

# 皮膚表皮保湿成分セラミドの脂質シグナリング分子としての作用メカニズムの解明

九州大学大学院理学研究院化学部門

谷 元 洋

Ceramide, the backbone of membrane sphingolipids, is now recognized as an intracellular lipid second messenger that regulates various signal transduction systems including apoptosis. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, accumulation of intracellular ceramide causes strong growth defect. In this study, we screened yeast mutant strains showing abnormal sensitivity against ceramide accumulation. It was found that deletion of *IRA2* gene encoding GTPase-activating protein or *PDE2* gene encoding cyclic AMP phosphodiesterase, which negatively regulate Ras-cAMP-PKA signaling pathway, causes high sensitivity against the growth inhibition induced by ceramide accumulation. On the contrary, deletion of *RAS2* gene encoding small GTPase causes resistance against the growth inhibition. These results suggested functional relationship between ceramide signaling and Ras-cAMP-PKA pathway.

## 1. 緒 言

皮膚表皮の角質層には、水分漏出を防止する脂質バリアが存在する。この脂質バリアの構成成分の半分以上を占めているのがセラミドであり、セラミドは近年では化粧品成分としても大変注目されている（セラミドは、生体膜脂質二重層を構築するスフィンゴ脂質の疎水性部分に相当する構造である（Fig. 1））。一方で、セラミドは細胞内において微量に生成されることによって、細胞死（アポトーシス）、細胞分化、細胞増殖を制御する細胞内脂質シグナリング分子として機能することが、多くの文献によって報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら、セラミドのシグナリング分子としての分子レベルでの作用メカニズムに関しては、不明瞭な点が多く混沌としているのが現状である。本研究では、セラミドシグナリングの分子メカニズム解明を目的とし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として用いた解析を試みた。

## 2. 実 験

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質は、イノシトールリン酸を頭部に持ったイノシトールホスホリルセラミド（IPC）を基本構造としており、これにマンノース、さらにイノシトールリン酸が付加したMIPC、M(IP)<sub>2</sub>Cが存在する（Fig. 2）。これらは哺乳動物におけるスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質に相当すると考えられている。酵母においてセラミドをIPCに変換する酵素（Aur1p）は生存に必須であり、

その特異的阻害剤である Aureobasidin A（AbA）、または Aur1p の発現抑制によって、強力な生育阻害が引き起こされることが知られている。この生育阻害の原因は、①中間代謝産物であるセラミドの細胞内蓄積と、②複合スフィンゴ脂質（IPC, MIPC, M(IP)<sub>2</sub>C）の減少であると考えられている。研究代表者らは、以前に AbA が誘導する生育阻害に対して、高感受性を示す酵母遺伝子変異株を 18 株、及び抵抗性を示す酵母遺伝子変異株を 1 株同定している<sup>2, 3)</sup>。これらの変異株の解析を通して、セラミドの脂肪酸鎖の鎖長が変化することで、その細胞毒性が顕著に変化することを明らかにした<sup>3)</sup>。また、セラミドの長鎖塩基部分の C4 位の水酸基が消失することで、セラミドの毒性が減少すること、一方で脂肪酸部分の  $\alpha$ -水酸化がなくなるとセラミドの毒性が上昇することを明らかにした<sup>4)</sup>。このように、特定の酵母変異株の Aur1p 阻害剤に対する感受性の変化を調べることで、セラミドの構造と生理機能の相関関係が明らかとなってきた。

本研究で研究代表者らは、テトラサイクリン調節プロモーター<sup>5)</sup>を組み込むことでドキシサイクリンによって Aur1p の発現抑制が可能な酵母変異株 (*tet-AUR1* 株) を用いて、Aur1p 発現抑制が誘導する生育阻害に対して、高感受性を示すような変異遺伝子の探索を試みた。探索には、酵母非必須遺伝子約 4800 個がそれぞれ破壊された酵

