

小皺形成に関わる 皮膚特異的プロテアーゼSASPase活性と加齢との関係

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 終研究室

松 井 毅

The epidermis layer of the skin is composed of basal, spinous, granular, and cornified cell layers. Skin aspartic protease (SASPase) is expressed primarily in the granular layer of human and mouse stratified epithelia. In a previous report, we used high throughput *in situ* hybridization screening to identify the mouse homolog of SASPase. We recently reported that SASPase-deficient hairless adult mice showed characteristic dry-skin like phenotype. In this study, we analyzed the relationship between the mode of activation of SASPase and the aging of skin. In addition, we identified profilaggrin, as one of endogenous substrates of SASPase. Profilaggrin processing activity by SASPase would be an important hallmark of aging of skin.

Copyright 2011 Wiley. Used with permission from Matsui *et al.*, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011.

1. 緒 言

しわのない肌は、若い皮膚の特徴であり、若々しく、美しい肌を長い間維持する事は、精神や気力の充実に大きな影響を与える。皮膚は、表皮・真皮・皮下組織の三つの区画から構成されるが、しわの形成は表皮・真皮の老化が原因である事が明らかにされつつある。加齢に伴う、真皮におけるコラーゲンや弾性繊維等の劣化は大きなしわ（大じわ）の形成を促す事が知られている。一方、表皮における水分蒸発量の変化や表皮柔軟性の変化により目尻等に出現する小じわが誘導されると考えられている¹⁾。大じわの形成機構は、UV照射やFiblin-5欠損マウス²⁾等を用いる事により解析が可能であるが、小じわに関しては、その形成機構は依然として不明な部分が多く、モデルマウスも存在していなかった。我々は、皮膚特異的であり、表皮顆粒層に発現するレトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼSASPase (Skin ASpartic Protease) の欠損マウスを作製し、その体側に小じわが形成される事を発見した³⁾。また、最近、我々は、SASPase 欠損無毛マウスが、小じわのみならず、乾燥肌様表皮を呈する事も明らかにした(図1)⁴⁾。このように、SASPaseは、角質層水分量の調節に関わるプロテアーゼである事が明らかになってきているが、正常なマウス表皮において、加齢と共にSASPaseの活性がどのように変化するか、発現量はどのように変化するか、その比活性はどのように変化するか、など基本的なコス

メに関する問題は明らかになっていない。そこで、本研究課題では、マウスを用いて、SASPaseの活性型定量法の検討と、SASPaseの基質がProfilaggrinである事の証明と、SASPaseによるProfilaggrinの切断部位決定を行い、ヒトにおける活性測定法を将来的に行う為の基盤研究を行った。

2. 実 験

2.1 マウス表皮角質層における前駆体型・活性型SASPaseの検出

無毛マウス (Hos:HR-1、4週齢及び14週齢、雌)の全身の表皮角質層のテープストリッピング(SCOTCH, 3M, Book tape)を1~5回、6~10回行った。得られた角質層をそれぞれ5mlのUrea抽出液(5M urea, 2M thiourea, PBS, 1mM EDTA)を用いて回収し、Amicon-ultra 10kDaを用いて50ulに濃縮した。得られた角質層抽出液をブラットフォード法により蛋白質を定量し、5ugをSDS-PAGEに供した。その後、抗SASPase抗体³⁾(99-217 aaを認識する抗体)を用いてイムノプロットを行い、前駆体型(32kDa)・活性型(15kDa)のSASPaseを検出した。

2.2 SASPase 欠損無毛マウスにおける表皮分化マーカーの発現

SASPase 欠損マウスを無毛マウス(Hos:HR-1)と戻し交配する事で作製したSASPase欠損無毛マウスの皮膚表皮に対してUrea抽出液(5ml)を用いて表皮抽出液を調製し、様々な表皮分化マーカー(Keratin14, Keratin1, Involucrin, Loricrin)に対する抗体(COVANCE社)を用いたイムノプロットを行った。また、Profilaggrinの分解パターンを解析する為に、2.1の方法を用いて、テープストリップ10回分からの抽出液に対して抗Filaggrin抗体(COVANCE社)を用いたイムノプロットを行った。

