

酵母を利用した組み換えヒト型セラミド生産系の開発

広島大学大学院生物圏科学研究科

船戸 耕一

Yeast has been widely and successfully used to produce polypeptides, enzymes, vitamins, and lipid components of high commercial interest. Here we describe progress using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an industrial organism for production of human-type ceramides. The yeast cells do not synthesize sphingolipids desaturated at the $\Delta 4$ -position of the dihydrosphingosine, which are found in many eukaryotic organisms including humans. Instead, they produce sphingolipids hydroxylated at the C-4 position. Therefore in order to 'humanize' ceramide biosynthesis in the yeast, it is necessary to eliminate endogenous yeast ceramide biosynthetic pathway and introduce a heterologous *DES1* gene encoding a sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase. Indeed, the resultant yeast strain was capable of synthesizing $\Delta 4$ -desaturated sphingolipids. Furthermore, we observed that the engineered yeast can produce a human-type ceramide, ceramide NS. Since ceramides play a critical role in maintaining the permeability barrier function of the skin, the yeast-derived human-type ceramide could be used for clinical applications to improve the impaired barrier function seen in several skin diseases including atopic dermatitis.

1. 緒言

皮膚の最外層には、水分を保持する保湿機能と外部刺激から肌を保護するバリア機能を司る角質層という組織が存在する。角質層は角質細胞と天然保湿因子、そして細胞間脂質から構成されているが、その中でも特に細胞間脂質の約半分を占めるセラミドが、それらの機能に極めて重要な役割を担っている。例えば、アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症に共通する特徴は保湿能の著しい低下であるが、その主因は脂質代謝酵素異常によるセラミド量の減少であることが知られている。またセラミドはバリア機能の増強・美白作用やメラニンの生成を抑制する作用があることも示唆されている。セラミドは外部から補給することが可能な物質である。そのため近年では、乾燥敏感肌を伴う皮膚疾患に対する治療薬あるいは化粧品・美容健康食品の素材として大変注目されている。実際、化粧品に関しては、セラミドを配合した多くの製品がすでに市販されている。セラミドの原料としては、これまで牛などの動物由来のものが使われていたが、感染症の問題が指摘され、現在では米、小麦、大豆や芋などの植物性セラミドが主流である。しかし、植物性セラミドはヒトのセラミドと構造が異なる上に生産性が低いことから、それらを克服することが可能な新しい生産技術の開発が強く望まれている。本研究では、酵母のセラミドの合成および代謝システムを巧く制御することに

より、ヒトの皮膚に対して最も安全で高い効果が期待されるヒト型セラミドを効率的に生産するシステムを開発することを目的とした。

2. 実験

2.1 *hDES1* (ヒト由来の *DES1*) 遺伝子発現ベクターと破壊株の作製

ヒト cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物の制限酵素サイトを利用して酵母用遺伝子発現ベクターにクローニングした。またタンパク質の発現チェック用として、N 末端に HA および GFP が融合した *hDES1* 遺伝子発現ベクターも作製した。酵母破壊株の作製は PCR を用いた遺伝子置換法を用いた。YDp プラスミドを鋳型として PCR を行い、標的遺伝子の上流 - 選択マーカー遺伝子 - 下流が連結した PCR 産物を得た。形質転換を行い、栄養要求性培地で形質転換体を選抜し標的遺伝子の破壊株を得た。

2.2 放射能標識 [^3H] myo-inositol および [^3H] sphingosine を用いたイノシトール含有スフィンゴ脂質の解析

野生株、各遺伝子破壊株を SD 培地で 25°C、一晚振盪培養した後、イノシトールを含まない SD あるいは含有 SD 懸濁液 0.5 ml (菌体重量 50 mg) を調製した。ラベル時の温度で 10min 間プレインキュベーションした後、[^3H] myo-inositol (15 μl , 15 μCi) (図 2A) または [^3H] sphingosine (8 μl , 4 μCi) (図 2B) 加え、30°C で 2 時間 ([^3H] myo-inositol) あるいは 37°C で 3 時間 ([^3H] sphingosine) インキュベーションした。10mM の非標識 PHS は、最終濃度が 100 μM になるように、プレインキュベーションの前に加えた (図 2A)。250mM の NaF と 250mM の NaN₃