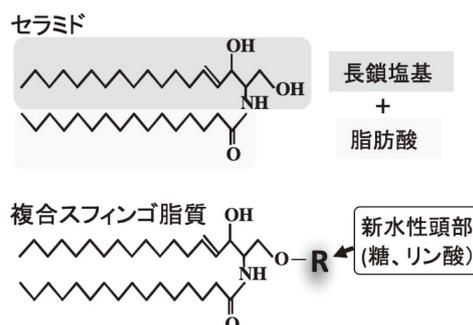


Fig. 1 スフィンゴ脂質の基本構造



Molecular mechanism of moisturizing factor, ceramides, as a lipid signaling molecule

Motohiro Tani

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

母遺伝子ノックアウトライブラリー<sup>6)</sup>を用いた。酵母遺伝子ノックアウトライブラリーのそれぞれの株に *tet-AUR1* の変異を導入した二重変異株 (*tet-AUR1 xxxΔ* 株 (*xxx* は任意の非必須遺伝子)) を網羅的に作製した。網羅的作製は、Tong and Booneの方法<sup>7)</sup>に従って行った。具体的には、Mat $\alpha$ 型 *tet-AUR1* 株と Mata 型の酵母遺伝子ノックアウトライブラリー株をかけ合わせ、二倍体を作製、その後孢子形成を誘導し、二重変異が導入されている一倍体を選択培地にて単離するという方法である (Fig. 3)。一度に4800株のすべてに関して二重変異株を作製するために、菌の植

え継ぎには、384ピンのレプリケーターを用いた。これによって1枚の寒天プレート上で最大384株の菌株の操作を行うことが可能となる。このようにして作製された二重変異株 (*tet-AUR1 xxxΔ* 株) のドキシサイクリンに対する感受性を調べた。

