

皮膚の天然保湿因子(NMF)の形成における転写因子MafBの役割

横浜市立大学生命医科学研究科

片岡 浩介

Natural Moisturizing Factor (NMF) in the skin epidermis is a complex mixture of water-soluble compounds such as amino acids. Filaggrin protein is one of the major components of NMF and is digested to amino acids through multi-step processing and modifications. In this study, we focused on the transcriptional regulation of the *filaggrin* gene expression during skin epidermal development. We identified an enhancer element upstream of the *filaggrin* gene and found that a transcription factor MafB activates it. Further elucidation of the mechanism of the *filaggrin* expression may help to understand how NMF are formed and maintained in skin epidermis.

1. 緒言

皮膚において水分保持の機能を担っているのは、主として天然保湿因子 (Natural Moisturizing Factor : NMF) と呼ばれる、いわゆる「うるおい成分」である。NMFは、フィラグリンなどのタンパク質の分解生成物から複雑な過程を経て形成されることが近年明らかになってきた。NMFの主たる成分であるフィラグリンタンパク質は、繰り返し構造を持った巨大なポリペプチド鎖 (プロフィラグリン) として合成されたのちに、その繰り返し構造の単位へと切り離され、さらにアミノ酸へと分解されてNMFを構成する。NMFは保湿だけでなく皮膚のバリア機能・恒常性維持にも必須であり、例えばフィラグリン遺伝子の変異によって皮外界からの異物・細菌の侵入の防御能が低下して、アトピー性皮膚炎の発症リスクが増大することもわかっている¹⁾。

フィラグリンタンパク質のプロセシングの過程には、各種の切断酵素 (プロテアーゼ) が関与しており、さらに、フィラグリンタンパク質のリン酸化やシトルリン化などの修飾も必要とされるなど、複雑で精妙に制御されている。これまでに、内外の精力的な研究によって、プロセシングに関わる酵素 (プロテアーゼ) などが同定されて、少しずつその過程の分子機構があきらかになりつつあるが²⁾、まだ全容の理解には至っていない。特に、フィラグリンの合成過程 (遺伝子発現) の制御機構については、普遍的な転写因子 Activator Protein 1 (AP-1) の関与³⁾ が知られている他には、あまりよく分かっていないのが現状であり、皮膚を構成する角化細胞でのみ特異的に発現する仕組みは全

く不明である。

そこで本研究では、フィラグリンの転写制御やプロセシング調節の分子機構を探ることによって、皮膚の水分保持機能の調節機構の一端を明らかにすることを目的とする。

2. 実験

2.1 MafB欠損マウスの皮膚におけるフィラグリンタンパク質の異常

皮膚の角化細胞で発現する転写因子 MafB を欠損するマウスの皮膚を組織学的に解析し、またフィラグリンに注目してその発現レベルやプロセシングを調べた。

2.2 MafB過剰発現マウスの作製と解析

転写因子 MafB が皮膚の形成とフィラグリンタンパク質の発現に及ぼす影響をさらに調べる目的で、MafB を過剰発現するマウスを作製し、その表現型を解析した。

2.3 MafB欠損マウスにおける遺伝子発現解析

野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞より RNA を抽出し、フィラグリン遺伝子 mRNA の発現レベルを、定量 PCR 法を用いて検討した。また、網羅的に遺伝子発現の変化を調べる目的で、野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞から抽出した mRNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。

2.4 フィラグリン遺伝子座周辺の *in silico* 解析と ECR の同定

フィラグリン遺伝子座周辺の *in silico* 解析を行い、発現調節に関わるエンハンサーとして機能する可能性が高い領域 (Evolutionally conserved non-coding region; ECR) の同定を試みた。

2.5 フィラグリン遺伝子 ECR を介した MafB による転写の活性化

同定された ECR を含む DNA 領域をヒト・ゲノム中から



Roles of transcription factor MafB in the formation of natural moisturizing factor (NMF) of skin epidermis