Genetic engineering for synthesis of human ceramides in yeast

Kouichi Funato

Graduate School of Biosphere Science,
Hiroshima University

を 20 μ l 加え、反応を停止させた後、氷冷した滅菌水で 3 度洗浄し、菌体を 66 μ l の滅菌水に懸濁させた。懸濁液にグラスビーズを加え、激しく攪拌することにより菌体を破碎した。これにクロロホルム、メタノール、懸濁液の比が 10:10:3 になるようにクロロホルム、メタノールを加え、脂質を抽出した。抽出液の遠心分離を行い、得られた上清を回収した後、窒素ガスを吹き付けて濃縮乾燥させた。試料を 100 μ l のクロロホルム-メタノール-水 (10:10:3) に溶解し、0.6N NaOH メタノール溶液を 20 μ l 加え、30

℃で 90min 間反応させた後、0.6N 酢酸溶液で中和させた。ブタノール抽出により塩を除去し、得られたブタノール層を窒素ガスにより濃縮乾燥させた。脂質を 20 μ l のクロロホルム-メタノール-水 (10:10:3) に溶解させ、薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール-4.2N NH₄OH (9:7:2) で展開した¹⁾。展開後、放射能標識スフィンゴ脂質をバイオイメージアナライザー (BAS) で解析した。

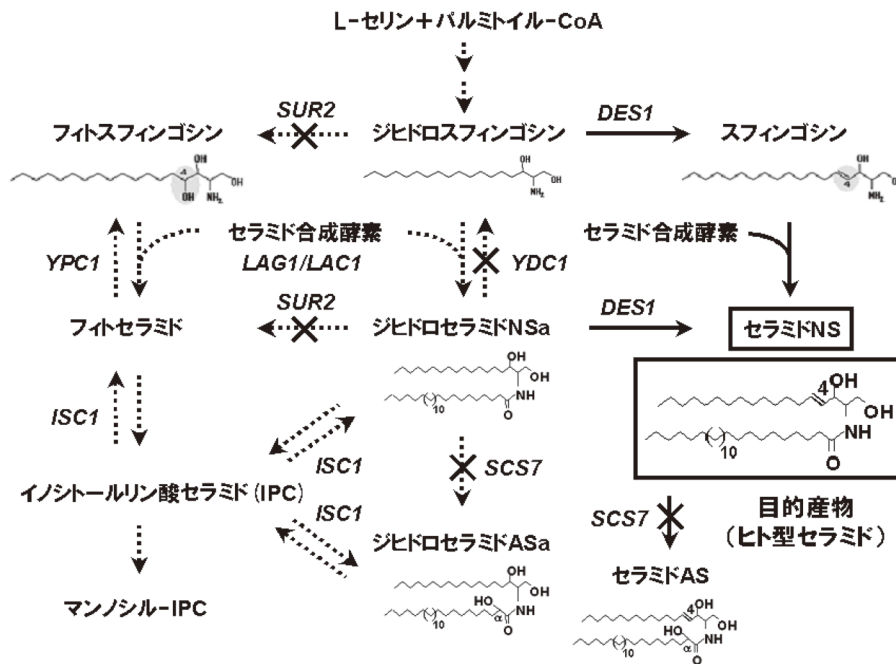


図1 酵母のスフィンゴ脂質合成経路 (.....) とヒト型セラミドの産生経路 (——)

