed that two exact disulfide bonds (between Cys-67 and Cys-87, and between Cys-120 and Cys-127), five free sulfhydryl groups, or partial exact but not non-native disulfide bonds are present in each molecule, respectively. Hypothetical three dimensional structure of C-FABP showed that atomic distances between the sulfur atoms of Cys-67 and Cys-87 and of Cys-120 and Cys-127 enable to form two intramolecular disulfide bonds. These results suggest that two exact intramolecular disulfide bonds are required for its high binding activity toward fatty acids. In situ hybridization and immunohistochemical analyses showed that C-FABP is expressed in the epidermis and sebaceous glands of normal rat skin. Northern blot analysis revealed that C-FABP mRNA is highly expressed in skin, tongue and eye. Interestingly, the C-FABP message was most abundant in eye, and was present at lower levels in brain, testis and fat. These results indicate that C-FABP functions in various tissues containing epithelial cells.

1 緒言

皮膚の水分保護バリアーは、体内の水分保持機構に重要な機能を果たしている。このバリアーの本体は、脂質であることから、皮膚における脂質代謝調節機構の研究は、皮膚の恒常性維持機構を考える上で極めて重要である。一般に、生体機能の調節に与る生理活性脂質(リポドバイオフィクター)は、その機能発現のために、特異的レセプターあるいは結合蛋白質を必要とする。とりわけ、皮膚における必須脂肪酸など、リポドバイオフィクターと呼ばれる生理活性脂質の重要性が示唆されていることから、それらのレセプターあるいは結合蛋白質の構造・機能・遺伝子発現調節機

構の解析がコスメトロジーの新たな展開へ大いに貢献すると思われる。我々は、これまでに、長鎖脂肪酸やその他の脂溶性リガンド(プロスタグランジンなど)と結合する蛋白質、脂肪酸結合蛋白質(FABP)を種々の組織から単離し、それらの構造と機能および遺伝子発現調節機構を解析してきた。しかしながら、生体内におけるFABPの生理機能の詳細はよくわかっていない。これらの蛋白質はレチノール、レチノイン酸などと結合する細胞内レチノール結合蛋白質(CRBP)、細胞内レチノイン酸結合蛋白質(CRABP)とも相同性が高く、FABPスーパーファミリーを形成している。最近、我々は皮膚型、(cutaneous) C-FABPをラットの皮膚から単離し、そのcDNAをクローニングしたが、C-FABPは、ヒト乾癬症で大量に発現している蛋白質(PA-FABP)および、マウス皮膚細胞癌(扁平上皮癌)で大量発現している蛋白質(mal 1)と非常に高い相同性を示した。皮膚表皮細胞の増殖や分化の調節機構を研究する上で、乾癬や扁平上皮癌などの疾患はよい実験モ



Studies on a novel protein, cutaneous fatty acid-binding protein, involved in the action of bioactive lipids in the skin

Hiroshi Fujii

Department of Biochemistry,
Niigata University School of
Medicine

デルになると考えられる。特に、乾癬では、表皮細胞の増殖に基づいて、角質増殖、不全角化、基底層および有棘層下層の核分裂細胞数の増加などが形態学的特徴としてあげられるが、皮膚の光老化や加齢による老化は、皮膚の角化と密接に関連しているため、乾癬におけるC-FABPの遺伝子発現調節機構やC-FABPと脂質代謝との関係の研究は、皮膚の老化や恒常性維持機構の解明につながると思われる。また、興味深いことにレチノイン酸はC-FABPと相同性が高く、同一ファミリーに属するCRABPのリガンドであると同時に、皮膚の老化や角質化を防止する医薬品であるが、C-FABPやCRABPの皮膚における生理機能、およびC-FABPの生体内リガンドの同定などの研究は、リポバイオファクターの皮膚における機能発現機構を解析する上で重要な研究課題であると思われる。本研究では、細胞増殖が異常に亢進した皮膚表皮細胞における皮膚型FABPの構造と機能の相関¹⁾、遺伝子発現調節機構、これらの疾患への関与機構および、皮膚における機能解析などを目的とする。

