

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22770095

研究課題名（和文）

極長鎖セラミドの生成機構および生理的役割の分子レベルでの解明

研究課題名（英文）

Very long chain ceramide biosynthesis and its molecular mechanism

研究代表者

水谷 有紀子 (Yukiko Mizutani)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：30396296

研究成果の概要（和文）：皮膚角層における極長鎖脂セラミドは、バリア機能の保持に欠くことのできない脂質である。ほ乳類のグリセロ脂質の側鎖が長鎖脂肪酸であるのに対し、セラミドは特徴的に極長鎖脂肪酸を持つが、他の組織に見られない炭素数 26 以上の極長鎖を持つ皮膚セラミドの機能的役割は、大変興味深い。我々は極長鎖セラミドの生成酵素同定、発現調節機構の解析を通して、セラミドの生体における機能的役割を研究し、脂肪酸伸張酵素 ELOVL とセラミド生成酵素 CERS の相互の活性調節機構を見いだした。皮膚の分化における極長鎖セラミドの生成に、調整機構として核内転写因子 PPAR が関与する事、PPAR の活性化と生成産物であるセラミドが密接に関連している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The lipid lamellae in the stratum corneum is important for the epidermal permeability barrier. The lipid lamellae component ceramide, comprising an ultra long-chain fatty acid of ≥ 26 carbons, plays an essential role in barrier formation. Ultra long-chain acyl-CoAs, produced by the FA elongase (ELOVL), are converted to ultra long-chain ceramides by the ceramide synthase (CERS). In the keratinocyte differentiation system, we observed that these mRNAs and proteins expression increased. We also determined that peroxisome proliferator-activated receptor is involved in the up-regulation of the mRNAs. Knockdown of *CERS* caused a reduction in the elongase activities toward ultra long-chain acyl-CoAs. These results are implying the possibility that ceramide synthase positively regulates ultra long-chain fatty acid production. We also examined the possibility that the PPAR activation of ceramide can regulate the production of ceramides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

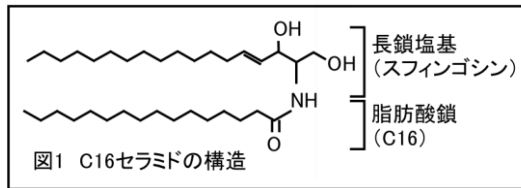
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：脂質・セラミド・スフィンゴ脂質・極長鎖脂肪酸・酵素・バリア機能

- 研究開始当初の背景
通常、ヒトの細胞にはスフィンゴシン骨格で C16 もしくは C24 の側鎖を持ったセラミド、1 種類しか存在しないが、皮膚にはスフ

インゴイド塩基に水酸基が3つあるフィトセラミド、側鎖がC26以上の極長鎖セラミド等、大きな分類だけでも12種類のセラミドが存在する。皮膚はなぜ、このように多様な分子種のセラミドを持つようになったのか。皮膚は外界と体内を隔てる重要なバリアであり、この機能にセラミドが重要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、この分野の分子生物学的研究は遅れており、セラミド合成酵素ですら同定されていなかった。