### 3. 結果

#### 3.1 Aur1p発現抑制に対して高感受性を示す遺伝子の探索

酵母非必須遺伝子4800個のそれぞれが欠損した株に *tet-*

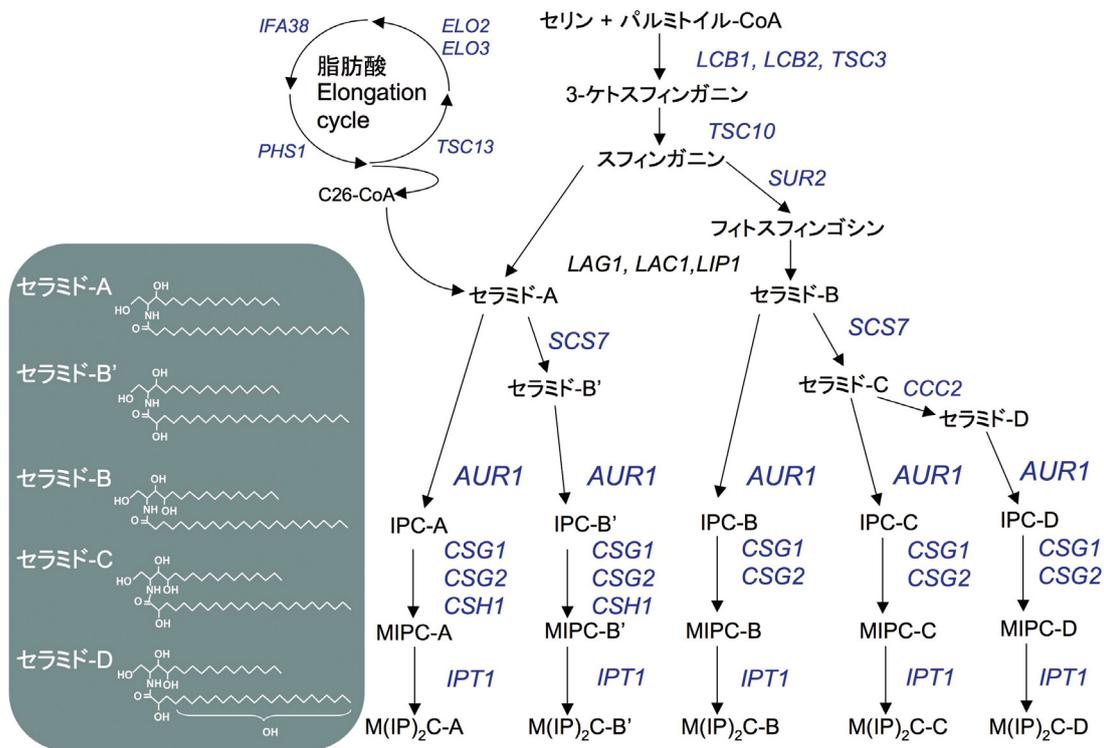


Fig. 2 出芽酵母のスフィンゴ脂質の生合成経路

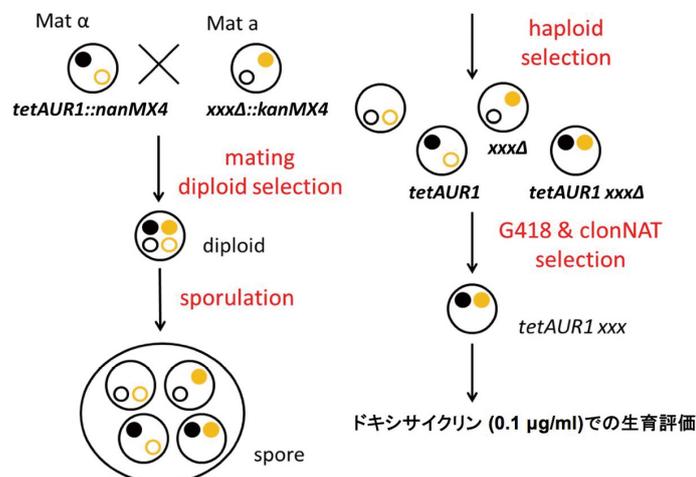


Fig. 3 *tet-AUR1 xxxΔ* 二重変異株の網羅的作製

*AUR1*を導入した二重欠損株を網羅的に作製し、384ピンレプリケーターを用いて、これらの株をドキシサイクリン0または0.1 μg/mlを含む合成培地に植え継ぎ、生育の観察を行った（ドキシサイクリン0.1 μg/mlは、*tet-AUR1*単独変異株が顕著な生育阻害を示さない濃度である）。その結果、低濃度ドキシサイクリン処理によって顕著にコロニーサイズが小さくなる二重変異株を最終的に10個同定した。これらの高感受性変異株の変異遺伝子には、小胞輸送に関与する遺伝子が4個、スフィンゴ脂質の構造修飾に関わる遺伝子が1個（*SCS7*）、細胞内情報伝達系に関わる遺伝子が1個（*IRA2*）、ホスホイノチシド脱リン酸化酵素が1個（*SAC1*）、機能未知遺伝子が3個、含まれていた。*SAC1*<sup>2)</sup>、*SCS7*<sup>4)</sup>に関しては、以前にAur1p阻害剤Aureobasidin Aに高感受性を示す遺伝子としても同定されたものである。今回は、この中で低分子量Gタンパク質活性化GTPase（GAP）をコードする*IRA2*遺伝子に注目をした。

### 3.2 Aur1p発現抑制による生育阻害とRas-cAMP-PKAシグナル経路との関連性

Ira2pは、低分子量Gタンパク質であるRas1p, Ras2pをGTP結合型からGDP結合型の不活性化型へと変換するGAPとして知られている（Fig. 5）。酵母においてRas1p,

Ras2pは、アデニル酸シクラーゼであるCyr1pを活性化することで細胞内cAMP量を増大させPKA（Tpk1, Tpk2, Tpk3）を活性化させる（Fig. 5）。Ras-cAMP-PKAシグナル伝達経路は、酵母の細胞周期の調節による増殖制御、グルコース応答、ストレス応答等において重要な役割を果たしている<sup>8)</sup>。