2 実験

2.1 ラットC-FABPの大腸菌における発現及び精製

先にクローニングした²⁾ 全長C-FABP cDNAをpET3aベクターに入れ大腸菌*E. Coli* BL21で発現させた。発現した蛋白質のほとんどは、可溶性画分に回収された。細胞破壊後、可溶性画分をDE-52、Superdex 75などのクロマトグラフィーを用いて均一になるまで精製した。

2.2 脂肪酸との結合活性の測定

¹⁴C標識ステアリン酸をリガンドとして用い、リピデックス法³⁾でC-FABPとの結合活性を調べた。

2.3 組換えC-FABPのプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) による再生

精製した組換えC-FABPとPDIを還元型(2

mM) および酸化型(0.2mM) グルタチオンの存在化で、25°C、3時間反応させた。³⁾

2.4 分子内ジスルフィド結合の位置決定

ネイティブまたは組換えC-FABPを6 M塩酸グアニジンの存在下で、ヨードアセトアミド(2 mM)処理後、塩酸グアニジンの濃度を2 Mまで下げて、*Achromobacter lyticus*のリジルエンドペプチダーゼを作用させた。得られたペプチド断片を逆相HPLCで分離し、各々のペプチド断片のアミノ酸配列をシークエンサー (Applied Biosystems 470A) で解析した。さらに、ジチオスレイトール (DTT) で還元した断片についても同様にシークエンス解析した。また、HPLCで精製したペプチド断片の質量分析も行ない、アミノ酸配列およびジスルフィド結合の有無を確かめた。

2.5 正常ラットの皮膚におけるC-FABPの局在

組換えC-FABPに対する特異的ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて、正常ラット (Sprague-Dawley, 8週齢)の皮膚の切片を免疫染色した。また、C-FABP mRNAの局在をin situ ハイブリダイゼーション法によって調べた。⁴⁾ C-FABP cDNAをpGEM-3 Zに入れ、ジゴキシゲニン (DIG) UTPをアンチセンスおよびセンスプローブに取り込ませ標識した。固定組織切片とプローブをハイブリダイズさせた後、アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を作用させ、発色基質(BCIP、NBT)を加えシグナルを検出した。

2.6 正常ヒトおよびいくつかの皮膚疾患におけるC-FABPの発現

ヒトC-FABP (PA-FABP)⁵⁾ のN末端領域(12-24)の13アミノ酸からなるペプチドRLDDSKGFDEYMKに対するポリクローナル抗体を作製し、ヒトの正常および、有棘細胞癌 (Squamous cell carcinoma: SCC)、基底細胞癌 (Basal cell carcinoma: BCC)、悪性黒色腫 (Malignant melanoma: MM)などの皮膚疾患由来

の細胞におけるC-FABPの発現を免疫組織化学的手法で調べた。⁶⁾

2.7 C-FABPの組織分布

C-FABP mRNAの発現を調べるため、種々の組織(皮膚、大脳、小脳、眼、舌、心臓、肺、脂肪、肝臓、脾臓、筋肉、腎臓、副腎、精巣、卵巣、胃、十二指腸、回腸および盲腸)から全RNAをChirgwin⁷⁾らの方法によって抽出し、ノーザンプロット法によってC-FABPの組織分布を調べた。

3 結果と考察

3.1 ラットC-FABPの大腸菌における発現

大腸菌で大量発現させたC-FABPは、可溶性画分に回収され、DE52およびSuperdex75クロマトグラフィーで均一な精製標品として得られた。Fig. 1に示すように、組換えC-FABPはラット皮膚から精製したネイティブC-FABPと

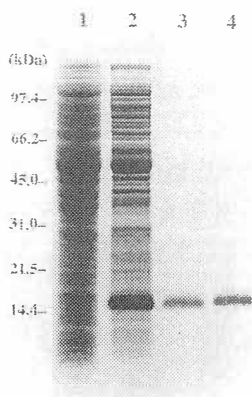


Fig. 1. Analysis of the bacterially expressed recombinant rat C-FABP after purification. Samples were analyzed by a 10% Tricine/SDS/PAGE. The bands were stained with Commassie brilliant blue. Lane 1, soluble fraction of the transformant containing the pET3a control vector (20 μ g of protein); lane 2, soluble fraction of the transformant containing the C-FABP expression vector (20 μ g of protein); lane 3, purified recombinant C-FABP (1 μ g of protein); lane 4, purified native C-FABP (1 μ g of protein).