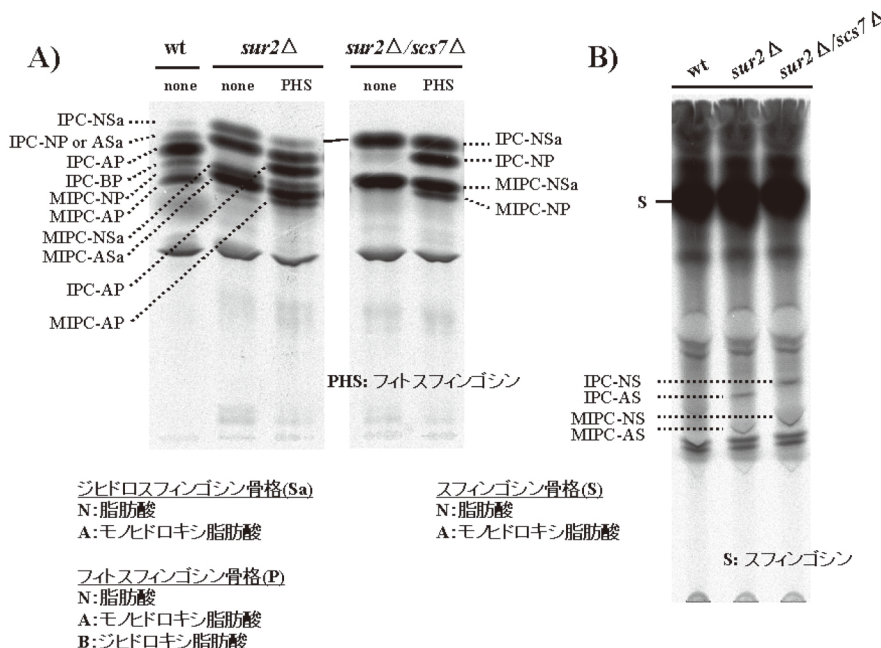


図2 出芽酵母におけるヒト型スフィンゴ脂質の合成活性能力

2.3 hDES1 タンパク質の発現解析

野生株、N末端にHAが融合した *hDES1* (*HA-hDES1*) 遺伝子発現ベクターを形質転換した *sur2* 破壊株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、マイクロソーム画分を調製した²⁾。マイクロソーム画分を遠心(100,000g×60min)し、可溶性画分(S)と膜画分(P)を分離した。SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、マウス抗HAモノクローナル抗体を用いてウエスタン解析した(図3)。

2.4 ニンヒドリン試薬を用いたスフィンゴイド塩基の解析

sur2 遺伝子破壊株および *hDES1* 遺伝子発現ベクターを形質転換した株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、SD懸濁液0.5ml(菌体重量50mg)を調製した。30℃で2時間インキュベーションした後、氷冷した滅菌水で3度洗浄し、菌体を66μlの滅菌水に懸濁させた。上述したように、菌体を破碎、脂質を抽出・濃縮乾燥した後、200μlのメタノール-5N HCl(9:2)混合液を加え、80℃で1時間インキュベーションした。再度、濃縮乾燥させた後、ブタノール抽出、脂質の濃縮乾燥を行った。脂質を20μlのクロロホルム-メタノール-水(10:10:3)に溶解させ、TLCプレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール-2.5N NH₄OH(40:10:1)で展開した³⁾。TLCプレートにニンヒドリン試薬(0.2%ニンヒドリンエタノール溶液)を噴霧、100℃で数分間加熱し、スフィンゴイド塩基を解析した(図4)。スタンダードとして、50nmol(10mMの5μl)の精製品(S, DHS, PHS)を用いた。

2.5 放射能標識 [³H] DHS を用いたセラミドの解析

sur2 遺伝子破壊株および *hDES1* 遺伝子発現ベクターを形質転換した株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、SD懸濁液5ml(0.5OD₆₀₀units, 0.1 OD₆₀₀/ml)を調製した。³H DHSを10μl(10μCi)加え、25℃で24時間培養した。250mMのNaFと250mMのNaN₃を200μl加え、反応を停止させた後、氷冷した滅菌水で3度洗浄し、菌体を66μlの滅菌水に懸濁させた。上述したように、菌体を破碎、脂質を抽出・濃縮乾燥した後、NaOH処理、ブタノール抽出、脂質の濃縮乾燥を行った。脂質を20μlのクロロホルム-メタノール-水(10:10:3)またはクロロホルム-メタノール(10:10)に溶解させ、あらかじめborate(70mM Na₂B₄O₇·10H₂Oメタノール溶液)で30min間処理し乾燥させたTLCプレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール(9:1)で展開した⁴⁾。展開後、放射能標識セラミドをBASで解析した(図5A, 5B)。