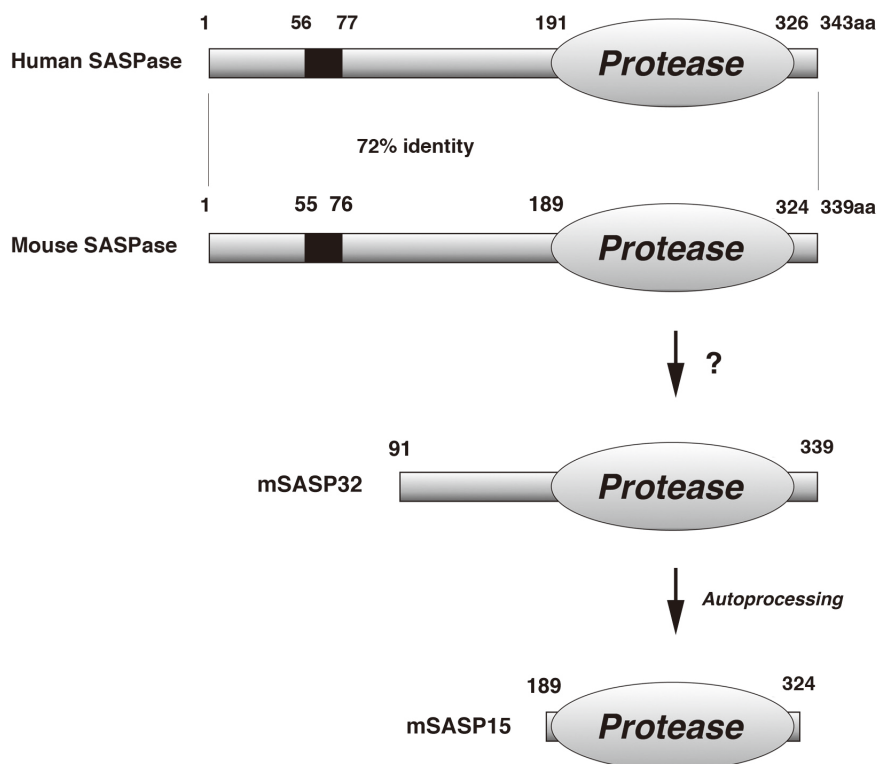


Activity of SASPase in Stratum Corneum and Aging of Skin

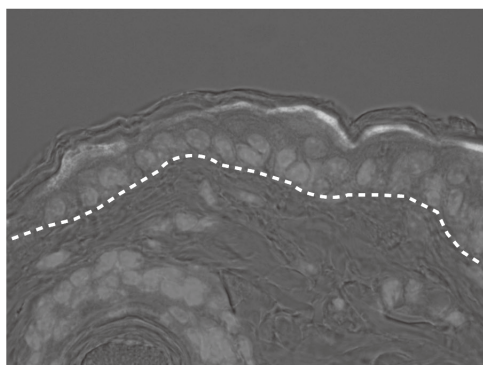
Takeshi Matsui

Hiiragi Laboratory Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University

a



b



c



図1 レトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼ SASPase

(a) ヒト及びマウス SASPase の構造

ヒト及びマウス SASPase は、N 末端側に膜貫通ドメインを持つがその役割は不明である。(黒エリア) また C 末端側にプロテアーゼ活性ドメインを持つが、ヒト・マウス顆粒層において、ヒトでは 28kDa 型 (hSASP28)、マウスでは 32kDa 型 (mSASP32) として細胞質に局在していると考えられる。マウスでは、mSASP32 は 91 – 339aa として存在しており、それらはホモダイマーを形成し、自己分解により活性化し、プロテアーゼドメイン (Protease) のみを産生する。(ヒトでは 14kDa ; hSASP14、マウスでは 15kDa ; mSASP15)

(b) 抗 SASPase 抗体による成体無毛マウス皮膚表皮凍結切片に対する免疫蛍光染色像 SASPase は表皮顆粒層の最上層に発現する。点線；表皮と真皮の境界