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上同一の大きさ(約14kDa)を示した。このことは、ネイティブC-FABPの質量分析の結果、ネイティブC-FABPが翻訳後修飾を受けていないことと矛盾しなかった。

3.2 組換えC-FABPの脂肪酸結合活性

Fig. 2に示すように、精製した組換えC-FABPを用いて脂肪酸(ステアリン酸)との結合活性を調べたところ、ほとんど結合活性が見られなかった(○)。3.2でも述べたように、ネイティブC-FABPは翻訳後修飾を受けていないことから、我々は組換えC-FABPの脂肪酸結合活性が消失した理由として、C-FABP分子内にある5つのシステイン残基のうち、いずれかが分子内ジスルフィド結合形成に関与し組換えC-FABPでは還元的环境にさらされたために、分子内ジスルフィド結合が壊れ、脂肪酸との結合に必要な活性型コンホメーションが維持できなくなったためではないかと考えた。この可能性を確かめるため、

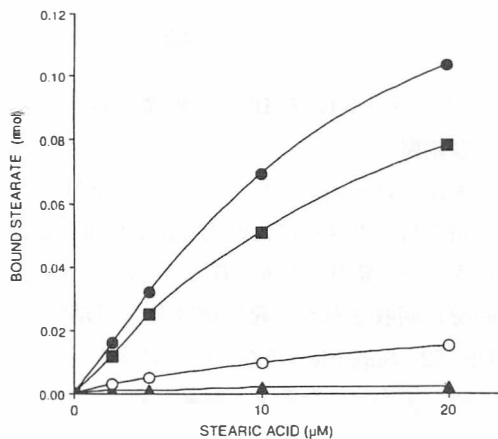


Fig. 2. Binding of radiolabeled stearic acid to the recombinant and native rat C-FABP. [$1-^{14}$ C] Stearic acid was incubated with 150 pmol recombinant or native C-FABP at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. Unbound fatty acid was separated from bound fatty acid with Lipidex 1000. (●) Native C-FABP without dithiothreitol; (○) native C-FABP with 2 mM dithiothreitol; (▲) recombinant C-FABP before renaturation; (■) recombinant C-FABP after renaturation.

組換えC-FABPをPDI処理し、分子内ジスルフィド結合を形成させた後に、脂肪酸との結合活性を測定した。その結果、Fig. 2の(■)で示すように、ネイティブC-FABPの結合活性の約80%の活性が得られた。従って、ネイティブC-FABPは、分子内ジスルフィド結合を持ち、これは脂肪酸との結合に必須の役割を担っていることが示唆された。次に、我々は、5つのシステイン残基のうちどのシステイン残基が、分子内ジスルフィド結合形成に関与しているか解析した。

3.3 分子内ジスルフィド結合の位置決定

ヨードアセトアミド処理したC-FABPをリジルエンドペプチダーゼ処理し、得られたペプチド断片をHPLCで分離精製したところ、11個のピークが得られた (Fig. 3 A)。それぞれのペプチド断片のアミノ酸配列を決定した結果、システイン残基を含むペプチド断片は、ピーク8、10、11、であった。このうちピーク8は、2つのシステインを含み、DTTで還元すると2つのペプチド断片に分かれることからCys67とCys87がジスルフィド結合を作っていると考えられた。また、ピーク10も2つのシステインを含み、Cys120とCys127の間でジスルフィド結合を形成していた。また、ピーク11は1つのシステインを含み、アミノ酸配列からこのシステイン残基はCys43であることがわかった (Fig. 3 B)。これらの結果はそれぞれのピークの質量分析の結果からも確かめられた。したがって、ネイティブC-FABPの5つのシステイン残基のうち2つのシステインは分子内ジスルフィド結合 (Cys67-Cys87とCys120-Cys127) に関与し、1つのシステイン (Cys43) 残基は遊離していることがわかった。また、組換えC-FABPのシステイン残基は全て遊離しており、ジスルフィド結合は形成されていなかった。このことは、C-FABPの活性型コンホメーションの維持にジスルフィド結合が必要であることを示している。コンピューター解析によるC-FABPの三次元構造のモデルをFig. 4に示