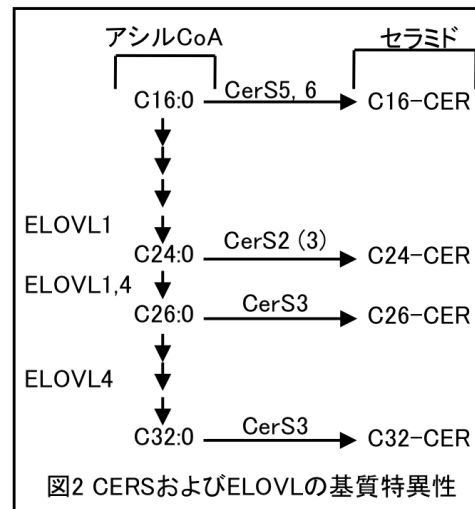
折しも酵母のミュータントの研究から Laglp, Lac1p がスフィンゴイド塩基にアシル基を導入するセラミド合成酵素本体であることが明らかになった (Mol Biol Cell. 2001 12:3417-27)。データベース上のホモロジーサーチから、相同性の高い配列を網羅的にクローニングし酵素学的検討を行ない、CERS3 および CERS6 を mammal でセラミド合成を行う新規蛋白として報告した (Mizutani et al., Biochemical Journal 398 531-538 (2006), Biochemical Journal 390 263-271 (2005)) (図2)。ほ乳類で CERS は6種類 (CERS1-6) 存在し、各アイソザイムには発現している組織や反応の基質となる脂肪酸アシル CoA の鎖長に特異性がある。CERS6 の発現はユビキタスで C16 に対して特異性が高い。これに対し、CERS3 は皮膚や精巣に高く発現し、C24 以上の極長鎖に反応性を示し、皮膚における特徴的な極長鎖セラミドの生成に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。ヒト初代培養ケラチノサイトを用い、皮膚のバリア機能に重要な極長鎖セラミドが分化に伴い発現するのに伴い、CERS3 の発現が優位に上昇する事を見いだした。併せてフィトセラミド生成酵素の検討も行い、ヒトフィトセラミド生成酵素 DES2 を同定し、生体内でフィトセラミドが生成されることを始めて明らかにした (Mizutani et al., FEBS Letter 563 93-97 (2004))。

2. 研究の目的

皮膚に特徴的な極長鎖セラミド、およびフィトセラミドの生成機構の解析を通じて、皮膚におけるこれらのセラミドの機能的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

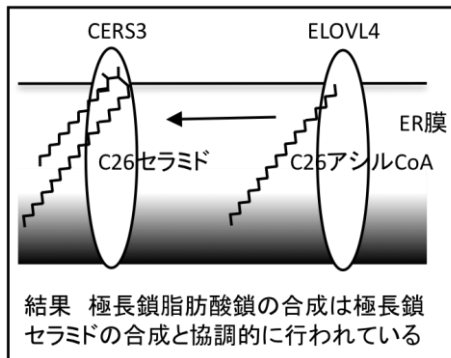
皮膚の極長鎖セラミド合成における CERS3 の重要性は示唆されたが、酵素学的に皮膚の C26-C32 セラミドの生成を証明するのは困難であった。*in vitro* では C24 以上の極長鎖脂肪酸の水溶性が極端に低いこと、*in vivo* では培養細胞における C26 以上の脂肪酸の絶対量が低いことが、C24 以上の極長鎖セラミドの検出を困難にしていると考えられた。そこで我々は、極長鎖脂肪酸を生成する酵素 ELOVL に注目した。ほ乳類において極長鎖脂肪酸は、細胞質での生成もしくは食事から摂取した C16 アシル CoA を原料に小胞体 (ER) の極長鎖脂肪酸伸長酵素 ELOVL により行われる (図2)。ELOVL には7種のアイソザイムが存在し、発現は組織ごとに異なっており、その違いが組織特有の脂肪酸組成を生み出していると考えられた。この特徴は CERS ファミリーと酷似している。また、双方、ER に局在する膜タンパクであり、極長鎖セラミドの生成には ER 膜内で ELOVL および CERS が共に反応することに何らかの意味があるのではないかと考えた。セラミド生成酵素 CERS の解析に脂肪酸伸張酵素 ELOVL の解析をあわせることで、極長鎖セラミドの生成機構とその機能的役割について分子生物学的解析が可能であると考えた。



我々はフィトセラミドが DES2 により生体内で生合成されうることを示したが、食品から摂取されるフィトスフィンゴシンが生体で利用されうるかは不明であった。フィトセラミドを生成できない DES2 ノックアウトマウスを用い、食品から摂取されるフィトスフィンゴシンの動態と、生体への機能的役割についても検討した。

4. 研究成果

siRNAを用いた解析から、哺乳動物細胞においてC24アシルCoAへの伸長を担っているのはELOVL1であり、ELOVL1により伸長されたC24アシルCoAがセラミドの生成に用いられていることが明らかになった。また、興味深いことにC24セラミド生成酵素CERS2の機能を抑制するとC24アシルCoAへの伸長反応も抑制された(文献1)。共沈実験により、ELOVL1とCERS2には蛋白質間相互作用もあることが示された。ELOVLによる極長鎖脂肪酸伸長反応とCERSによるセラミド合成はER膜上で行われるため、これらの合成経路は互いにリンクしER膜上で効率的な合成が実現されていることが考えられる。初代培養ケラチノサイトを用い、C26セラミド生成についても同様の検討を行ったところ、C26アシルCoAを伸長するELOVL4およびCERS3の間に同様の調節機構が認められた(投稿中)。



