

皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究

新潟大学医学部

小 野 輝 夫

A novel skin-type fatty acid-binding protein, termed cutaneous(C)-FABP was purified to homogeneity from rat skin cytosol by DEAE-cellulose chromatography, followed by chromatography on Mono S and Superdex 75 gel filtration. Although the partial amino acid sequence of C-FABP was homologous to those of known rat FABP family, especially heart FABP, C-FABP was distinct from them with respect to the immunological properties and an apparent molecular mass.

1. 緒 言

一般に各種動物組織のサイトゾールにはその細胞種に特異的な分子量約15kDaの低分子で、脂肪酸を特異的にリガンドにする脂肪酸結合蛋白(FABP)のスーパーファミリー蛋白が発現されている。これらのFABPは細胞の機能発現、脂肪酸転送、代謝上重要な働きを演じていると考えられるが、これまで肝臓、心臓、骨格筋、脂肪細胞、腸組織、ミエリン鞘などから一次構造の異なる肝型、心筋型、脂肪細胞型、腸型、シュワン細胞型が同定されている^{1,2)}。この蛋白ファミリーは脂肪酸の他細胞内に見出される低分子のレチノール、レチノール酸結合蛋白をも包含するミエリンP₂蛋白スーパーファミリーと呼ばれている。この他にもリガンドを既知の脂肪酸やレチノールなどと同定出来ないが、明らかにこのファミリーに属するI-15P蛋白も我々の研究室で見出され報告されているが³⁾、皮膚組織でのFABPに関する報告はこれまで少なく一次構造は不明である。

最近Razaら⁴⁾はネズミ皮膚のエピデルマルサイトゾールに分子量14~15kDaのFABPが存在することを示唆している他、Schurerら⁵⁾はヒトの培養ケラチノサイトで66kDaおよび38kDaの高分子FABPの存在を示唆したほかMadsen⁶⁾も乾癬と関連したFABP様蛋白が活発に増殖している乾癬真皮で高度に発現されていることを報告しているが、FABPファミリーとの関係は明確でない。我々は皮膚組織を構成する各種細胞が活発なターンオーバーを行っていることから、脂肪酸も活発に代謝されていると推定し、FABP分子種の検索をネズミ皮膚について行った。

2. 実 験

2.1 ネズミ皮膚サイトゾールの調製

体重300gスプラグ・ダウリーネズミ(6匹)の背部皮膚5cm平方を電気カミソリで剃毛後切り出し、出来るだけ皮下脂肪組織を除いた後、氷冷生理的食塩水に浸し細片して30mMトリス塩酸緩衝液pH 7.3 (5mM EDTA、2mM PMSF、1mM DTTを含む)内でポリトロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。得られたホモゲネートは30分10000×gで遠心後さらに125000×gで90分超遠心してサイトゾールを調製した。

Basic Studies on lipid metabolism of skin: Identification of Fatty Acid-Binding Protein



Teruo Ono

School of Medicine
Niigata University

2.2 C-FABPとH-FABPの純化

ネズミ皮膚サイトゾールを30mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0(5mM EDTA、2mM PMSF、1mM DTTを含む)で透析後、上記緩衝液であらかじめ平衡化したDE-52(2.5cm × 15cm)の陰イオン交換樹脂カラムに適応した。50mM 2-メルフォリンエタン硫酸緩衝液 pH5.5で溶出させた時の非吸着画分を集めて透析後、同じ緩衝液であらかじめ平衡化させたベットボリュウム1mlのMono Sカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、各緩衝液60mlを用い0~0.5M NaClのリニアグラジエントで溶出した。180~190mM NaClに相当する画分をプールし50mM 磷酸カリウム緩衝液 pH7.0であらかじめ平衡化したHiload 26/60 スーパーデックス75カラム(2.6cm × 62cm)に適応した。C-FABPはSDS PAGE上単一の分子量約15kDaの蛋白として精製された。心筋型のH-FABPは既に報告した方法でネズミ心筋より精製した⁷⁾。

2.3 アミノ酸配列の決定

精製したC-FABPをリジルエンドペプチダーゼ(*Achromacter lyticus*)で酵素/基質蛋白比1:20(重量比)で80mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5中で25℃8時間消化を行った。得られたリジルエンドペプチダーゼペプチドは高速液体クロマトのC₈ Capcell pack カラム(0.46 × 15cm)で分画した。容量で0.1% TFA中にアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出させた。ペプチドの溶出は214nmの吸光度で追跡した。アミノ酸配列の分析は120A フェニルヒダントイン分析計を備えたアプライドバイオシステムの470A ガス相配列分析装置で行った。

2.4 脂肪酸結合能の測定

Lipidex 1000および[1-¹⁴C] ステアリン酸はシグマおよびアマーシャムから購入した。FABP蛋白からの脱脂およびC-FABPとH-FABPに対する脂肪酸の結合は教室の人見の方