した。興味深いことに、ラット、マウスおよびヒトのC-FABPのジスルフィド結合に関与しているシステイン残基 (Cys67, Cys87, Cys120, Cys127) の位置は全て保存されており (Fig. 5)、これらのシステイン残基はC-FABPの機能発現 (脂肪酸との結合) に重要であることが示唆された。

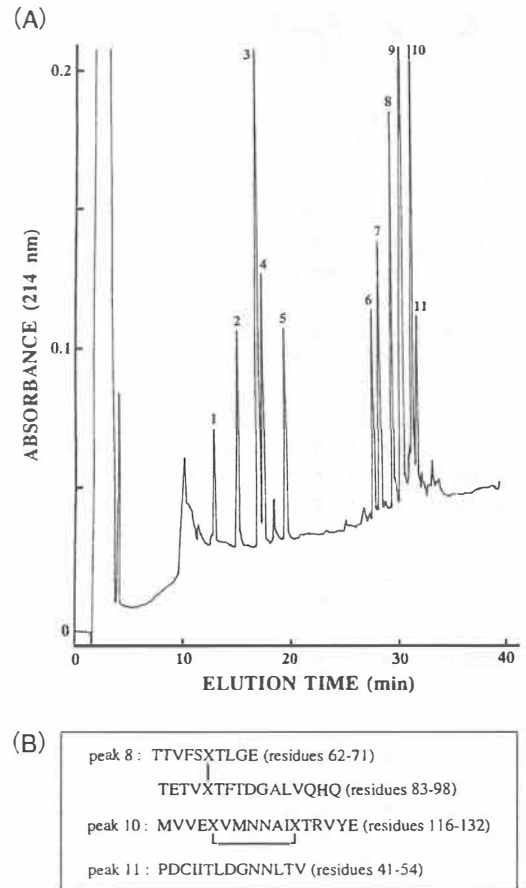


Fig. 3. Reverse-phase HPLC separation of peptides produced on lysyl endopeptidase digestion of C-FABP.

(A) Flow chart of HPLC separation of each peptide. The separated peptides are numbered in the order of their elution. Column, Toyo Soda ODS (octadecylsilica) 120T (0.46 × 25 cm); buffer, 0.1% trifluoroacetic acid; elution gradient, 1-45% acetonitrile (by vol.) in 40 min; flow rate, 1.0 ml/min.

(B) Amino acid sequence of each peptide fragment after HPLC separation. X, not detected as cysteine before reduction and subsequent S-carboxymethylation of each peptide. (—) possible disulfide bond.

