P24

脂質代謝異常に対する新たな防御応答機構の解明と有用スフィンゴ脂質生産の基盤構築への応用

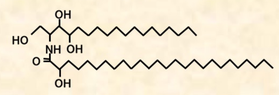
九州大学大学院理学研究院化学部門　谷 元洋

Abstract

近年、スフィンゴ脂質の疎水性部の構造であるセラミドの健康食品、化粧品、医薬品への利用に大変注目が集まっている。本研究では、出芽酵母を用いたセラミド大量生産の基盤技術構築を目指した。酵母にセラミドを大量に蓄積させるためには、スフィンゴ脂質代謝系を大きく改変する必要があるが、代謝バランスに変動が生じると致死となる。我々は、これまでにスフィンゴ脂質の代謝系が破綻すると高浸透圧ストレス応答経路（HOG経路）が活性化され、代謝破綻に対する防御応答をしていることを見出している（*Mol Microbiol* (2018)107,363)。この防御応答機構を強化できれば、セラミドを大量生産できる酵母の創成に繋がることが期待される。そこで、HOG経路による救済メカニズムを明らかにすることを試みた。DNAマイクロアレイ解析によって、スフィンゴ脂質代謝破綻下でHOG経路依存的に発現上昇する遺伝子を30個同定した。これらの遺伝子の中から、スフィンゴ脂質代謝破綻から酵母を救済している機能未知遺伝子を二つ同定した。またこれらの遺伝子が、スフィンゴ脂質代謝破綻によって生じるミトコンドリア由来の活性酸素種の抑制をすることで救済に寄与することも明らかにした。

背景

セラミド…スフィンゴ脂質の疎水性部分、代謝中間産物。
ヒト皮膚の角質層でバリア機能を有し保湿に関与



出芽酵母のセラミドは、ヒト角質層のセラミド6と構造的にほぼ同じ

⇩

酵母を用いてセラミドを大量生産できれば..

⇩

健康食品、化粧品、医薬品で需要の高い有用スフィンゴ脂質セラミドの安定的供給

問題点

・もともと酵母にはセラミドは微量にしか存在しない…

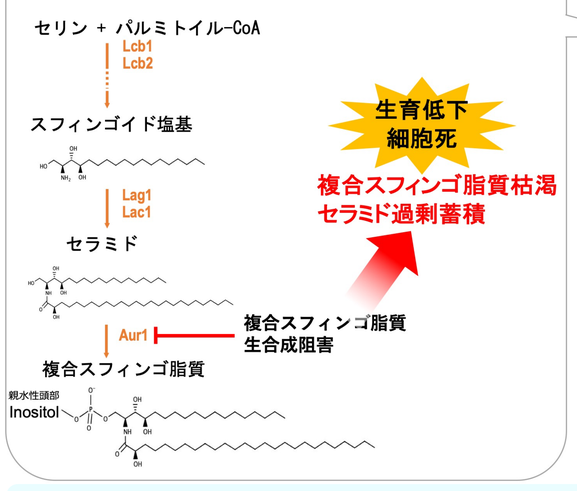
・セラミドを大量蓄積させるために、酵母のスフィンゴ脂質代謝系を大きく改変すればよいが、酵母は生育できなくなる…

⇩

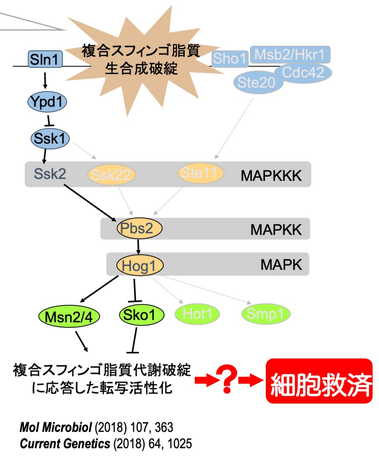
解決策

スフィンゴ脂質の代謝系を大幅に改変しても生育可能な酵母株を樹立できればよい!