(c) SASPase 欠損無毛マウスは、小じわと乾燥肌様表皮を呈する。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011)

2.3 SASPase の内在性基質としての Profilaggrin リンカー配列の in vitro 切断実験

2.2 で得られた結果より、ダイマー・トリマーの Profilaggrin が SASPase 欠損無毛マウスに蓄積していたことから、Profilaggrin リンカー配列が SASPase の基質である可能性が考えられた。そこで、Maltose-binding protein とリンカー配列とヒト Filaggrin の融合蛋白質 (MBP-hFilaggrin) を大腸菌にて発現させ、Maltose resin にて精製を行った。リコンビナントヒト SASPase は GST 融合蛋白質として GST-SASP28 (28 Da 型) を大腸菌にて、発現・精製を行い、5mg/ml の濃度の GST-SASP28 を 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), 700 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Nakarai Tesque) において自己分解反応を 37°C, 60 分間行った。次に、1 ml の 5 mM phosphate buffer (pH 6.0), 70 mM NaCl により希釈した後、200 ml の Glutathione Sepharose 4B ビーズに対して二回素通りさせる事により、活性型ヒト SASPase (14kDa; hSASP14) を精製した。精製した hSASP14 (419 pmol) を 3.6 mM の MBP-hFilaggrin と 100 ml の 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), 0.7 M NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail 中において 37°C, 60 分反応させ 50 μ l の 3 $\times$ SDS sample buffer にて停止させ、10 μ l を SDS-PAGE に供し、それぞれ切断された断片を N 末端アミノ酸シーケンス解析を行い、切断点を決定した。

3. 結果と考察

3.1 マウス表皮角質層における前駆体型・活性型 SASPase 検出法の確立

雌の 4 週齢と 14 週齢の無毛マウス表皮角質層抽出液に対する抗 SASPase 抗体を用いたイムノブロット解析により、角質層において、SASPase の前駆体型 (mSASP32)・活性型 (mSASP15) の両型が存在する事が明らかとなった (図 2)。また mSASP32 と mSASP15 のバンド強度から両者の比率は、活性型 (角質層の表層 (1~5 回のテープストリップ) の方が、多く存在している事が明らかとなった。4 週齢と 14 週齢の間に大きなパターンの違いは認められなかったが、老齢個体においては、発現量の個体毎のばらつきが大きく、定量性の低い Immunoblotting を用いた活性の定量は、困難であると考えられた。一方で、SASPase は角質層上層程、高い活性を示す可能性があり、SASPase の基質切断活性を測定する事で、簡便な活性測定法が検出されると考えられた (図 2)。

3.2 SASPase の内在性基質の同定

そこで、SASPase の内在性基質を決定する事を試みた。我々は、乾燥肌様表皮を示す SASPase 欠損無毛マウスは小じわ形成とともに、乾燥肌様表皮を呈する事を発見していた。このマウスにおいては、SASPase の内在性基質が

分解されずに蓄積し、このような表現系を呈する事が推測される。すなわち、SASPase の内在性の基質を探索し、その基質配列の切断活性を解析する事により SASPase の活性を測定すれば、皮膚老化との関連性を検討できる可能性がある。そこで、SASPase 欠損無毛マウスの表皮抽出液に対して、様々な表皮分化マーカー (Keratin 14, Keratin 1, Involucrin, Loricrin) の免疫蛍光染色とイムノブロットを行った (図 3)⁴⁾。SASPase 欠損無毛マウスにおいては、これらの表皮分化マーカーには異常は認められなかった。しかし、3.1 のような角質層抽出液に対するイムノブロット法によって、バリア蛋白質 Filaggrin の分解パターンが異常になり、異常蓄積している事が明らかになった (図 4)⁴⁾。またイムノブロットのパターンから、SASPase の基質は Profilaggrin のリンカー配列である事が予測された。そこで、リコンビナント Profilaggrin のリンカー配列を SASPase が切断するかどうかを検討した。マウス Profilaggrin のリンカー配列を大腸菌内で発現させようとしたが、十分に発現させる事ができなかった。そこで、ヒト Profilaggrin のリンカー配列とモノマー Filaggrin を MBP との融合蛋白質として大腸菌内で発現・精製し、リコンビナントヒト活性型 SASPase (hSASP14) とともに、その最適 pH である弱酸性条件で、反応させたところ、分解産物 (バンド) が出現した。それぞれのバンドを N 末端アミノ酸シーケンスにより解析し、ヒト SASPase によるヒト Profilaggrin リンカー配列の切断点を決定した。その結果、hSASP14 は MBP-hFilaggrin のリンカー配列の “GSFLY” と “QVSTH” との間を切断する事が明らかと