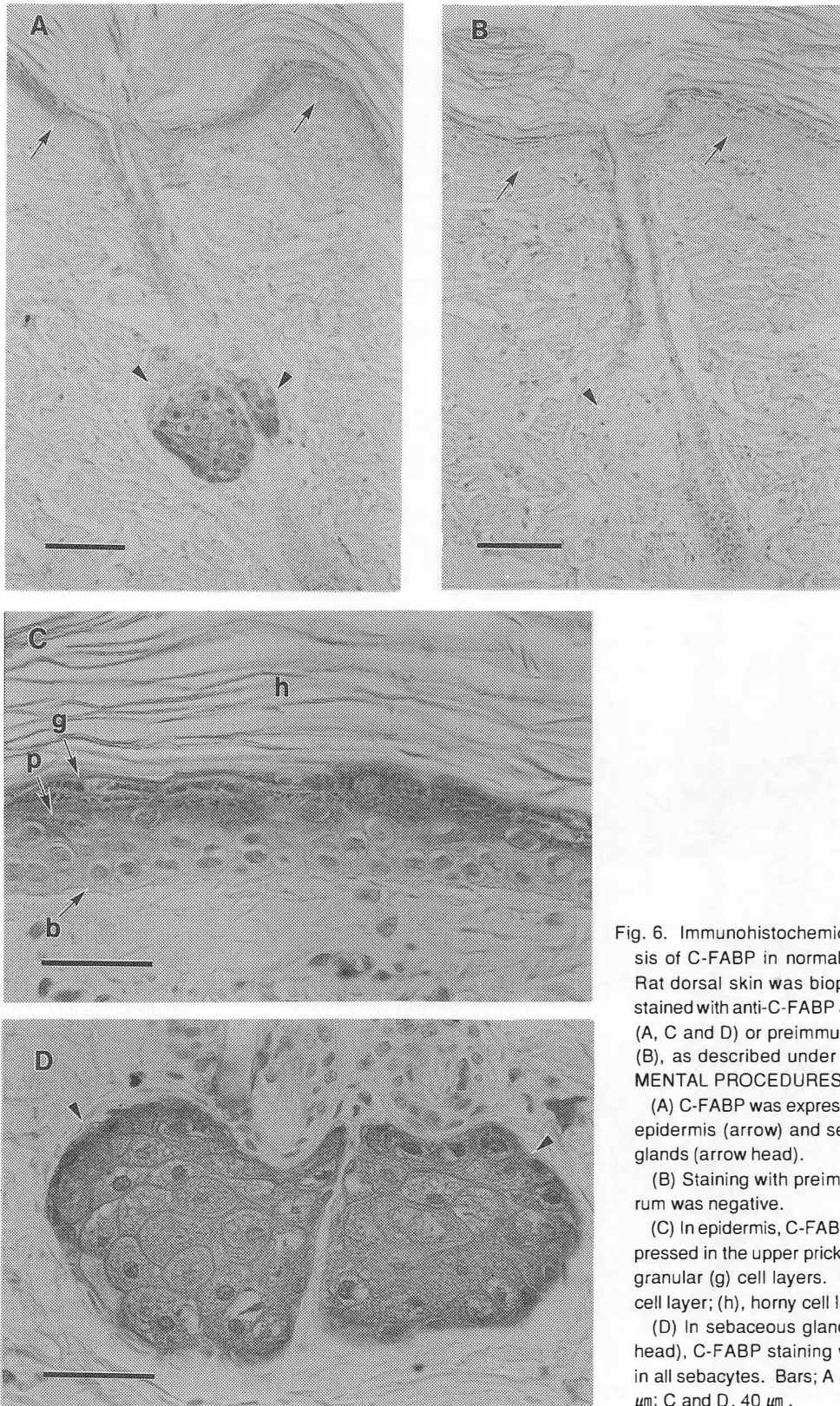


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of C-FABP in normal rat skin. Rat dorsal skin was biopsied and stained with anti-C-FABP antiserum (A, C and D) or preimmune serum (B), as described under EXPERIMENTAL PROCEDURES.

(A) C-FABP was expressed in the epidermis (arrow) and sebaceous glands (arrow head).

(B) Staining with preimmune serum was negative.

(C) In epidermis, C-FABP was expressed in the upper prickle (p) and granular (g) cell layers. (b), basal cell layer; (h), horny cell layer.

(D) In sebaceous glands (arrow head), C-FABP staining was seen in all sebacytes. Bars; A and B, 80 μ m; C and D, 40 μ m.