*tet-AUR1 ira2Δ*の二重変異株は、*tet-AUR1*単独変異株が非常に弱い生育阻害しか示さないドキシサイクリン濃度（0.7 μg/ml）で生育が殆ど観察されなくなった。このような高感受性はAur1p阻害剤Aureobasidin Aを用いた時にも同様に観察されたことから、*Aur1*の機能阻害に対して*IRA2*欠損株は高感受性を示すことが明らかになった。次にRas-cAMP-PKAシグナル経路に関わるその他の因子の欠損株についても同様の解析を行った。その結果、*RAS2*欠損は*tet-AUR1*株のドキシサイクリンによる生育阻害に対する抵抗性を引き起こすことがわかった（Fig. 6）。またcAMPのホスホジエステラーゼをコードする*PDE2*欠損によって、*IRA2*欠損と同様に、Aur1p発現抑制に対して高感受性を示すことが判明した（Fig. 6）。これらの結果より、*IRA2*あるいは*PDE2*が欠損することでRas-cAMP-PKA経路が活性化されると、Aur1p発現抑制に対して高感受性となるが、逆に*RAS2*欠損によってRas-cAMP-PKA経路が抑制されると抵抗性となることが考え

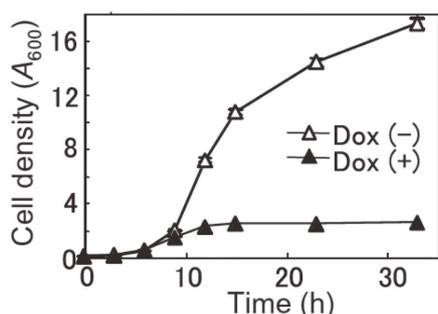


Fig. 4 *tet-AUR1*株の10μg/mlドキシサイクリン(Dox)添加による生育阻害

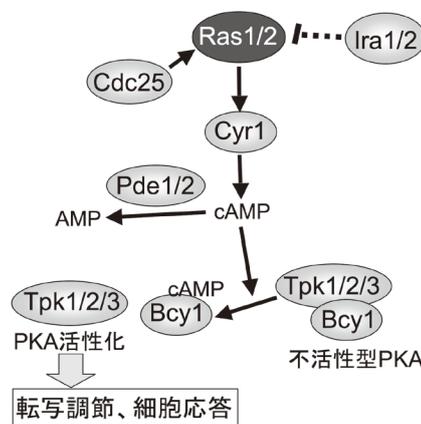


Fig. 5 出芽酵母のRas-cAMP-PKAシグナル伝達経路

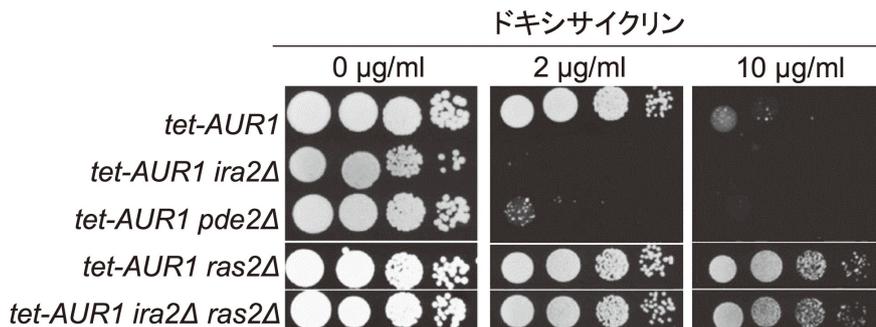


Fig. 6 Ras-cAMP経路因子の欠損株のAur1p発現抑制に対する感受性

られた<sup>9)</sup>。

Aur1pの発現抑制あるいは活性阻害は、複合スフィンゴ脂質の減少及びセラミドの蓄積を誘導することで生育阻害を誘導する。そのためIRA2あるいはPDE2遺伝子欠損による高感受性が、このどちらのスフィンゴ脂質代謝異常に起因するものなのか不明瞭である。一方で、長鎖塩基 (pyhtosphingosine, dihydrosphingosine) に脂肪酸を転移してセラミドを合成する酵素 (Lag1p, Lac1p) を阻害すると、セラミドの生合成が抑制され、複合スフィンゴ脂質の量が減少することで、酵母の生育が抑制される (Fig. 2)。そこで、セラミド合成酵素の調節サブユニットである Lip1p の発現抑制株、*tet-LIP1* 株、*tet-LIP1 ira2Δ* 株、及び *tet-LIP1 ras2Δ* 株を用いて、複合スフィンゴ脂質減少が誘導する生育阻害に対する IRA2、RAS2 遺伝子欠損の影響を調べた。