Kohsuke Kataoka

Graduate School of Medical Life Science
Yokohama City University

クローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター・プラスミドに組み込んで、このレポーター・プラスミドと MafB 発現ベクターを培養細胞 BHK 21 (ハムスター腎繊維芽細胞由来) に共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、MafB が ECR 配列を介して転写を活性化しているかどうかを検討した。

3. 結果

3.1 MafB 欠損マウスの皮膚におけるフィラグリタンパク質の異常

私たちはこれまでに、bZip タイプの転写調節因子 MafB が皮膚の角化細胞で発現していることを見出していた。MafB は、マクロファージ⁴⁾や副甲状腺⁵⁾などの組織・細胞の分化を司ることがこれまでに明らかにされていたので、角化細胞の分化にも深く関与している可能性が考えられたため、MafB 遺伝子を欠損するマウスの皮膚を解析することにした。

組織学的な解析から、MafB 欠損マウスの皮膚では、角質層の減少と層板顆粒の減少が見られたことから、フィラグリタンパク質の量が低下している可能性が予想された。抗フィラグリン抗体を用いた免疫組織染色により、実際にフィラグリタンパク質の発現レベルと分布の異常が起きていることがわかった。そこで、マウス皮膚よりタンパク質を抽出し、Western blot 法により解析したところ、MafB 欠損マウスの皮膚ではフィラグリタンパク質の発現量とプロセシングが明らかに低下していることが判明した。このことは、MafB がフィラグリンから NMF を形成する複数のステップを制御する重要な役割を担っていることを示唆している。

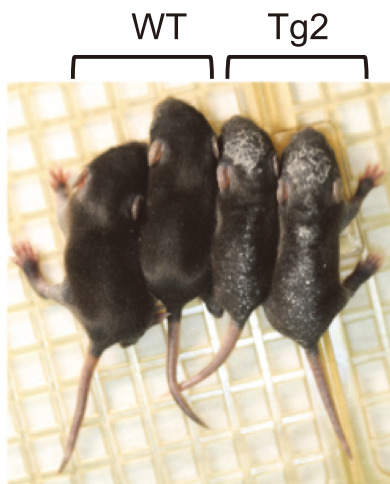


図1 MafB 過剰発現マウスの作製と解析

ケラチン 14 遺伝子プロモーター支配下で MafB を発現するトランスジェニック・マウスを作製した。得られた 3 系統のうちの 1 つ (Tg 2) の外観を野生型 (WT) と比較した。

3.2 MafB 過剰発現マウスの作製と、その皮膚の解析

転写因子 MafB が皮膚の形成とフィラグリタンパク質の発現に及ぼす影響をさらに調べる目的で、MafB を過剰発現するマウスを作製することにした。皮膚角化細胞の基底層で発現するケラチン 14 遺伝子のプロモーター支配下で MafB を過剰発現するトランスジェニック・マウスを作製し、3 系統を得ることができた。そのうちの 1 系統 (Tg 2) の 8 日齢の外観を示す (図 1)。これらの過剰発現マウスでは、皮膚の過剰な角化が観察され、組織学的な解析からも、角質層が過剰に生成されていることがわかった。ただし、この表現型は週齢が上がり成体になると次第に消失し、野生型マウスと変わらない外観となった。その一方で、成体においてはおよそ半分の頻度でパピローマの形成が見られ、それらのパピローマではフィラグリタンパク質が過剰に産生されていた。

これらの MafB 欠損および過剰発現マウスの皮膚の解析から、MafB は皮膚の角化細胞の分化を正に制御することが示唆された。

3.3 MafB 欠損マウスにおける遺伝子の発現レベルの解析

次に、フィラグリタンパク質の発現低下が、転写調節のレベルで生じているかどうかを調べるため、野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞より RNA を抽出し、それぞれにおけるフィラグリン遺伝子 mRNA の発現レベルを、定量 PCR 法を用いて検討したところ、野生型マウスのおよそ 5 分の 1 にまで低下していた (図 2)。フィラグリン遺伝子以外のさまざまな皮膚の角化過程に関与する遺伝子について、インヴォルクリン、ロリクリンなどの構造タンパク質を中心に調べたが、これらの遺伝子の発現レベルに変化はなかった。

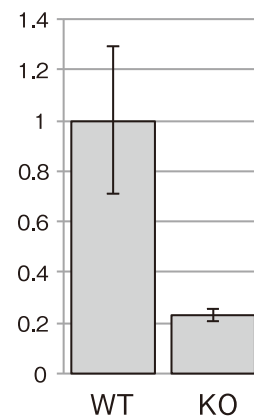


図2 MafB 欠損マウスの皮膚角化細胞における定量 PCR 解析
フィラグリン遺伝子の発現量を、コントロールとした *gapdh* 遺伝子の発現量によって補正し、野生型マウス (WT) における発現レベルを 1 とした場合の MafB 欠損マウス (KO) における発現量をグラフ化した。

さらに網羅的に遺伝子発現の変化を調べる目的で、野生型およびMafB欠損マウス（胎生18.5日）の皮膚角化細胞から抽出したmRNAを用いて、マイクロアレイ解析を行った（図3）。用いたアレイにはフィラグリン遺伝子は含まれていないが、フィラグリン以外にもレペチン（フィラグリンタンパク質と構造的に類似している）などの角化に関与する構造タンパク質をコードする遺伝子のいくつかの発現がMafB欠損マウスでは低下していることがわかった。また、意外なことに脂質代謝に関連する酵素などをコードする遺伝子の発現が上昇していることも判明した。MafBは転写制御因子として脂質代謝系遺伝子の発現を負に制御する活性も併せ持つ可能性が考えられた。

3.4 フィラグリン遺伝子座周辺の*in silico*解析とECRの同定

次に、フィラグリン遺伝子の発現制御機構を解明する手がかりを得るため、フィラグリン遺伝子座周辺の*in silico*解析を行うことにより、進化的に保存度の高い非コード領域

域（Evolutionally conserved non-coding region; ECR）の同定を試みた。このような保存領域は、近傍の遺伝子（この場合フィラグリン遺伝子）の発現調節に関わるエンハンサーとして機能する可能性が高いからである。

図4に示すように、フィラグリンタンパク質はこれまでに指摘されている通りに動物種間の相同性は低いため、エクソン領域での相同性はほとんど見られない。一方で、遺伝子の5'上流領域には進化的な保存性の高い領域が3カ所ほど見いだされた。このことは、フィラグリン遺伝子の発現調節機構が哺乳類の皮膚形成において重要な役割を担っているため、進化を通じて保たれてきたことを示唆している。私たちはこれらの保存領域を、プロモーター近傍側からECR1～3と命名した。

3.5 フィラグリン遺伝子ECRを介したMafBによる転写の活性化

ECR1、ECR2、ECR3はそれぞれエンハンサー活性を担っている可能性が高いので、これらの領域をヒト・ゲノム

microarray analysis (KO v.s. WT)

Down-regulated (< x -2.0) 58 genes

GO:1533	cornified envelope	(P=4.2 x 10 ⁻⁵)
GO:31424	keratinization	(P=0.0066)
GO:5856	cytoskeleton	(P=0.0067)
GO:9993	epidermal cell differentiation	(P=0.0078)

Up-regulated (> x 2.0) 109 genes

GO:6629	lipid metabolism	(P=0.0316)
GO:5792	microsome	(P=0.0456)

図3 MafB 欠損マウスの皮膚角化細胞のマイクロアレイ解析
MafB 欠損マウス (KO) における mRNA の発現量を野生型マウス (WT) と比較し、Gene Ontology (GO) 解析を行った。

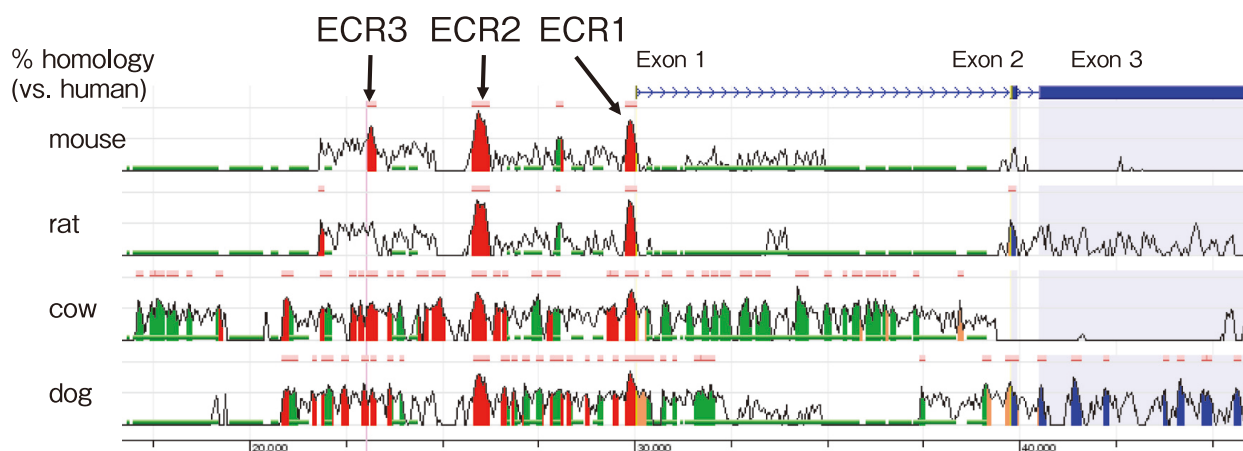


図4 フィラグリン遺伝子上流領域の動物種（哺乳類）間での保存性の*in silico* 検索
ヒトのフィラグリン遺伝子座（exon1～3）とその上流領域（約13kb）を、マウス、ラット、ウシ、イヌの相同な領域と ECR ブラウザ（<http://ecrbrowser.dcode.org/>）を利用して比較した。保存性の高い領域を、転写開始点の近傍側から順に ECR1～3 とした。

中からクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター・プラスミドに組み込んだ。このレポーター・プラスミドと MafB 発現ベクターを培養細胞 BHK21 (ハムスター腎繊維芽細胞由来) に共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、MafB が ECR 配列を介して転写を活性化しうるかどうかを検討した (図 5)。ECR1 (フィラグリン遺伝子プロモーター領域近傍) のみでは、MafB による活性化はほとんど見られなかったが、ECR1 と 2 を連結すると、MafB による顕著な活性化が観察された。ECR1 と 3 の組み合わせではそのような活性化は見られなかった。したがって、MafB は ECR2 を介してフィラグリン遺伝子の発現を促進すると考えられた。

さらに、MafB が直接結合する DNA 配列を同定するため、MafB 結合配列に類似した DNA 配列を ECR 中から検索すると、MafB が結合する可能性のある配列 (MARE 類似配列) が 3 つ見つかった。そこで、これらの配列に塩基置換を導入したレポーター・プラスミドを作成し、同様にルシフェラーゼ・アッセイによって MafB による活性化を検討した。すると、3 つの MARE 類似配列のうちの 1 つ (MARE-like-1) を変異させた場合に MafB による活性化が低下した。したがって、MafB は ECR2 内の MARE-like-1 配列に結合することによってフィラグリン遺伝子を活性化すると考えられた。