出芽酵母のde novo複合スフィンゴ脂質生合成経路

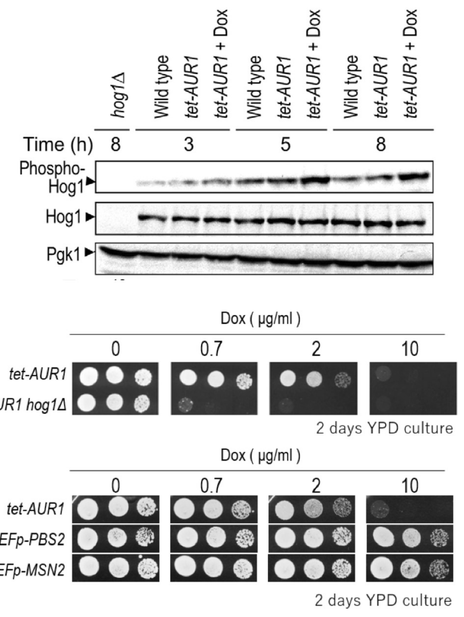


HOG経路の活性化による複合スフィンゴ脂質生合成破綻下での細胞救済



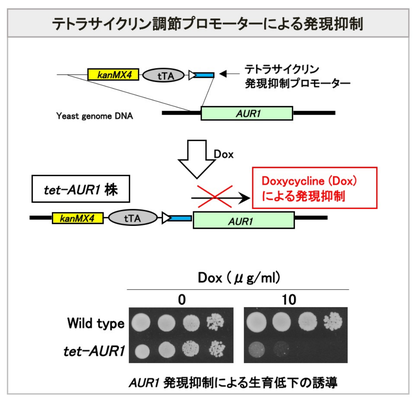
Mol Microbiol (2018) 107, 363
Current Genetics (2018) 64, 1025

スフィンゴ脂質は生体膜の基本骨格である脂質二重層の主要成分のひとつであり、真核生物の生育に必須の脂質である。セラミドはスフィンゴイド塩基に脂肪酸が酸アミド結合した構造である。出芽酵母のAur1はセラミドへのイノシトールリン酸の付加を触媒する酵素で、*AUR1*を発現抑制するとセラミドが蓄積、複合スフィンゴ脂質が減少することで生育阻害が引き起こされる。これまでに我々は、*AUR1*発現抑制をすると高浸透圧応答経路(HOG経路)が活性化され、複合スフィンゴ脂質代謝破綻による生育阻害を抑制することを見出している。



TEFp-PBS2…*PBS2*（MAPKK遺伝子）の過剰発現
TEFp-MSN2…*MSN2*（HOG経路下流の転写因子の遺伝子）の過剰発現

*AUR1*発現抑制の方法

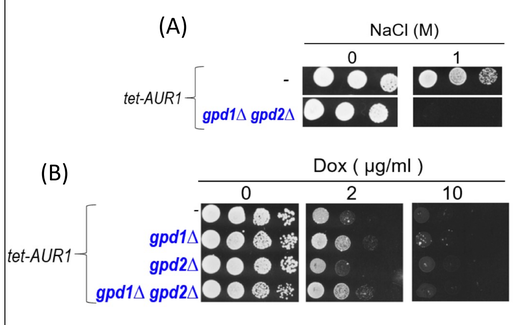


HOG経路のMAPKをコードする*HOG1*を欠損させると、*AUR1*発現抑制下での生育阻害が顕著に促進された。

一方で、HOG経路のMAPKKをコードする*PBS2*やHog1下流の転写因子をコードする*MSN2*を*TEF*プロモーターで過剰発現(*TEFp-PBS2*または*TEFp-MSN2*)させると生育の回復が見られた。

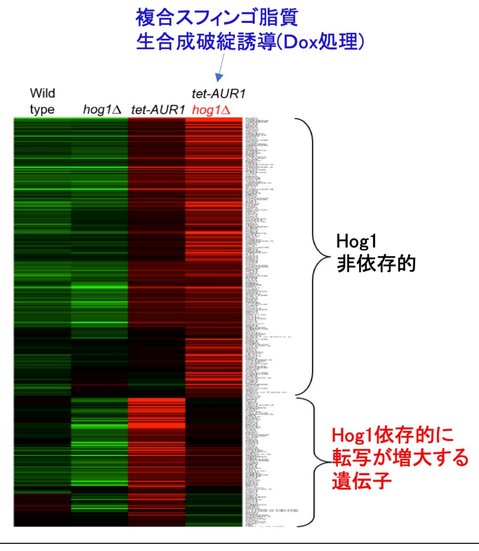
しかし、HOG経路の下流で転写活性化される遺伝子の中で、どの因子が実際に救済に寄与しているのかはわかっていない。