*tet-LIP1* 株は、ドキサイクリン 10 μg/ml を作用させることで弱い生育低下を示したが、同様の生育低下パターンは *tet-LIP1 ira2Δ* 株、*tet-LIP1 RAS2Δ* 株においても観察された。この結果より、IRA2 あるいは RAS2 欠損は、複合スフィンゴ脂質減少による生育阻害に対しては影響しないことがわかった。すなわち、Ras-cAMP-PKA 経路の活性化によって、Aur1p 抑制が誘導するセラミド蓄積に対して高感受性を示すことが示唆された。

### 3.3 Aur1p 発現抑制に対して抵抗性を示すマルチコピーサプレッサーの探索と解析

Aur1p 発現抑制に対する高感受性株に続いて、逆に抵抗性を示す株の探索を行った。具体的には過剰発現によって Aur1p 発現抑制に対する抵抗性を引き起こす遺伝子 (マ

ルチコピーサプレッサー) の同定を試みた。Aur1p 発現抑制株、*tet-AUR1* 株、に酵母染色体 DNA 断片がランダムにマルチコピープラスミドに挿入された酵母染色体 DNA ライブラリーをトランスフォーメーションし、高濃度のドキサイクリン (10 μg/ml (*tet-AUR1* 株が殆ど増殖できない濃度 (Fig. 4))) に暴露した。生育が確認された株を Aur1p 発現抑制に対する抵抗性株とし、導入されていた酵母染色体 DNA ライブラリーの配列の解析を行った。その結果、ストレス応答転写因子をコードする *MSN2* を Aur1p 発現抑制に対するマルチコピーサプレッサーとして同定した (Fig. 7A)。*MSN2* のマルチコピーサプレッサー効果は、Aur1p 特異的阻害剤 Aureobasidin A が誘導する生育阻害に対しても確認された。一方で、セラミド合成抑制株 (*tet-LIP1* 株) の生育阻害は、レスキューしないことから、*MSN2* はセラミド蓄積に対するサプレッサー遺伝子であることが考えられた。さらに、*tet-AUR1* 株に *MSN2* 及びそのパラログである *MSN4* が欠損した三重変異株 (*tet-AUR1 msn2Δ msn4Δ* 株) は、ドキサイクリンによる Aur1p 発現抑制に対して高感受性を示すことも判明した (Fig. 7B)。これらの結果より、Msn2p 及び Msn4p がセラミド蓄積に対して、細胞をプロテクトするための転写因子であることが強く示唆された。

## 4. 考 察

今回、出芽酵母を用いて Aur1p 発現抑制に対する高感受性及び抵抗性株の網羅的探索を行った結果、Ras-cAMP-PKA シグナル伝達経路が、セラミド代謝異常が誘導する生育阻害と密接に関連することを示唆された。すなわち、