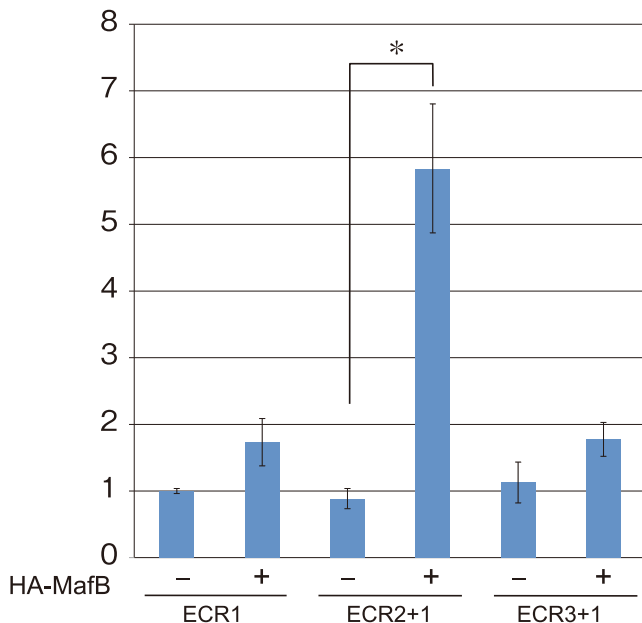


図 5 MafB によるフィラグリン遺伝子 ECR の活性化

図中に示す ECR を含むルシフェラーゼ発現プラスミドを、MafB 発現プラスミドと共に培養細胞 BHK21 にトランスフェクションにより導入し、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。ECR1 のみを含むプラスミドを導入した場合のルシフェラーゼ活性を 1 とした相対値を示す。*; $p < 0.01$

4. 考 察

以上の解析より、転写因子 MafB は、フィラグリン遺伝子上流に同定した ECR2 領域中の MARE-like-1 配列に結合することによって、フィラグリン遺伝子の発現を活性化することが推測される。MafB は、皮膚においては角化細胞のうちの有棘細胞に特異的に発現しており、これはフィラグリン遺伝子の発現が開始する領域であって、フィラグリンと MafB の発現パターンは一致している。このことと併せて、MafB 欠損マウスの皮膚ではフィラグリン遺伝子の発現が顕著に低下していることから、MafB がフィラグリン遺伝子の転写を直接活性化することが示唆される。MafB が生体内で直接フィラグリン遺伝子上流に結合するかどうかを、今後クロマチン免疫沈降法などを用いて調べる必要がある。

また、MafB がフィラグリン以外の遺伝子の発現も制御しているかどうかを調べることも、今後検討すべき重要なポイントのひとつである。興味深いことに、マイクロアレイ解析から、MafB は脂質代謝系の酵素をコードする遺伝子群の発現を負に制御することが示唆された。脂質代謝は、フィラグリンをはじめとする NMF 成分とともに皮膚の保湿やバリア機能にとって重要であることを考えると、NMF と脂質がバランスよく供給されるような仕組みが存在することが予見され、今後新しい研究分野となりうるだろう。

本研究では、フィラグリン遺伝子の発現に重要だと思われるエンハンサー領域として ECR2 を同定したが、ECR2 内には MafB が結合する配列のみならず、皮膚の形成に重要な役割を担っていると考えられるいくつかの転写制御因子が結合しうる配列も見出された。組織特異的な遺伝子の発現は、いくつかの転写因子が組み合わせることによって協調的に活性化されることがしばしば見出されるので、フィラグリンの発現制御においても、MafB がこれらの転写因子群と協調して機能している可能性が十分に考えられる。このようなエンハンサー解析から、NMF の形成や皮膚バリア機能の獲得を担う新規因子 (特に転写制御因子) が特定される可能性が見えてきた。近年、フィラグリンの発現を遺伝子レベルで亢進させるような薬剤が発見され、アトピー性皮膚炎の治療薬として期待されていることから⁶⁾、フィラグリンを含めた皮膚 NMF 関連因子の転写制御機構の解明は今後ますます重要になると考えられる。

(引用文献)

- 1) Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O' Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ,

- Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, Houate BE, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, and McLean WHI. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, 38, 441-446, 2006.
- 2) Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, and Amagai M. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.*, 3, 320-333, 2011.
- 3) Jang S-I, Steinert PM, and Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 24105-24114, 1996.
- 4) Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, and Takahashi S. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 5715-5727, 2006.
- 5) Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Saji F, Hatamura I, Nishikawa K, Takayanagi H, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, Takahashi S, and Kataoka K. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *J. Bone Miner. Res.*, 26, 2463-2472, 2011.
- 6) Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, and Kabashima K. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 133, 139-146, 2014.