法⁸⁾により測定した。先ずエタノールに溶解した放射性脂肪酸とC-FABPあるいはH-FABPを10mM 磷酸カリウム緩衝液 pH7.4で37℃1時間培養した。培養の最終容量は500μlで各構成成分の最終濃度はC-FABPあるいはH-FABPは0.3μM、エタノールは容量比で1%、脂肪酸0.2~20μM(比活性12000dpm/nmol)を用いた。10分間氷冷後反応混液に氷冷50% Lipidex 懸濁液75μlを添加し4℃10分間培養した。Lipidexは15000 × g 5分遠心で除き上清の200μlを液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

3. 結果と考察

3.1 分子的性状

ネズミ皮膚より調製した各精製段階でのC-FABP標品のトリシンSDS PAGEパターンを図1に示した。ネズミ皮膚のサイトゾール試料に混在した血清アルブミンは陰イオン交換樹脂に吸着して除かれたが、C-FABPは非吸着画分として回収され、陽イオン交換樹脂に吸着することからC-FABPの等電点は塩基性かそれに近い値を持つと推定された。純化したC-FABPのSDS PAGE上の移動度は純化したH-FABPよりもやや遅かった。6匹のネズミ皮膚(各5cm × 5cm)より1.0~1.2mgのC-FABPを得たがこれは総サイトゾール蛋白の約1%に相当した。従ってC-FABPは他のFABP分子種と同様に正常なネズミ皮膚サイトゾール中に豊富に存在する蛋白の一つといえよう。

3.2 部分一次構造

精製したC-FABPは既知の一次構造を異にするFABP分子種である、H-FABP、L-FABP、I-FABP、aP₂、I-15Pに対するポリクロナル抗体を用いたウェスタンブロット分析で全く検出されず、免疫学的に明らかに識別され、新しいファミリー蛋白である可能性が示唆された。他のネズミFABP分子種と一次構造を比

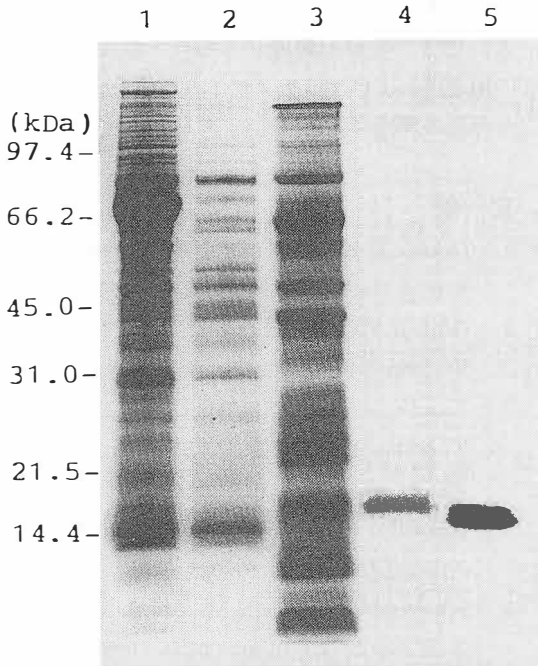


Fig.1 Tricine/SDS/PAGE of rat cutaneous FABP at various stages of purification. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, rat skin high speed supernatant (25 μ g of protein); lane 2, DE 52 flow through (10 μ g of protein); lane 3, Mono S fraction (18 μ g of protein); lane 4, purified cutaneous FABP (0.6 μ g of protein); lane 5, purified heart FABP (2 μ g of protein).

較するためにC-FABPの部分アミノ酸配列を決定した。C-FABPのリジルエンドペプチダーゼ消化とそのペプチドを高速液体クロマトグラフィーで分画して得られたペプチドマップの主要な5つのピークについてアミノ酸配列を決定した。図2にはネズミC-FABPの決定した部分アミノ酸配列の分析結果を示す。リジルエンドペプチダーゼ処理C-FABPから遊離された5つのペプチドの配列分析は、完全配列の約45%を含むと推定された。C-FABPのN端は他のFABP分子種同様おそらくアセチル化によりブロックされていると推定され決定出来なかったが、C-FABPのN端近傍の配列は他のFABP分子種と極めて高い相同性を示した。一方C-FABPのC

	1	19	21	29	31	38
L-FABP	MNFSGKYOVOSQNFEPFM	AMGI	PEDLI	KGKIDIRGV		
I-FABP	MAFDGTWKVYRNENYEKFM	KMG	INUVKR	LGAIHDNIK		
H-FABP	ADAFVGTWKLVDKSNFDDYM	SLGV	GFATR	VASMTKPT		
C-FABP	WRLVESHGFEDYM	ELGV	GLALR	MGAMAKPD		

	67	79	109	127
L-FABP	EECELEMTGTEKV	ITNTMTLGDIVYKRVSKRI		
I-FABP	VDFAYSLADGTFL	LITTYTYEGVEAKRIFKKE		
H-FABP	VEFDEVTTADDRKV	LITLTHGNVSTRTYEKEA		
C-FABP	TEFXTFDLGALV	DVVEVMNNAIXTRVYE		

Fig.2 Partial amino acid sequences of rat FABPs. Numbering is based on the primary structure of L-FABP. Identical amino acid residues of C-FABP with other FABPs are indicated by bold faced types. Unidentified amino acid residue is indicated as X. L-FABP, liver FABP; I-FABP, intestine FABP; H-FABP, heart FABP; C-FABP, cutaneous FABP.