皮膚の特徴的な脂質生成を調節する転写因子として、ペルオキシソーム応答性受容体(PPAR)に注目した。ノックアウトマウスの解析より、PPAR β が皮膚の創傷治癒や分化等に重要であることが報告されている。我々は、初代培養ケラチノサイトの分化誘導時に発現が上昇するELOVL4、CERS3といった極長鎖セラミド生成に重要な酵素の発現が、PPAR β によって調節を受けている事を示した。フィトスフィンゴシンを生成できないDES2ノックアウトマウスを用いた解析等により、食餌中のフィトスフィンゴシンは生体に取り込まれ、フィトセラミドに変わることを示した。加えて、フィトセラミドがPPARのリガンド様活性を持つこと明らかにした(文献2)。これらの結果から食品から摂取されるフィトスフィンゴシンがPPARの活性化(ELOVL4、CERS3等の発現誘導)を介して皮膚機能の改善に働く事を示唆する結果を得た(投稿中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

(1) Yukiko Mizutani, Hui Sun, Yusuke Ohno, Takayuki Sassa, Takeshi Wakashima², Mari Obara¹, Kohei Yuyama¹, Akio Kihara^{2*}, Yasuyuki Igarashi^{1*}, Cooperative Synthesis of Ultra Long-chain Fatty Acid and Ceramide during Keratinocyte Differentiation, *ProOne* (2013) in press (査読あり)

(2) Itsuo Murakami, Yukari Wakasa, Shinji Yamashita, Toshio Kurihara, Kota Zama, Naoyuki Kobayashi, Yukiko Mizutani, Susumu Mitsutake, Tatsuro Shigyo and Yasuyuki Igarashi, Phytoceramide and sphingoid bases derived from brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* activate peroxisome proliferator-activated receptors, *Lipids in Health and Disease* (2011), 10, 120 (査読有り) doi: 10.1186/1476-511X-10-150.

(3) Yusuke Ohno, Shota Suto, Masao Yamanaka, Yukiko Mizutani, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi, Takayuki Sassa, and Akio Kihara, ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2010) 107, 18439-44 (査読有り) doi: 10.1073/pnas.1005572107.

[学会発表] (計5件)

(1) Yukiko Mizutani, Hui Sun, Yusuke Ohno, Takeshi Wakashima, Mari Obara, Kohei Yuyama, Toyoshi Fujimoto, Akio Kharai, Yasuyuki Igarashi, (2013.02.01) Cooperative Synthesis of Ultra Long-chain Fatty Acid and Ceramide during Keratinocyte Differentiation, 第5回グローバルリトリート(大府)

(2) 水谷有紀子、五十嵐靖之、(2012.05.24) セラミド単行本発刊記念セミナー「セラミドの機能について～セラミドは食べて効く？」 ifia JAPAN 2012(東京)

(3) 水谷有紀子、東城博雅、村上逸雄、木原章雄、五十嵐靖之、(2011.10.28) 皮膚におけるフィトセラミドの生成機構について、

第4回セラミド研究会（札幌）

(4) Yukiko Mizutani, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi (2010.09.21)
Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its regulation by PPAR activators,
第84回日本生化学会（京都）

(5) Yukiko Mizutani, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi, (2010.07.01)
Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its regulation by PPAR activators,
第27回内藤カンファレンス（札幌）

〔図書〕（計1件）

(1) 五十嵐靖之、水谷有紀子 他10名
「セラミド-基礎と応用- ここまできたセラミド研究最前線」
食品化学新聞社 2011年9月初版「共著」
p32-42

〔その他〕

ホームページ等
<http://biomem.pharm.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 有紀子 (Mizutani Yukiko)
名古屋大学・医学研究科・COE 特任助教
研究者番号：30396296

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし