

研究題目 リン酸化プロテオーム解析を通じた皮膚バリア破綻に起因する慢性炎症皮膚の病態理解

研究組織

研究代表者：寺林 健（大分大学医学部）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：石崎 敏理（大分大学医学部）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

慢性炎症性皮膚疾患の発症・増悪化の要因の1つとなっているのが、皮膚組織恒常性の喪失（バリア機能異常）である。皮膚角化細胞が形成するバリアは、病原生物やアレルゲン、紫外線や機械的刺激などといった多くの外的刺激から生体を防御する重要な役割を果たしている。この皮膚恒常性が維持されるためには、表皮を構成するケラチノサイトの増殖と分化の均衡が適切に制御されること、つまり、細胞恒常性の維持が必須となる。このことから、ケラチノサイトの細胞恒常性維持に関与するシグナル伝達の解明は、その破綻が惹起する慢性炎症性皮膚疾患の理解に大きく貢献するものとなる。

低分子量G蛋白質Rhoのエフェクター分子の1つであるセリン・スレオニンキナーゼ ROCK には、ROCK1 ならびに ROCK2 の2つのアイソフォームが存在する。患者由来の組織に対するオミックス解析により ROCK の発現減少が慢性炎症性皮膚疾患の増悪化に関与する可能性が示唆されたことから、申請者は皮膚基底細胞特異的 ROCK1/2 ダブルノックアウトマウス (ROCK dcKO マウス) の解析を行っている。ROCK dcKO マウスは脱毛、紅斑、表皮の肥厚、炎症性サイトカインの発現上昇、血清中での IgE 検出といった魚鱗癬様の慢性炎症性皮膚疾患症状を呈する。また、ROCK dcKO マウスは基底膜形成異常を示すため基底細胞におけるインテグリンの活性化が起こらず、接着依存シグナルによるリン酸化カスケードが惹起されない。接着依存シグナルの活性化はケラチノサイトの分化に重要な役割を果たしている。この

ことから、ROCK 依存的なリン酸化カスケードの標的を同定することはケラチノサイト恒常性維持機構の解明に寄与するだけでなく、慢性炎症性皮膚疾患の病態や発症のメカニズムを理解する上でも重要な知見をもたらすと期待される。

[1-2]研究の方法・経過

タモキシフェン誘導全身性 ROCK1/2 ダブルノックアウトマウスを作出し、新生仔から表皮ケラチノサイト初代培養を樹立した。このケラチノサイトに 4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT) 処理することで ROCK をノックアウトし、TMT (tandem mass tag) 標識法と IMAC (immobilized metal affinity chromatography) によるリン酸化ペプチドの精製法を組み合わせ、リン酸化ペプチドの網羅的比較定量解析を行なった。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

予備実験としてタモキシフェン処理時間の検討を行い、全タンパク質のリン酸化と発現量の変動に基づいて処理時間を 48 時間に設定した。この処理時間において DMSO もしくは 4OHT 処理細胞 (各 n=5) に対してリン酸化ペプチドの網羅的解析を行ったところ、Log₂Ratio>|0.5| の変動を示す 684 ペプチド (493 タンパク質) を同定した (p<0.05)。これらに対してパスイェ解析を実施したところ、リン酸化が減少したタンパク質ではアクチン細胞骨格制御以外にも、細胞間接着、細胞基質間接着制御に関わる因子が同定されており、一方でリン酸化が増加するも

のではオートファジーや細胞周期制御関わる因子が同定された。

さらに、 $\text{Log}_2\text{Ratio} > |1.0|$ の変動を示すペプチドに着目したところ、リン酸化は 25 ペプチド (21 タンパク質) で減少、9 ペプチド (8 タンパク質) で増加していた ($p < 0.05$)。リン酸化が減少したものの中には ROCK の基質として知られている MLC や MYPT が含まれており、この他にも潜在的に ROCK の基質となり得る 8 タンパク質が同定された (図 1)。

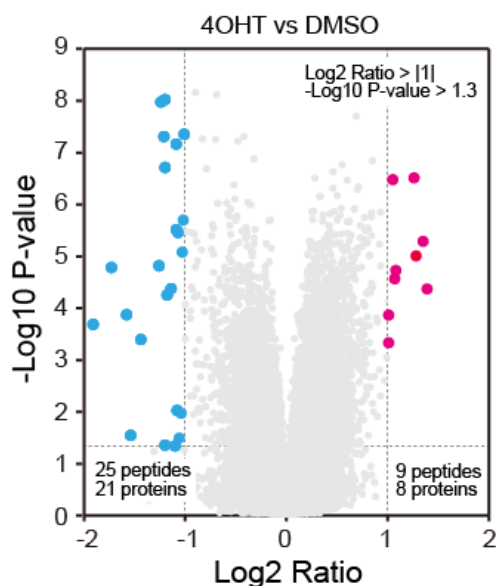


図 1. TMT 法を用いた網羅的定量リン酸化プロテオーム解析による ROCK 経路標的の探索

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究の実施により、表皮ケラチノサイトにおいて ROCK が直接または間接的にそのリン酸化を制御するタンパク質が多数同定された。現在、これらのタンパク質の中からケラチノサイト分化に寄与する可能性の高いものから順に、ROCK によるリン酸化制御ならびにリン酸化状態の変化がケラチノサイトの分化に寄与する可能性について検討を行っている。これに加えて、さらに慢性炎症性皮膚疾患の発症ならびに増悪化に対する影響についても検討を行いたい。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表

寺林 健、小迫 英尊、花田 克浩、佐々木 隆子、

赤嶺 孝祐、石崎 敏理 皮膚恒常性維持に果たす ROCK を介したアクチン再編成の役割 第 96 回日本生化学会大会 シンポジウム 2023 年 10 月 31 日 福岡

[3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

ROCK がどのようにケラチノサイトの分化を制御するのかを明らかにすることができれば、慢性炎症性皮膚疾患の発症機構の解明の一助となるとともに、ROCK が関与する細胞内情報伝達経路が慢性炎症性皮膚疾患治療薬の新規標的になり得ると期待される。また、ROCK の発現調節機構の破綻が慢性炎症性皮膚疾患発症の原因になり得ることから、この機構の解明も必要であると考ええる。