3. 結果と考察

ジヒドロスフィンゴシン(DHS)生合成以降の反応は高等動物細胞と酵母の間で大きく異なる。宿主として用いる出芽酵母にはスフィンゴイドΔ4-デサチュラーゼ遺伝子 *DES1* が存在しないことから、スフィンゴシンを骨格にもつヒト型セラミドは合成されない(図1)^{3,5-6)}。その代わり *sur2* 遺伝子がコードする酵素によってDHSのC-4位が水酸化されフィトスフィンゴシン(PHS)が合成される。次いでそれらのスフィンゴイド塩基DHSとPHSは、それぞれジヒドロセラミドとフィトセラミドに変換さ

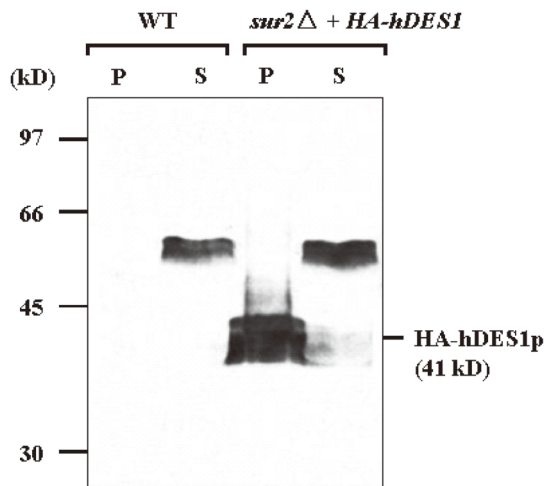


図3 出芽酵母におけるhDES1タンパク質の発現

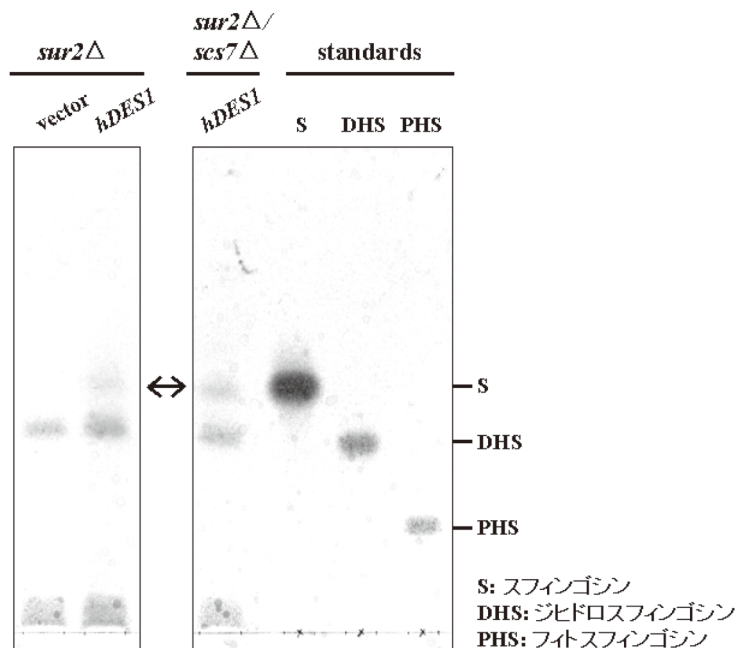


図4 *hDES1* 遺伝子導入によるスフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質の産生

れる。そのためヒト型セラミドを酵母で合成させるためには、酵母特有の PHS とフィトセラミドの両方が合成されないように細工をし、*DES1* 遺伝子を酵母に導入する必要があると考えられる。もし酵母のセラミド合成酵素がスフィンゴシンあるいは *DES1* タンパク質がジヒドロセラミドを基質として認識することができるならば、スフィンゴシンを骨格にもつヒト型セラミドが酵母で合成されるはずである。本研究では、酵母の *SUR2* 遺伝子を破壊した株をベースにし、ヒト由来の *DES1* (*hDES1*) 遺伝子を導入することによってヒト型セラミドが産生されるかどうかについて解析を行った。