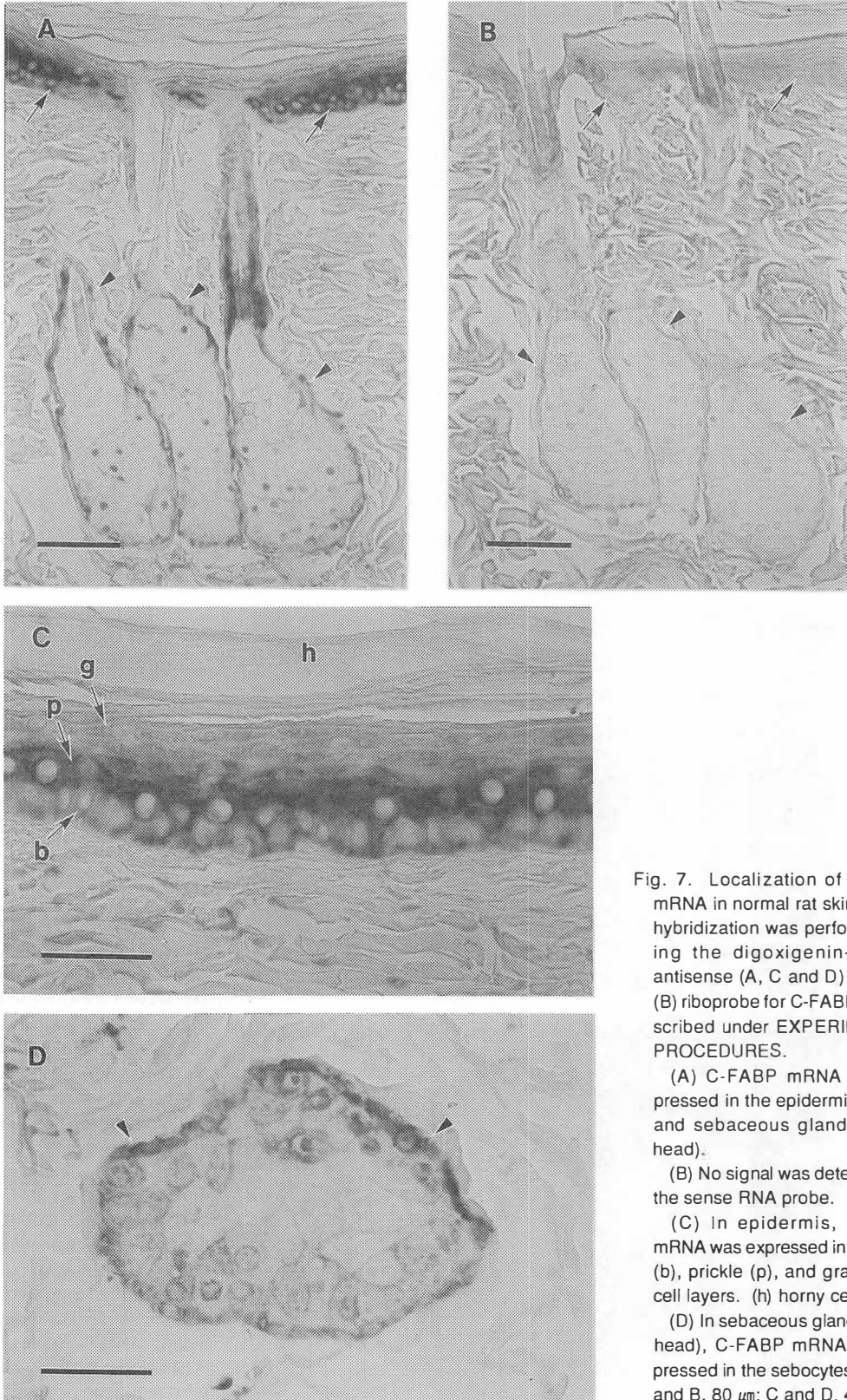


Fig. 7. Localization of C-FABP mRNA in normal rat skin. In situ hybridization was performed using the digoxigenin-labeled antisense (A, C and D) or sense (B) riboprobe for C-FABP, as described under EXPERIMENTAL PROCEDURES.

(A) C-FABP mRNA was expressed in the epidermis (arrow) and sebaceous glands (arrow head).

(B) No signal was detected with the sense RNA probe.

(C) In epidermis, C-FABP mRNA was expressed in the basal (b), prickle (p), and granular (g) cell layers. (h) horny cell layer.

(D) In sebaceous glands (arrow head), C-FABP mRNA was expressed in the sebocytes. Bars: A and B, 80 μm ; C and D, 40 μm .

