

# スフィンゴ脂質代謝破綻に対する救済機構を応用したセラミド大量生産系の構築

谷 元洋

九州大学大学院 理学研究院化学部門

## 研究の目的

スフィンゴ脂質は、真菌からヒトに至る真核生物において必須な膜脂質である。スフィンゴ脂質の疎水性部の構造であるセラミドは、ヒト角質層に存在し、肌のバリア機能、保湿に寄与しており、近年、セラミドの健康食品、化粧品、医薬品利用に注目が集まっている。出芽酵母のセラミドは、ヒト角質層において高い保湿機能を持つセラミド6と構造的にはほぼ同じであり、セラミドのよい供給源となりうる。しかしながら、セラミドは酵母を含めた天然資源には微量にしか存在しない。これは、合成されたセラミドの殆どが、親水性頭部が付加した複合スフィンゴ脂質へと変換されるためである。そのため、酵母からセラミドを大量に得るためには、まずセラミドから複合スフィンゴ脂質への変換を阻害する必要があるが、スフィンゴ脂質の代謝バランスに重大な障害が出るため酵母は致死となる。そのため、酵母によるセラミド大量生産系構築は困難とされてきた。ごく最近、我々は、「複合スフィンゴ脂質の生合成破綻下で、特定のシグナル系 (HOG 経路)が活性化されることで生き延びるシステムが存在する」ことを新たに見出した (1)。本研究では、このメカニズムを詳細に解析することで、有用スフィンゴ脂質セラミドの高生産系の基盤構築に繋げることを目指した。

## 方法

出芽酵母においてセラミドから複合スフィンゴ脂質への変換を抑制するために、IPC (複合スフィンゴ脂質の最も単純な構造)生合成酵素をコードする *AURI* をテトラサイクリン発現調節プロモーター下で発現させ、ドキシサイクリン (Dox)の添加で、*AURI* の発現抑制が可能な株 (*tet-AURI* 株)を使用した。*AURI* 発現抑制下で HOG 経路依存的に転写が増大する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析で網羅的に探索した。

## 結果

### **HOG 経路の最終標的因子の同定**

トランスクリプトーム解析によって、*AURI* 抑制下で Hog1 (HOG 経路の MAPK)依存的に発現が増大する遺伝子を 59 個同定した。これら候補遺伝子を別々に *tet-AURI* 株に過剰発現させ、複合スフィンゴ脂質生合成抑制に対する救済能を持つ遺伝子を探索した。その結果、*FMP48*, *UIP4*, *GIP2*, *TPS2*, *MGAI* を同定した。この中より、欠損によって *AURI* 発現抑制による生育阻害を促進する遺伝子として、*FMP48*, *TPS2* を最終的に同定した (Fig. 1A)。*FMP48* は推定 Ser/Thr キナーゼをコードしており、*FMP48* の過剰発現は *AURI*発現抑制による生育阻害およびミトコンドリア由来の活性酸素種 (ROS)の増大を抑制すること

がわかった (Fig. 1B)。また、HOG 経路下流の転写因子である *MSN2* を過剰発現すると、*AUR1* 発現抑制による ROS の増大が抑制されるが、*FMP48* の欠損はこの効果を弱めることも確認された。*Fmp48* は、タンパク質相互作用の網羅的解析によって転写調節因子 *Mks1* と物理的に相互作用することが示されている (2)。*FMP48* による救済効果は、*MKS1* 欠損によって打ち消され、*FMP48* の救済効果は *MKS1* を介していることが示唆された。*TPS2* はトレハロース-6-リン酸ホスファターゼをコードしており、トレハロース生合成系を構成する遺伝子である。*TPS2* 欠損は、*AUR1* 発現抑制による生育阻害を促進したが、トレハロース-6-リン酸合成酵素遺伝子 *TPS1* の欠損には促進効果はなかった。また細胞内にトレハロースを過剰蓄積させても、*AUR1* 発現抑制による生育阻害に影響は見られなかった。これらのことより、*TPS2* による救済効果は、トレハロース生合成の促進に起因しているのではなく、トレハロースの前駆体であるトレハロース-6-リン酸量を減少させることで発揮されていることが考えられた。トレハロース-6-リン酸量は解糖系の負の調節因子であることが知られている。そこで、発酵性培地におけるエタノール生産量を調べることで、解糖系の活性の評価をおこなった。その結果、*AUR1* 発現抑制によって生細胞当たりのエタノール生産量は低下し、この低下は、*TPS2* や *HOG1* 欠損で促進されることがわかった。これらの結果は、*TPS2* は HOG 経路の下流因子として、*AUR1* 発現抑制下で発現が上昇し、解糖系を調節することで救済に寄与することが考えられた。