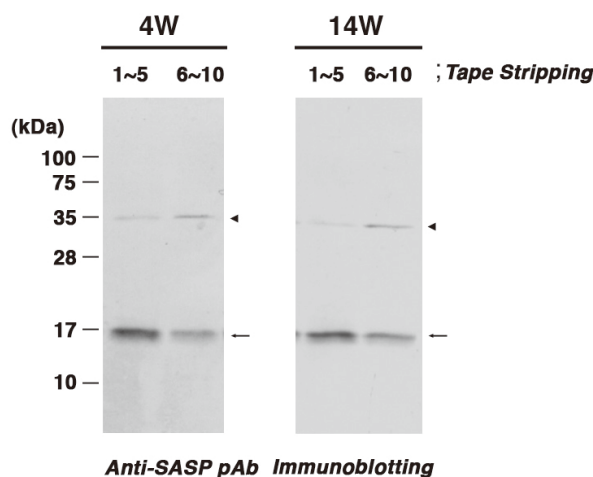


図2 抗 SASPase 抗体を用いたマウス角層抽出液に対するイムノブロット

4 週齢、14 週齢の雌のヘアレスマウスの背中からの 1 ~ 5 回及び 6 ~ 10 回のテープストリッピング (1 ~ 5, 6 ~ 10) の抽出液 (5 μ g) を SDS-PAGE に供し、抗 SASPase 抗体を用いてイムノブロットを行った。角層上層においては、前駆体型 (32kDa; mSASP32; 矢頭) よりも活性型 (15kDa: mSASP15; 矢印) の方が多く存在している。

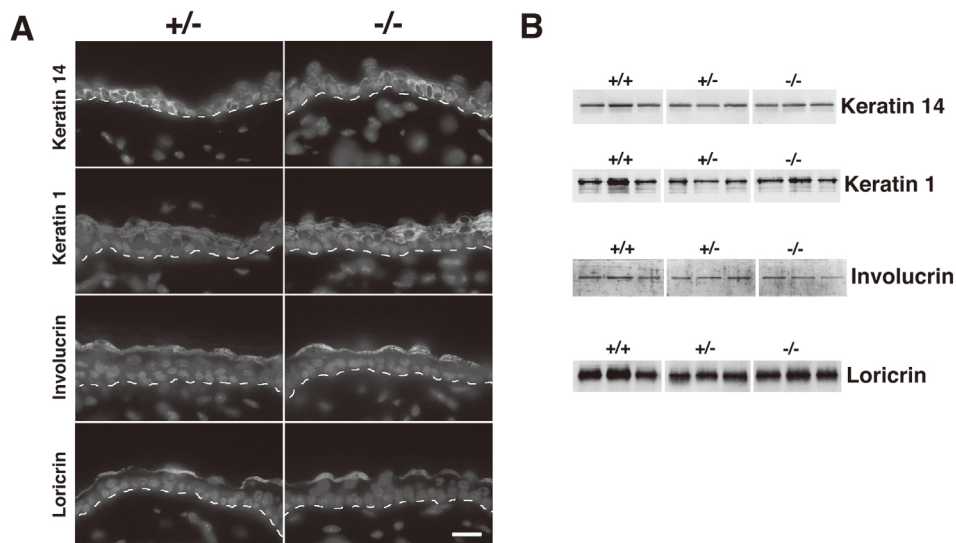


図3 SASPase 欠損無毛マウスにおける表皮分化マーカーの発現

(A) SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの背皮膚の凍結切片に対する抗 keratin 14, keratin 1, Involucrin, Loricrin 抗体による、免疫染色像。これらの表皮分化マーカーは SASP^{-/-} 無毛マウスでは、正常な発現部位を示していた。Scale bar: 10 μ m 点線: 表皮と真皮の境界