表皮では主として有棘細胞で強く発現し、顆粒細胞でその発現は減少する傾向にあった。C-FABPの蛋白質と mRNA の発現パターンが何故異なるのか今後検討しなければならない課題である。また、C-FABP の皮膚における機能解明は今後の課題である。

3.5 ヒト皮膚表皮細胞における C-FABP の発現

ヒトの C-FABP(PA-FABP) 特異的抗体を用いたヒト皮膚組織および細胞の免疫組織染色の結果、C-FABP はラットの場合と同様、顆粒細胞で最も強く発現していることがわかった。表皮細胞の分化過程で、遊離脂肪酸の産生は顆粒層で最も多いことから、C-FABP の発現と脂肪酸の産生が密接に関連していることが推測される。また、ヒト乾癬由来の表皮組織でも C-FABP の強い発現が見られた。乾癬では遊離脂肪酸やロイコトリエン B4 などのリポバイオファクターの産生が高くなっていることから、これらの脂質は C-FABP の遺伝子発現のシグナル伝達因子の一つになっている可能性も考えられる。最近、遊離脂肪酸やロイコトリエン B4 などで活性化される核内レセプター PPAR (Peroxisome proliferator-

activated receptor) が同定されていることから、これらのリポバイオファクターが C-FABP の遺伝子発現や表皮細胞の分化、増殖のシグナル伝達因子として作用していることも十分考えられる。⁹⁾ また、SCC は有棘細胞由来の癌細胞であるが、C-FABP の遺伝子発現は、正常有棘細胞に比べて、かなり亢進していた。一方、BCC や MM などの細胞では、C-FABP の発現は全く見られなかった。今後、C-FABP の表皮細胞における生理機能、リポバイオファクターによる C-FABP 遺伝子発現制御機構、および上記皮膚疾患への C-FABP の関与機構などを解明しなければならない。

3.6 C-FABP の組織分布

C-FABP mRNA の発現をノーザンブロット法で解析したところ、Fig. 8 に示す様に皮膚以外の組織、舌や眼で高い発現が見られた。特に、眼や舌では皮膚に比べて3~5倍くらい高い発現が見られた。それぞれの組織の免疫化学的解析の結果、舌では上皮細胞、眼では角膜や網膜などで高い発現が見られた。光情報伝達に關与する網膜のトランスデュースン α サブユニットは脂肪酸で共有結合修飾されていることから¹⁰⁾、特に網膜では

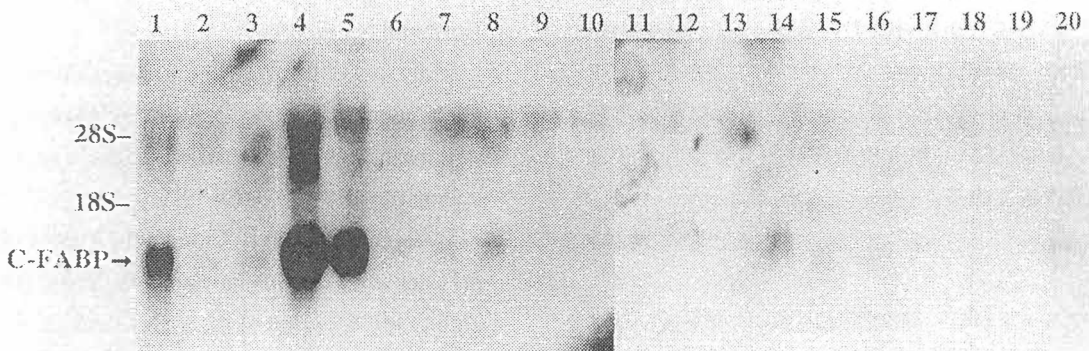


Fig. 8. Tissue distribution of rat C-FABP mRNA, as assessed by Northern blot analysis. Total RNA (20 μ g) isolated from various tissues of adult rats was subjected to Northern blot analysis as described under EXPERIMENTAL PROCEDURES. The mRNAs in the respective lanes are for: 1, skin; 2, cerebrum; 3, cerebellum; 4, eye; 5, tongue; 6, heart; 7, lung; 8, adipose tissue; 9, liver; 10, spleen; 11, muscle; 12, kidney; 13, adrenal gland; 14, testis; 15, ovary; 16, stomach; 17, duodenum; 18, jejunum; 19, ileum; 20, caecum.