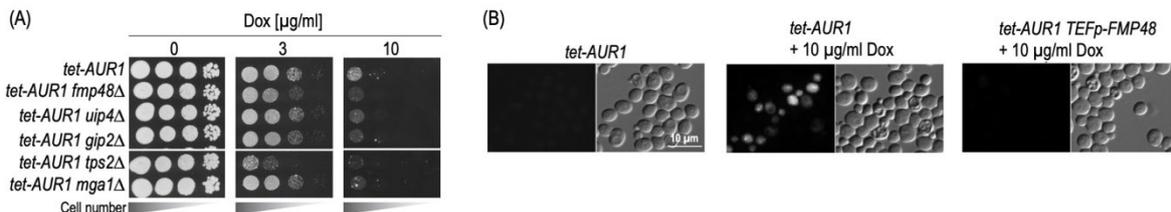


Fig. 1. (A) Effect of deletion of candidate genes that rescue growth defect caused by repression of complex sphingolipid biosynthesis (*AUR1* repression). (B) Effect of overexpression of *FMP48* (*TEFp-FMP48*) on increase in ROS levels in *AUR1*-repressed cells. Detection of ROS was performed by staining with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, an indicator of ROS in cells.

### 複合スフィンゴ脂質の生合成破綻下における *Protein kinase A* と HOG 経路のクロストーク

これまでに我々は、*Protein kinase A* (PKA)の活性調節に関わる cAMP/PKA シグナル伝達経路の構成因子をコードする *RAS2*の欠損 (cAMP/AMP 経路の活性が低下)が、*AUR1* 発現抑制に対する抵抗性を付与することを見出していた (1)。今回、cAMP/PKA 経路の活性化を引き起こす遺伝子変異 (*pde2Δ*, *ira2Δ*)が、*AUR1* 発現抑制による生育阻害を促進することも明らかにした (3) (Fig. 2A)。この生育阻害促進効果を抑制できるマルチコピーサプレッサー遺伝子の探索を行なうことで、*AUR1* 発現抑制下における cAMP/PKA 経路の機能解明を試みた。その結果、HOG 経路の MAPKK をコードする

*PBS2* 遺伝子を同定した。このことより、*AUR1* 発現抑制下において cAMP/PKA 経路が HOG 経路に影響を与えていることが考えられた。cAMP/PKA 経路の活性が上昇した変異株では、*AUR1* 発現抑制下での Hog1 (HOG 経路の MAPK) のリン酸化が低下していることが分かった (Fig. 2B)。これらのことより、複合スフィンゴ脂質生合成破綻下において、cAMP/PKA 経路が複合スフィンゴ脂質破綻救済機構として機能する HOG 経路の適切な活性化に寄与していることが示唆された (3)。

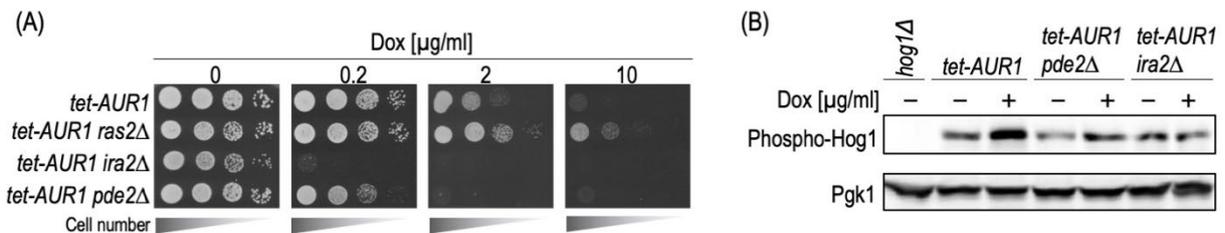


Fig. 2. (A) Effect of deletion of components of the cAMP/PKA pathway on growth defect caused by repression *AUR1*. (B) Effect of deletion of *PDE2* or *IRA2* on phosphorylation of Hog1 caused by repression of *AUR1*.

## 結論

本研究によって、複合スフィンゴ脂質の生合成破綻という致命的な状況に対して、酵母がどのような対策をしているのか、その一端が見えてきた。複合スフィンゴ脂質生合成破綻による生育損傷から細胞を救済するシステムとしては、複合スフィンゴ脂質生合成経路を活性化することでその修復に関わる TORC2-Ypk1 経路がよく知られている。しかしながら、HOG 経路の活性化は複合スフィンゴ脂質生合成系そのものは修復しないことが大きな特徴である (1)。また、これらの知見を総合して、複合スフィンゴ脂質減少およびセラミド異常蓄積に対して耐性を示す変異株を今後構築することで、本研究の最終目標である「セラミドを高生産できる株」を取得することを目指したい。

## 文献

- 1) Yamaguchi Y. *et al.* (2018) Protective role of the HOG pathway against the growth defect caused by impaired biosynthesis of complex sphingolipids in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **107**: 363-386.
- 2) Bretkreutz A. *et al.* (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in Yeast. *Science* **328**: 1043-1046.
- 3) Urita A, Ishibashi Y, Kawaguchi R, Yanase Y, and Tani M. (2022) Crosstalk between protein kinase A and the HOG pathway under impaired biosynthesis of complex sphingolipids in budding yeast. *FEBS J.* **289**: 766-786.