(B) SASP^{+/+}, SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの表皮抽出液に対する抗 keratin 14, keratin 1, Involucrin, Loricrin 抗体による、イムノブロット。これらの表皮分化マーカーは SASP^{-/-} 無毛マウスでは正常な発現量を示していた。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011).

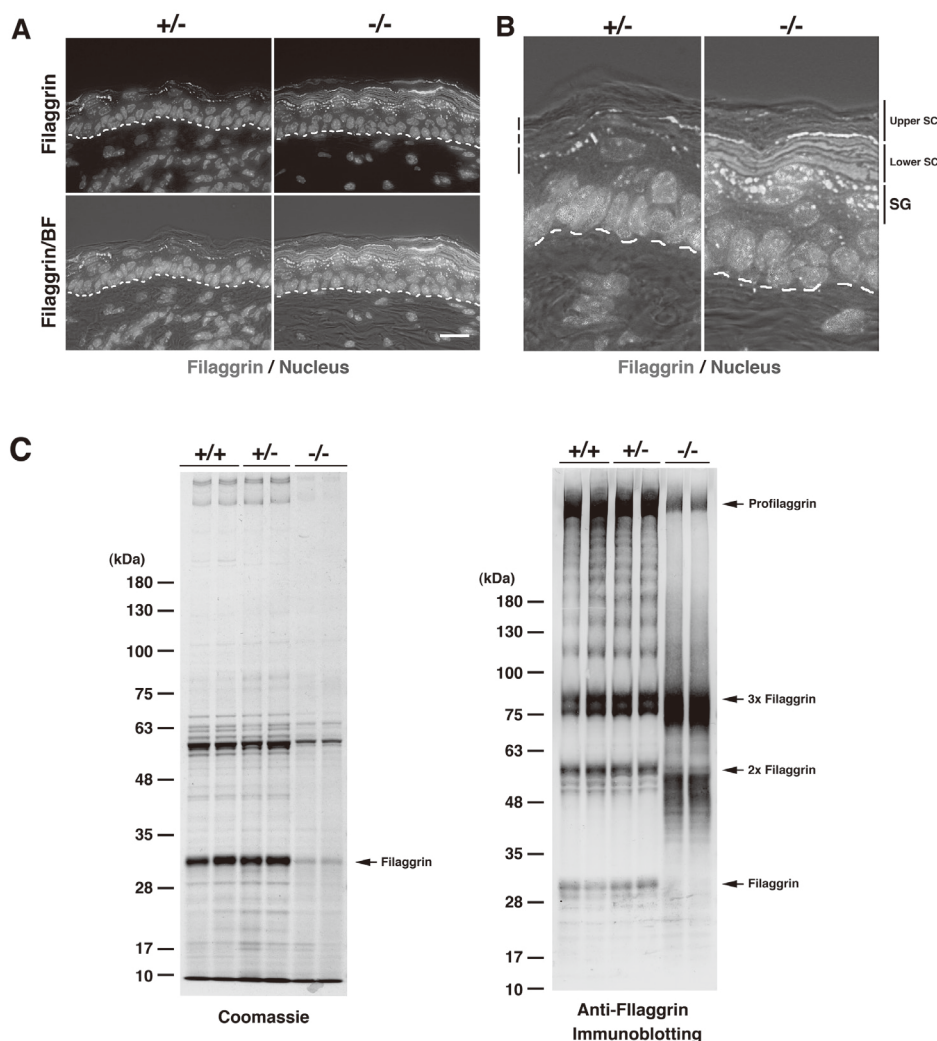


図4 SASPase 欠損無毛マウスにおける Filaggrin の発現

(A, B) SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの背皮膚の凍結切片に対する抗 Filaggrin 抗体による免疫染色。(核は Bisbenzimidide により染色した。) Filaggrin (核の上部のシグナル) は SASP^{-/-} 無毛マウスでは、角質層下層部分 (Lower SC) に濃縮していることが明らかとなった。Scale bar: 10 μ m、点線: 表皮と真皮の境界