3.1 外因性基質によるヒト型スフィンゴ脂質の合成活性

SUR2 遺伝子がコードする酵素 C4-ヒドロキシラーゼは、DHS またはジヒドロセラミドの C4 位に水酸基を導入する触媒活性をもつ。従って、その遺伝子破壊株は、C4 位が水酸化された PHS 骨格をもつイノシトール含有スフィンゴ脂質、イノシトールリン酸セラミド (IPC-NP, IPC-AP, IPC-BP; N: 脂肪酸鎖, A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖, B: ジヒドロキシ脂肪酸鎖, P: フィトスフィンゴシン骨格) とマンノシル-IPC (MIPC-NP, MIPC-AP) を合成することができない (図 2A)。この *sur2* 破壊株に細胞外から PHS を供給させると、PHS 骨格をもつ IPC-AP と MIPC-AP が合成される。このことは、内因性のスフィンゴイド塩基と同様に、細胞内に取り込まれた外因性スフィンゴイド塩基もセラミドの合成を経てイノシトール含有スフィンゴ脂質へ変換されることを示している。

ヒト型スフィンゴイド塩基 (スフィンゴシン) をセラミドに変換させる能力が酵母にあるかどうかは不明である。

そこで、放射能標識 [³H] スフィンゴシンを用いて、外因性スフィンゴシンがイノシトール含有スフィンゴ脂質に変換されるかどうか解析を行った。*sur2* 破壊株に [³H] スフィンゴシンを加えると、スフィンゴシン由来の 2 つの特異的な脂質が検出された (図 2B)。比較的穏やかな NaOH 処理後に検出されることから、この 2 つの脂質はアミド結合を有するスフィンゴ脂質であり、それらの移動度からそれぞれ IPC-AS と MIPC-AS (A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖, S: スフィンゴシン骨格) であると推定された。一方、野生株ではそれらの脂質はほとんど検出されない。これは、おそらく野生株で作られる PHS あるいはフィトセラミドとの競合が原因であると考えられる。これらの結果は、細胞内でスフィンゴシンが合成されれば、スフィンゴシン骨格をもつヒト型セラミドが *sur2* 破壊株で合成される可能性を示している。また *SUR2* 遺伝子の破壊がヒト型セラミドの合成のための必須な条件であることも示唆している。

酵母には、C4-ヒドロキシラーゼ *SUR2* タンパク質以外に、スフィンゴ脂質の脂肪酸の α 位に特異的に作用する α -ヒドロキシラーゼの存在が知られている。この酵素をコードする遺伝子は *SCS7* であり、この遺伝子の破壊株はスフィンゴ脂質の脂肪酸の α 位に水酸基を導入することができない (図 1)。上述したように、*sur2* 破壊株では PHS を骨格にもつスフィンゴ脂質は合成されないが、*SCS7* タンパク質の作用により 2 種類の異なった脂肪酸鎖 (N: 脂肪酸鎖, A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖) を有するセラミド (Cer-NSa, Cer-ASa) とイノシトール含有スフィンゴ脂質 (IPC-NSa, IPC-ASa, MIPC-NSa, MIPC-ASa) が合成される (図 2A)。酵母でヒト型セラミドを効率的に生産させるためには、またその後の抽出と精製を容易にさせる