高浸透圧ストレス下と*AUR1*発現抑制下でのHOG経路の役割は異なる



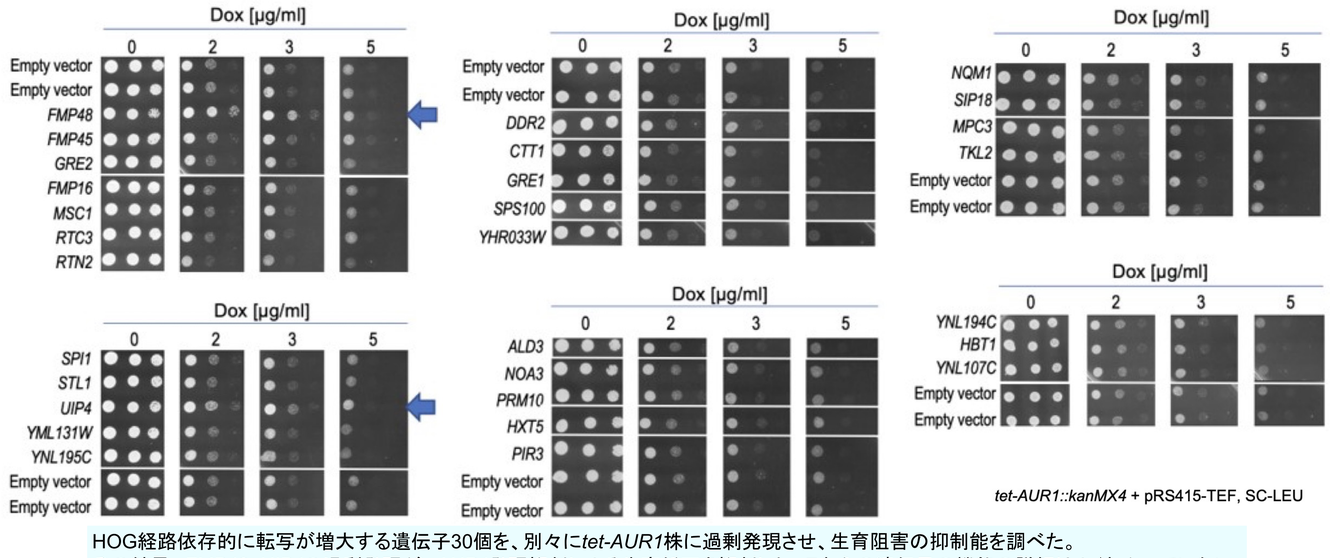
HOG経路は、glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gpd1/2)の発現上昇を介してグリセロール量を上げることで、高浸透圧ストレス耐性を付与する。そのため、*GPD1/2*欠損株は、高浸透圧ストレス高感受性を示す(A)。一方で、これらの欠損は*AUR1*発現抑制による生育阻害は促進しなかった(B)。

*AUR1*発現抑制下でHOG経路依存的に転写が上昇する遺伝子（DNAマイクロアレイ解析）



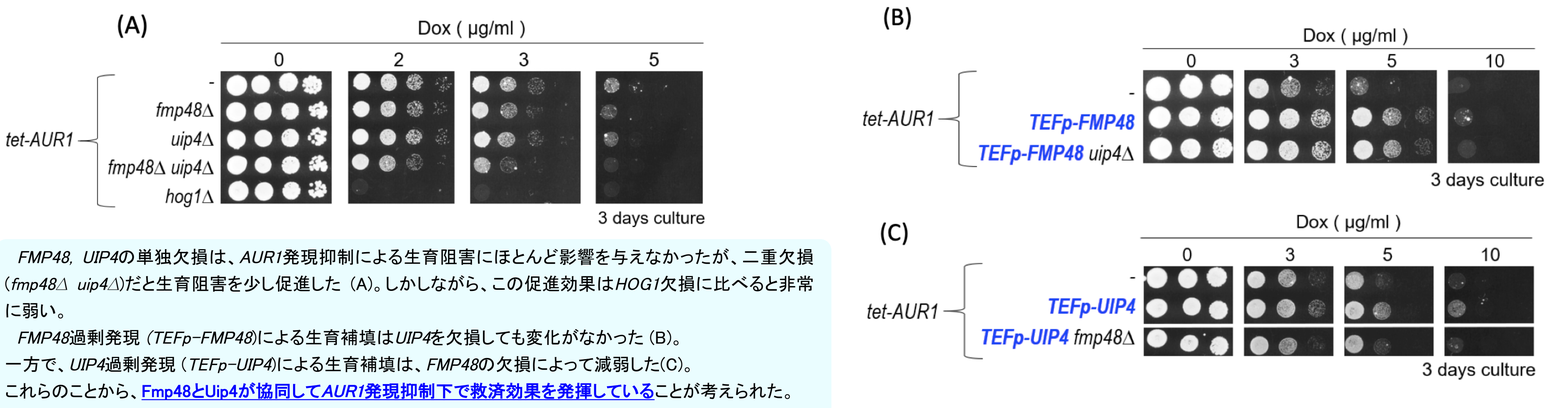
複合スフィンゴ脂質代謝破綻下でHOG経路を介して救済に寄与する遺伝子の同定

pRS415-*TEFp* vectorに候補遺伝子のORFを組み込み、*tet-AUR1*株に導入して過剰発現



HOG経路依存的に転写が増大する遺伝子30個を、別々に*tet-AUR1*株に過剰発現させ、生育阻害の抑制能を調べた。
その結果、*FMP48, UIP4*の過剰発現が、*AUR1*発現抑制による生育低下を抑制した。これらの遺伝子の機能の詳細はよくわかっていない。