(C) 無毛マウスの表皮のテープストリップ抽出液に対するクマシー染色と抗 Filaggrin 抗体による、イムノブロット。Filaggrin は、SASP^{+/+} では Profilaggrin から段階的にリンカーが切断され、トリマー、ダイマー、モノマーへと分解されていくパターンが検出されているが、SASP^{-/-} 無毛マウスではトリマー、ダイマーからスミアになるパターンが検出された。この事は、SASP^{-/-} マウスにおける角質層下層における蓄積は、Profilaggrin の分解異常によるトリマー、ダイマーの蓄積が原因と考えられた。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011).

なり、ヒトProfilaggrinのリンカー配列を特異的にSASPaseが切断する事が明らかとなった。切断点のN末端側配列は既に報告されているヒト精製Filaggrinの質量分析解析において、ピログルタミン酸化されていたQに相当する事から、本来のProfilaggrinの切断部位であると考えられる(図5)^{5, 6)}。

以上のようなSASPaseに対する新規基質Profilaggrinの同定によって、その切断部位の基質peptideを設計する事により、検出感度の高いSASPase活性検出法を構築でき

る可能性がある。また、Filaggrinはアトピー性皮膚炎発症の最大の疾患素因とされている事⁷⁾から、この活性検出法によって角質層バリアー構築とSASPase活性との関連性にも手がかりを与えられられる。その結果と3.1に示したようなhSASP14/hSASP28の存在比を統合する事により、皮膚の老化・小じわ形成・乾燥肌といったコスメトロジーに重要な現象の定量的指標を構築できる可能性が本研究により示された。