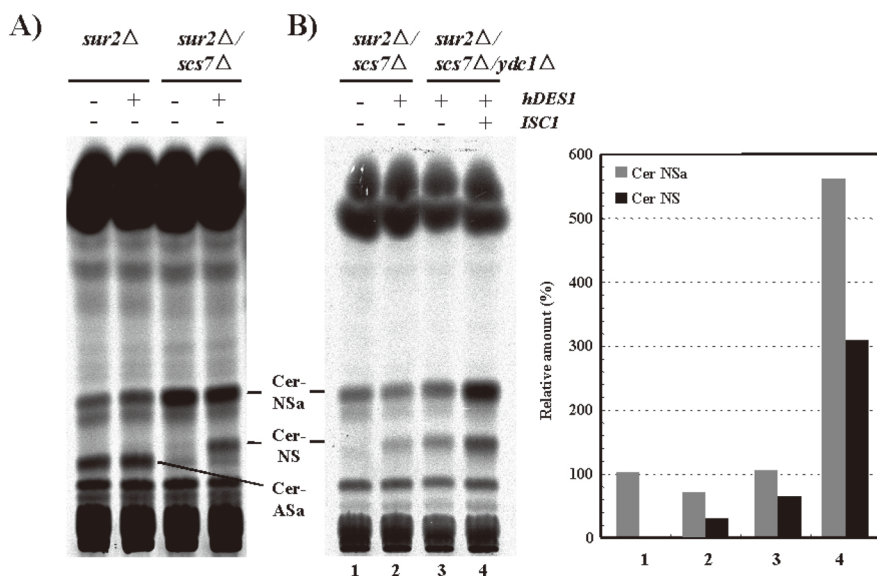


図5 *hDES1* 遺伝子導入によるセラミド NS の産生と *YDC1* 破壊及び *ISC1* 過剰発現の影響

には、基質となるセラミドの種類が少ないほうがより効果的であると考えられる。そこで、モノヒドロキシ脂肪酸鎖からなるスフィンゴ脂質 (Cer-ASa, IPC-ASa, MIPC-ASa) が合成されない *sur2 scs2* 二重破壊株 (図 2A) においても、上記と同様の実験を行った。その結果、*sur2* 単独破壊でみられたスフィンゴ脂質と移動度の異なる 2 つのスフィンゴ脂質が観察された (図 2B)。SCS7 タンパク質の機能とその移動度から推察するに、この 2 つの脂質はそれぞれ IPC-NS と MIPC-NS であると考えられる。以上の結果は、*sur2* 破壊株と同様に、細胞内でスフィンゴシンが合成されれば、スフィンゴシン骨格をもつヒト型セラミドが *sur2 scs2* 破壊株で合成される可能性を示している。

3.2 hDES1 タンパク質の発現解析

hDES1 タンパク質が酵母の細胞内で発現されるかどうかについて調べるため、N 末端に HA が融合した *hDES1* 遺伝子発現ベクターを *sur2* 破壊株に形質転換し、可溶性画分と膜画分を調製した後、それらの画分をウエスタン解析した。その結果、HA 融合 hDES1 タンパク質の殆どは膜画分に存在し、酵母内で hDES1 タンパク質が膜タンパク質として発現していることが確認できた (図 3)。また蛍光顕微鏡により GFP 融合 hDES1 タンパク質の発現も確認できた (data not shown)。

3.3 hDES1 遺伝子導入によるヒト型スフィンゴ脂質の産生

sur2 破壊株と *sur2 scs7* 破壊株に *hDES1* 遺伝子を導入することによって、スフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質が合成されるかどうかについて解析を行った。形質転換した株から脂質を抽出、塩酸で処理 (スフィンゴ脂質のアミド結合を分解) した後、得られた全スフィンゴイド塩基をニンヒドリン試薬で分析した。その結果、*hDES1* 遺伝子を形質転換した両方の株からスフィンゴシンが検出された (図 4)。コントロールベクターを形質転換した *sur2* 破壊株では、スフィンゴシンは検出されない。これらの結果は、*hDES1* を導入した *sur2* 破壊株および *sur2 scs7* 破壊株において、スフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質が合成されていることを示しており、ヒト型セラミドが産生されている可能性を強く示唆している。