C-FABP はこれらの脂肪酸の転送に関わっている可能性もあり興味をもたれる。また、発現量は、皮膚の1/5程度であるが、脂肪組織や精巣、脳でも発現していた。とりわけ、脂肪組織では、これまで脂肪細胞型 FABP (aP2) のみが発現していると考えられていたが、我々の研究から¹¹⁾、C-FABP もこの組織で発現していることが示された。さらに、培養細胞を使った実験から、aP2 は前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化して初めて発現するのに対して、C-FABP は前駆脂肪細胞で既に発現していることがわかった。最近の Spiegelman らの報告¹²⁾ によると、aP2 のノックアウトマウス (aP2^{-/-}) では、C-FABP mRNA の発現が脂肪細胞で、約 20 倍誘導されることが示された。C-FABP と aP2 に機能的な差異があるかどうか、また、C-FABP 遺伝子発現を誘導しているシグナルは何かなど今後の課題である。この様に C-FABP の組織分布の結果から、C-FABP は発生学的に外胚葉由来の上皮細胞で発現している傾向が見られた。今後、これらの細胞における C-FABP の機能の解明が待たれる。最近の報告によると、末梢神経節の損傷—再生に伴って、背根神経節のニューロンで発現が上昇している蛋白質の1つが C-FABP であることがわかった。¹³⁾ また、乾癬⁵⁾ や扁平上皮癌¹⁴⁾ などの増殖が異常に亢進した細胞で C-FABP の発現が誘導されることが知られているが、C-FABP の発現誘導に関与しているシグナルおよびこのシグナルによる C-FABP 遺伝子発現制御機構の解析は、C-FABP の生理機能を解明する上で重要な研究課題である。

謝 辞

コスメトロジー研究振興財団の研究支援に深謝いたします。本研究は、新潟大学医学部生化学第二教室教授小野輝夫先生、同大学理学部教授小谷昌司先生および同大学医学部皮膚科学教室との共同研究で行われたものであり、深謝いたします。

文 献

- 1) Watanabe R, Fujii H, Odani S, et al: Expression and characterization of rat cutaneous fatty acid-binding protein, submitted to J Biol Chem.
- 2) Watanabe R, Fujii H, Odani S, et al: Molecular cloning of a cDNA encoding a novel fatty acid-binding protein from rat skin, *Biochem Biophys Res Commun*, 200, 253-259, 1994
- 3) Lambert N and Freedman R B: Kinetics and specificity of homogeneous protein disulphide-isomerase in protein disulphide isomerization and in thiol-protein-disulphide oxidoreduction, *Biochem J*, 213, 225-243, 1983
- 4) Sakai K, Fujii H, Yamamoto T, et al: Tissue-specific suppression of aortic fatty acid-binding protein in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur J Biochem*, 229, 201-206, 1995
- 5) Madsen P, Rasmussen H H, Leffers H, et al: Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) similarity to fatty acid-binding proteins, *J Invest Dermatol*, 99, 299-305, 1992
- 6) Watanabe R, Fujii H, Yamamoto A, et al: Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin, *J Dermatol Sci*, in press
- 7) Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J, et al: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry*, 18, 5294-5299, 1979
- 8) Watanabe R, Fujii H, Yamamoto A, et al: Expression of cutaneous fatty acid-binding protein and its mRNA in rat skin, *Arch Dermatol Res*, 288, 481-483, 1996
- 9) 藤井博: Fatty acid-binding protein, FABP, 動脈硬化, 24 (7,8), 353-361, 1996
- 10) Fukada Y, Takao T, Ohgura H, et al: Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor

- G protein indispensable for GTP-binding, *Nature*, 346, 658-660, 1990
- 11) Fujii H and Ono T: unpublished results
 - 12) Hotamisligil G S, Johnson R S, Distel R J, et al: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in $\alpha P2$, the adipocyte fatty acid binding protein, *Science*, 274, 1377-1379, 1996
 - 13) Leon M D, Welcher A A, Nahin R H, et al: Fatty acid binding protein is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury, *J Neurosci Res*, 44, 283-292, 1996
 - 14) Krieg P, Feil S, Furstenberger G et al: Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein, *J Biol Chem*, 268, 17362-17369, 1993