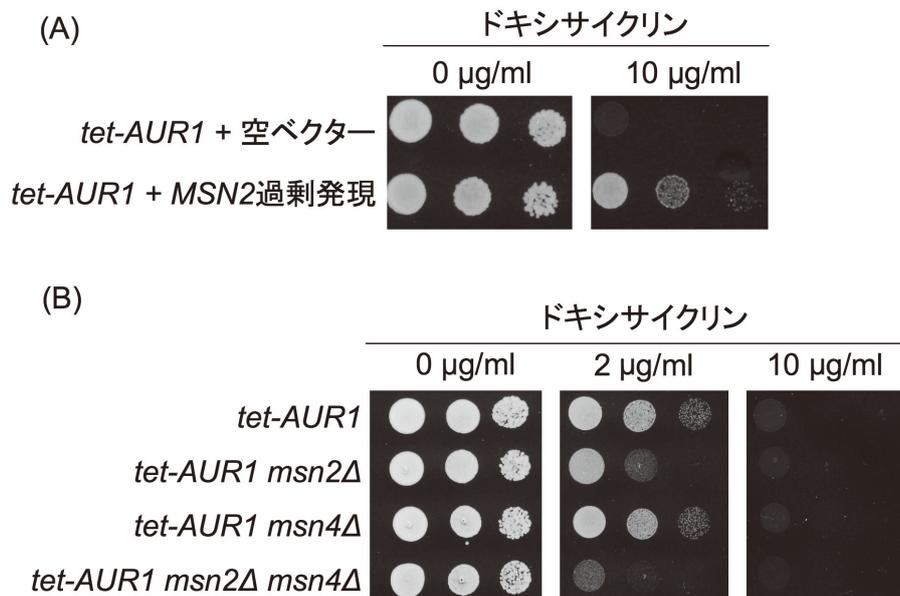


Fig. 7 *MSN2* 過剰発現、*MSN2*、*MSN4* 欠損が Aur1p 発現抑制による生育阻害に及ぼす影響

Ras-cAMP-PKA 経路が活性化されるような変異を導入すると Aur1p 抑制が誘導するセラミド蓄積に対して高感受性を示すが、Ras-cAMP-PKA 経路が抑制されるような変異を導入した場合、逆に抵抗性を示すことが確認された。Ras-cAMP-PKA 経路は、生育維持に必須であり、ストレス応答、細胞周期の調節に関与する重要なシグナル伝達系である。セラミド代謝異常によって、実際に Ras-cAMP-PKA 経路が活性化されているのか、抑制されているのかに関しては今後の重要な課題である。一方で、Aur1p 発現抑制に対するマルチコピーサプレッサーを探索した結果、ストレス応答転写因子をコードする *MSN2* を同定した。また、予備的な実験ではあるが、Aur1p 特異的阻害剤 Aureobasidin A で細胞を処理することで、GFP 融合 Msn2p が核移行することが観察されている。このことを併せると Aur1p 発現抑制が誘導する生育阻害の際に、ストレス応答因子である Msn2p が活性化されることで生育阻害を抑制していることが考えられる。さらに興味深いことに、Msn2p は PKA でリン酸化されることでネガティブな調節を受けることが報告されている<sup>10)</sup>。今後、セラミド代謝異常下における Ras-cAMP-PKA 経路と Msn2p によるストレス応答の役割を更に詳しく明らかにすることで、セラミドの細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響を詳細に解明していきたい。また、今回調べた変異株以外に、スクリーニングで見つかった来たその他の変異株についても、詳細な解析を順次進めていきたい。

#### (引用文献)

- 1) Hannun YA, and Obeid LM, : Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 139-150, 2008
- 2) Tani M, and Kuge O, : Requirement of a specific group of sphingolipid-metabolizing enzyme for growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under impaired metabolism of glycerophospholipids. *Mol Microbiol.* 78, 395-413, 2010
- 3) Tani M, and Kuge O, : Defect of synthesis of very long-chain fatty acids confers resistance to growth inhibition by inositol phosphorylceramide synthase repression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 148, 565-571, 2010
- 4) Tani M, and Kuge O, : Hydroxylation state of fatty acid and long-chain base moieties of sphingolipid determine the sensitivity to growth inhibition due to AUR1 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(2), 673-678, 2012
- 5) Belli G, Gari E, Aldea M and Herrero E, : Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast.* 14, 1127-1138, 1998
- 6) Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, *et al.* : Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* 285, 901-906, 1999
- 7) Tong AH, and Boone C, : Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 313, 171-192, 2006
- 8) Vandamme J, Castermans D, and Thevelein JM, : Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell Signal.* 24, 1610-1618, 2012
- 9) 川口 諒太郎、久下 理、谷 元洋. IPC 合成酵素発現抑制に対して高感受性を示す酵母変異株の同定と解析, 2012 年度 日本生化学会大会講演要旨集.
- 10) Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, and Schüller C, : Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 15, 586-597, 1998