次に実際に、ヒト型セラミドが産生されているかどうかについて解析を行った。TLC を用いたセラミド分子種の分離の方法についてはこれまでいくつか報告がある。そのなかで Cer-NSa と Cer-NS を分離することが可能な方法を用いて、ヒト型セラミドの産生評価を行った。その結果、*hDES1* 遺伝子を形質転換した *sur2 scs7* 破壊株において、Cer-NSa とはあきらかに移動度の異なる脂質が検出された (図 5A)。この脂質は、ベクターのみを形質転換

したコントロール株では検出されない。また *sur2* と *scs7* の両方の遺伝子を破壊させた株に *hDES1* 遺伝子を導入したときのみ観察され、*sur2* 単独破壊株においては認められなかった。更に放射能標識 [³H] sphingosine でラベルした *sur2 scs7* 二重破壊株において検出されたセラミド分子と同じ移動度を示すこと、この脂質の合成がセラミド合成阻害剤である australifungin により阻害されたことから (data not shown)、Cer-NS であると考えられる。これは、*hDES1* 遺伝子を形質転換した *sur2 scs7* 二重破壊株で産生されたセラミドの主なものが Cer-NSa と Cer-NS であるという LC-MS/MS の解析結果とも一致している (data not shown)。

そこで、この評価系を用いて、アルカリジヒドロセラミダーゼをコードする *YDC1* 遺伝子 (図 1 参照) の破壊およびイノシトールホスホスフィンゴ脂質ホスホリパーゼ C をコードする *ISCI* 遺伝子 (図 1 参照) の過剰発現の影響について解析を行った。その結果、*sur2 scs7* 二重破壊株の Cer-NSa を 100% とした場合、二重破壊の Cer-NS は 30%、*sur2 scs7 ydc1* 三重破壊株で 64%、*ISCI* を高発現させた *sur2 scs7 ydc1* 三重破壊株で 309% と順次増加した (図 5B)。以上の結果は、*hDES1* 遺伝子を *sur2 scs7* 二重破壊株に導入することによって、ヒト型セラミドである Cer-NS が産生されること、および Cer-NS を酵母で効率的に産生させるには *YDC1* との三重破壊と *ISCI* の高発現が有効であることを示唆している。

4. 総括

本研究では、まず *hDES1* 遺伝子を *sur2* 破壊株および *sur2 scs7* 二重破壊株に形質転換させるとスフィンゴシン骨格を有するスフィンゴ脂質が合成されることが示された。また *hDES1* 遺伝子を *sur2 scs7* 二重破壊株に形質転換させることによりヒト型セラミドである Cer-NS が産生されること、Cer-NS をより効率的に産生させるには *YDC1* との三重破壊と *ISCI* の高発現が有効であることが示唆された。以上の結果より、出芽酵母を用いてヒト型セラミドを産生する基盤的システムが構築できたといえる⁷⁾。今後、この Cer-NS 合成システムをより効果的なシステムに最適化することにより、実用化可能なシステムの開発が期待される。

謝辞

本研究に対してご支援を頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。また本研究の遂行にご尽力頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科とサントリー株式会社先進コア技術研究所の共同研究者の皆様にも厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) Zanolari B, Friant S, Funato K, et al. : Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 19, 2824-2833, 2000.
- 2) Funato K, Lombardi R, Vallee B, et al.: Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 278, 7325-7334, 2003.
- 3) Haak D, Gabel K, Beeler T, et al.: Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p, J. Biol. Chem., 272, 29704-29710, 1997.
- 4) Triola G, Fabrias G, Dragusin M, et al: Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-[(1R, 2S)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2- (2-tridecyl-1-cyclopropenyl) ethyl]octanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons, Molecular Pharmacology, 66, 1671-1678, 2004.
- 5) Funato K, Vallee B, Riezman H: Biosynthesis and Trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Biochemistry, 41, 15105-15114, 2002.
- 6) Ternes P, Franke S, Zahringer U, et al.: Identification and characterization of a sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase family, J. Biol. Chem., 277, 25512-25518, 2002.
- 7) 児玉由紀子、永野秀昭、船戸耕一、形質転換酵母を用いるセラミドの製造方法、特願 2005-351366