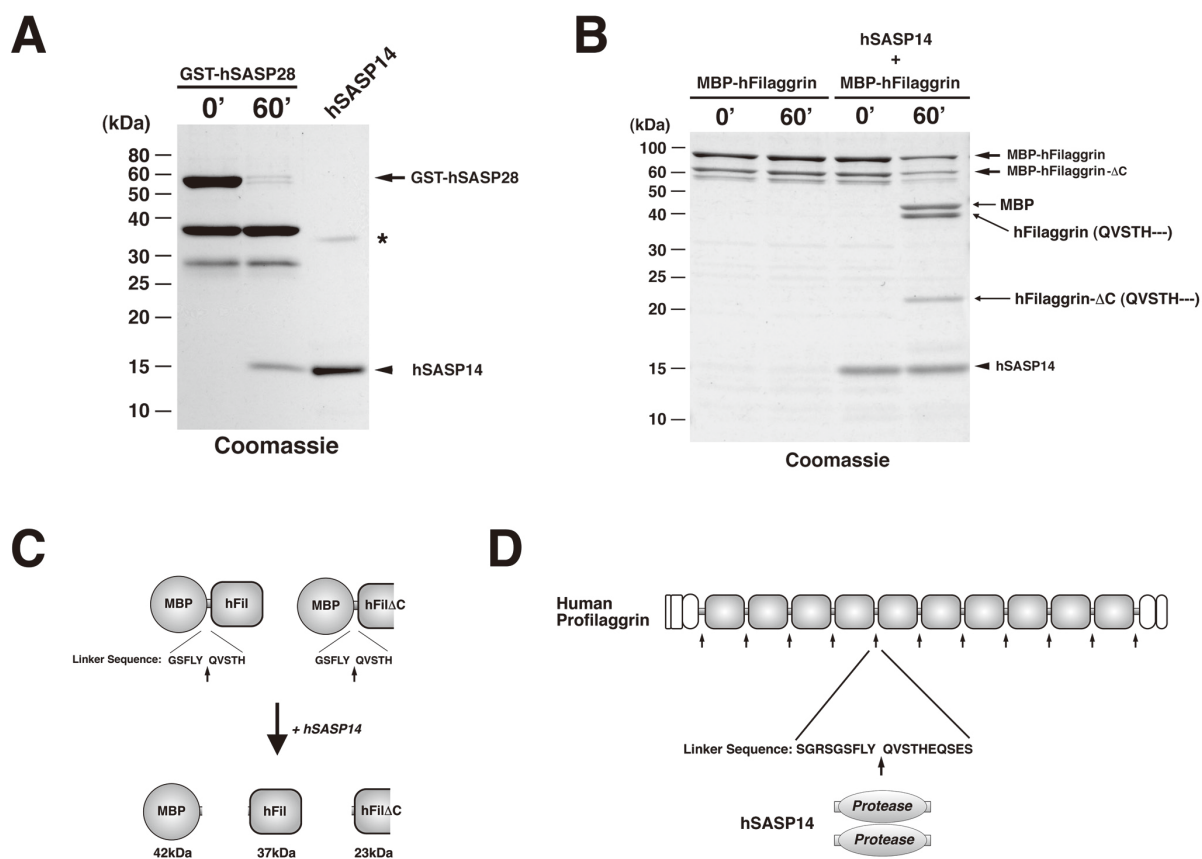


図5 リコンビナント活性型ヒトSASPase (hSASP14) はProfilaggrinのリンカー配列を *in vitro* で切断する。

(A) GST-SASP28からの自己分解活性によるhSASP14の産生と精製

精製したGST-SASP28(矢印)を700mM NaCl存在下で、0分、60分間、pH6.0の条件下でインキュベートした。GST-SASP28は自己分解反応を行い、hSASP14を産生した(矢頭)。切断されたGST融合蛋白質は、グルタチオンビーズにより除かれ、hSASP14が精製された。ダイマーのhSASP14のバンドもわずかながら検出されている(*)

(B) hSASP14によるProfilaggrinリンカー配列の切断

精製したMBP-hFilaggrin(C末がtruncateされた産物も含む:MBP-hFilaggrin-ΔC)をhSASP14存在下・非存在下で700mM NaCl, pH6.0の条件下で60分間インキュベートした。その結果MBPとhFilaggrinとの間のリンカー配列が切断され、MBP(42kDa)、hFilaggrin(37kDa)、hFilaggrin-ΔC(23kDa)が産生されている事が、各バンドのN末端アミノ酸配列解析により明らかになった。

(C) (B)の実験における切断様式の模式図

(D) ヒトSASPaseによるヒトProfilaggrinリンカー配列の切断の模式図

ホモダイマーを形成したhSASP14はProfilaggrinリンカーのGSFLY-QVSTHの間を切断する事が明らかとなった。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol.Med.* 3:320-333, 2011)

(引用文献)

- 1) Imokawa G, Takema Y: Analysis of etiologic factors involved in stratum corneum function in fine wrinkle formation and its prevention, *Frag J.*, 20, 29-42, 1992.
- 2) Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y et al.: Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo, *Nature*, 415, 171-5, 2002.
- 3) Matsui T, Kinoshita-Ida Y, Hayashi-Kisumi F et al.: Mouse homologue of skin-specific retroviral-like aspartic protease involved in wrinkle formation, *J Biol Chem*, 281, 27512-27525, 2006.
- 4) Matsui, T., Miyamoto, K., Kubo, A. et al.: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 3 : 320-333, 2011.
- 5) Thulin CD, Taylor JA, Walsh KA Microheterogeneity of human filaggrin: analysis of a complex peptide mixture using mass spectrometry. *Protein Sci* 5 : 1157-1164, 1996.
- 6) Thulin CD, Walsh KA Identification of the amino terminus of human filaggrin using differential LC/MS techniques: implications for profilaggrin processing. *Biochemistry* 34 : 8687-8692, 1995.
- 7) Brown SJ, McLean WH One remarkable molecule : filaggrin. *J Invest Dermatol* 132 : 751-762, 2012.