端近傍でも部分的相同性を示したが、N端近傍に比しややホモロジーは低かった。これらの結果は既知のFABP分子種の構造的特徴を備えており⁹⁾、C-FABPがFABP分子種のメンバーであることを強く示唆する。また興味深いことにFABP分子種の中でもC-FABPはH-FABPと同一ではないが進化的に極めて近縁の関係にあることが示された。さらに極く最近報告されたヒト乾癬と関連するFABPと高度の相同性を示した⁶⁾。しかしヒトの乾癬と関連したFABPはノーザンプロットでは正常のヒトケラチノサイトでは乾癬時のケラチノサイトに比べ極めて発現量は低く、我々が今回正常ネズミ皮膚より得たC-FABPは豊富な蛋白であり、ヒトの乾癬時に増加するFABPとの同一性が今後明らかにされねばならないと思われる。少なくとも乾癬化障害の病理はFABPと密接に結び付いていると考えられ、ケラチノサイトの増殖分化に果たすFABPの役割が今後の研究対象となろう。

3.3 脂肪酸結合能

純化したC-FABPとH-FABPの放射性ステアリン酸結合能を図3に示す。双方の蛋白ともステアリン酸結合能を示すが、H-FABPに比べ若干C-FABPは親和性は低かった。ステアリン酸以外にパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、

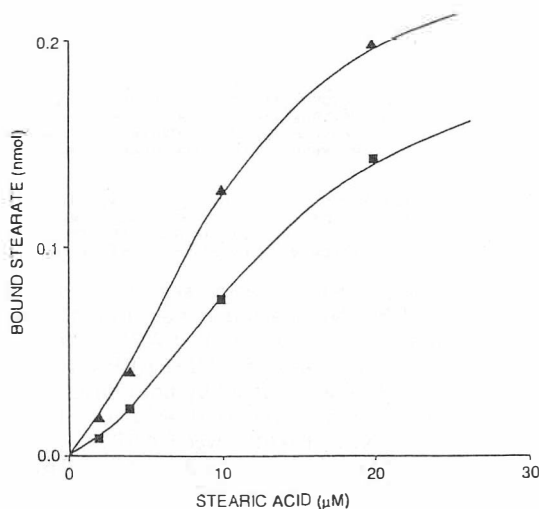


Fig.3 Binding assay of radiolabeled stearic acid with the purified rat cutaneous FABP (■) and heart FABP (▲). [$1-^{14}C$] Stearic acid was incubated with 150 pmol FABP at 37°C for 1h. Unbound fatty acid was separated from bound fatty acid by Lipidex 1000.

アラキドン酸でも同様な結果が得られた。C-FABPは脂肪酸をリガンドできるが、未知のリガンドの関与も否定できない。

4. 総括

我々はネズミ皮膚より低分子のFABPを精製し、免疫学的性質、部分アミノ酸配列、脂肪酸の結合能を基盤にFABPファミリーに属する完全に新しいメンバーの蛋白であることを明らかにした。目下アミノ酸の部分配列を基にC-FABPの

cDNAのクローニングを行っており、今後cDNAの構造、エクソン構成について合わせ報告する。ヒトの乾癬と関連して報告されたFABPとの相違点およびケラチノサイト増殖分化での役割が今後の課題である。

文献

- 1) Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. & Ho, W.K.L. (1972) *Science*, 177, 56-58.
- 2) Glatz, J.F.C. & Veerkamp, J.H. (1985) *Int. J. Biochem.*, 17, 13-22.
- 3) Kanda, T., Odani, S., Tomoi, M., Matsubara, Y. & Ono, T. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 197, 759-768.
- 4) Raza, H., Chung, W.L. & Mukhtar, H. (1991) *J. Invest. Dermatol.*, 97, 323-326.
- 5) Schurer, N.Y., Bass, N.M., Jin, S., Manning, J.A., Pillai, S. & Williams, M.L. (1993) *J. Invest. Dermatol.*, 100, 82-86.
- 6) Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Horne, B. & Celis, J.E. (1992) *J. Invest. Dermatol.*, 99, 299-305.
- 7) Kimura, H., Odani, S., Koide, T., Arakawa, M. & Ono, T. (1989) *Biochem. J.*, 260, 303-306.
- 8) Hitomi, M., Odani, S. & Ono, T. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 187, 713-719.
- 9) Veerkamp, J.H., Peeters, R.A. & Maatman, R.G.H.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1081, 1-24.