Fmp48とUip4は協調的に、*AUR1*発現抑制による生育阻害を救済する



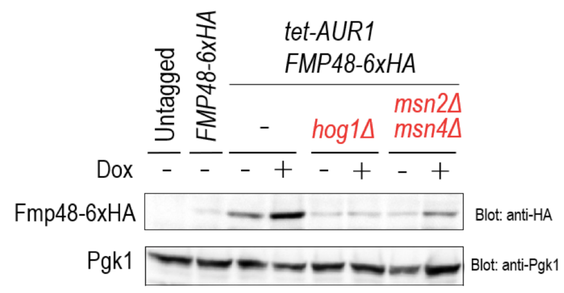
*FMP48, UIP4*の単独欠損は、*AUR1*発現抑制による生育阻害にほとんど影響を与えなかったが、二重欠損(*fmp48Δ uip4Δ*)だと生育阻害を少し促進した（A)。しかしながら、この促進効果は*HOG1*欠損に比べると非常に弱い。

*FMP48*過剰発現（*TEFp-FMP48*)による生育補填は*UIP4*を欠損しても変化がなかった（B)。

一方で、*UIP4*過剰発現（*TEFp-UIP4*)による生育補填は、*FMP48*の欠損によって減弱した(C)。

これらのことから、Fmp48とUip4が協同して*AUR1*発現抑制下で救済効果を発揮していることが考えられた。

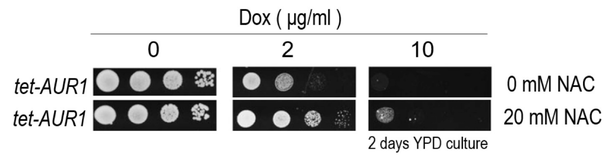
Fmp48はHog1→Msn2/4によって発現誘導される



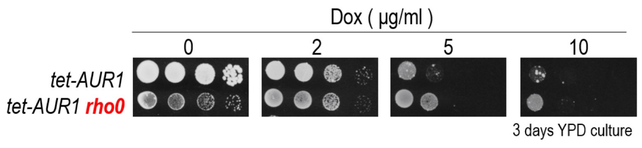
*AUR1*発現抑制によりFmp48の発現増加が見られた。この増加は*HOG1, MSN2/4*を欠損すると見られなくなった。つまり、*AUR1*発現抑制下で、Fmp48はHog1−Msn2/4を介して発現が誘導されることが確認された。

ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)が*AUR1*発現抑制での生育阻害を促進する

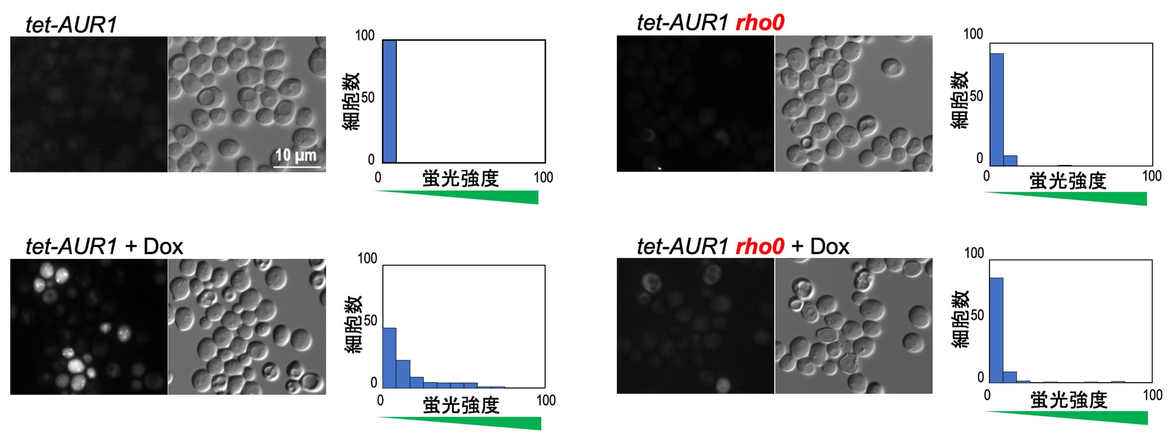
(A) 抗酸化剤 *N*-acetylcysteine (NAC)の影響



(B) ミトコンドリアDNA欠損 (*rho0*)の影響



(C) ROSの検出（H_2DCFDA染色）

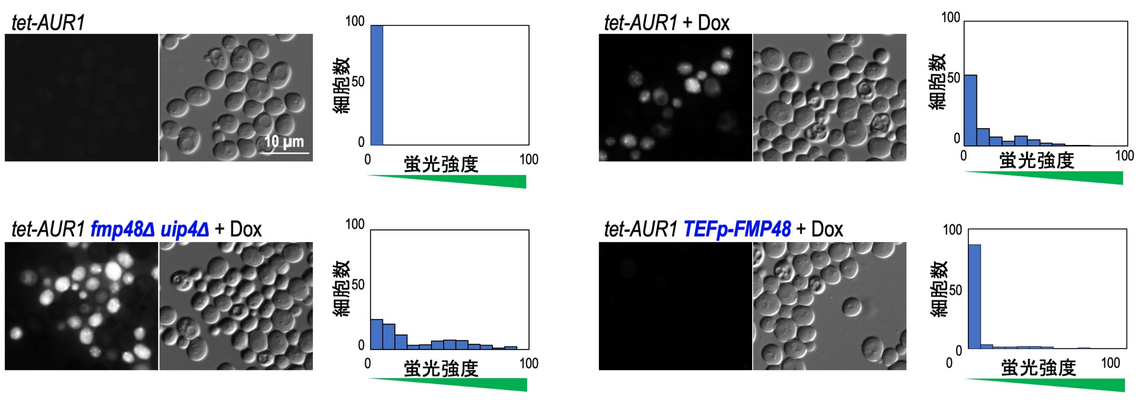
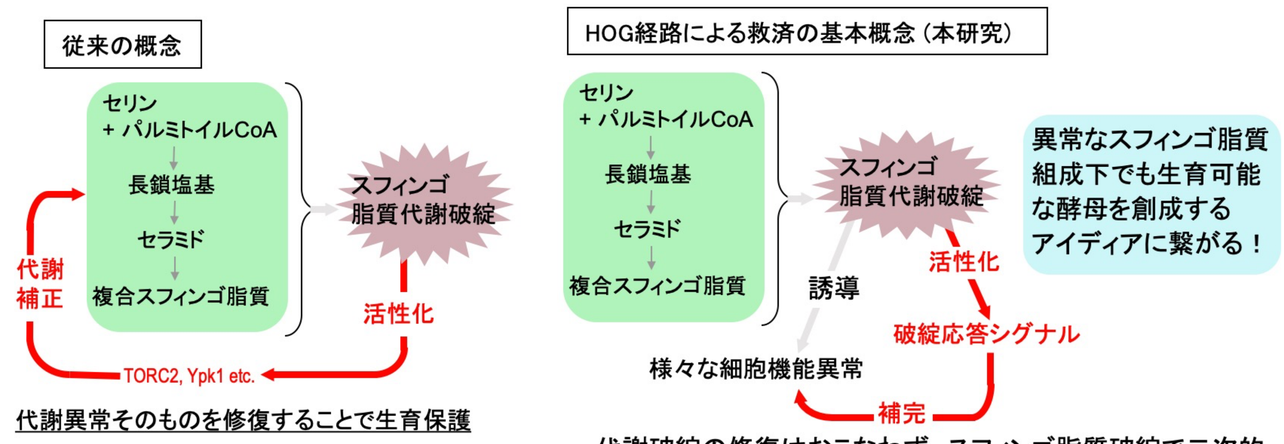


これまでに、*AUR1*の発現を抑制すると活性酸素種（ROS）が増大し、抗酸化剤*N*-アセチルシステイン(NAC)添加によって生育低下が抑制されることがわかっている（*Mol Microbiol* (2018) 107, 366) (A)。

今回、ミトコンドリアDNA欠損（*rho0*)によって、*AUR1*発現抑制による生育阻害およびROS産生が抑制されることがわかった（B and C)。

これらのことより、*AUR1*発現抑制下での生育阻害には、ミトコンドリア由来のROSが関与することがわかった。

Fmp48は、*AUR1*発現抑制によるROS増大の抑制に寄与する

*FMP48, UIP4*の二重欠損は、*AUR1*発現抑制によるROS増大を促進した。一方で*FMP48*の過剰発現は、ROS増大を抑制した。

ROSの検出（H_2DCFDA染色）