

## 皮膚バリア脂質である結合型セラミドの構造を解明

～皮膚疾患の治療薬の開発に期待～

### ポイント

- ・結合型セラミドの構造（システイン結合型 P-EO セラミド）とその産生の反応様式を解明。
- ・システイン結合型 P-EO セラミドが皮膚における主要な結合型セラミドであることを解明。
- ・バリア異常に起因する皮膚疾患（魚鱗癬、アトピー性皮膚炎など）の治療薬の開発に期待。

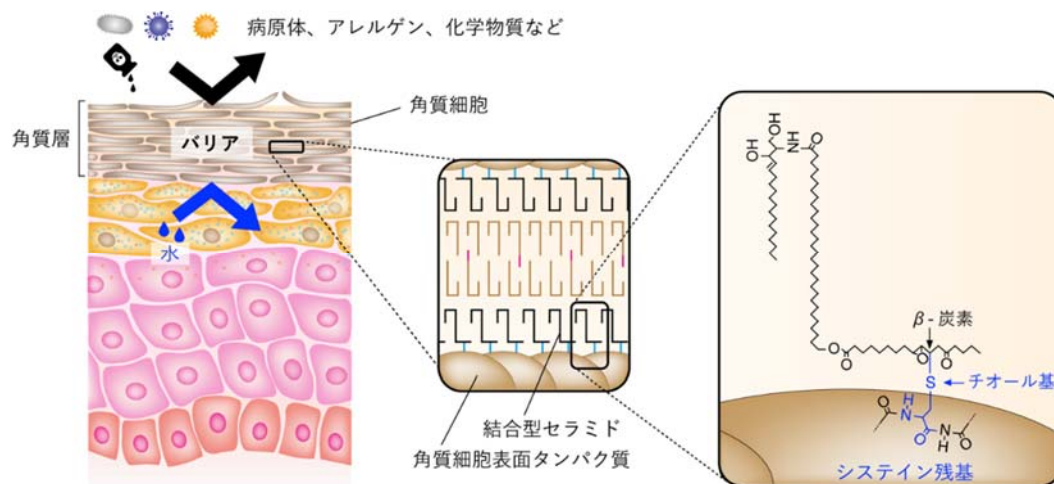
### 概要

北海道大学大学院薬学研究院の大野祐介助教と木原章雄教授の研究グループは、同研究院創薬科学研究教育センターの勝山 彬助教、市川 聡教授との共同研究により、これまで不明であった結合型セラミド\*1の構造を解明し、その産生の反応様式を明らかにしました。

表皮の最も外側に存在する角質層は、体外からの異物（病原体、アレルゲン、化学物質など）の侵入や体内からの水分の蒸発を防ぐ透過性バリア（皮膚バリア）として機能します。角質層を構成する角質細胞の表面にはタンパク質と結合した結合型セラミドと呼ばれる特殊なセラミドが存在し、皮膚バリア機能に不可欠な働きをしています。しかし、その正確な構造、結合するアミノ酸残基、反応様式は不明なままでした。研究グループは、結合型セラミド産生における中間体のエポキシエノンセラミド（EE セラミド）とその構造を模した化合物（EE アナログ）を用いたアミノ酸・ペプチドとの結合実験及びマウスの表皮を用いた解析から、結合型セラミドの構造がシステイン結合型 P-EO セラミドであることを明らかにしました。その構造は EE セラミドのエノン構造部位の  $\beta$ -炭素がシステイン残基のチオール基と結合したものであり、その産生はマイケル付加反応と呼ばれる様式で行われていました。さらに、システイン結合型 P-EO セラミドは皮膚に豊富に存在し、主要な結合型セラミドであることを明らかにしました。

本研究成果は結合型セラミドによる皮膚バリア形成の分子機構の解明、皮膚バリア形成異常に起因する皮膚疾患（魚鱗癬\*2、アトピー性皮膚炎など）の治療薬の開発につながることを期待されます。

なお、本研究成果は、2023年10月18日（水）公開の *iScience* 誌にオンライン掲載されました。



本研究の概要図

## 【背景】

陸上生物は病原体、アレルゲン、化学物質などの外界からの異物の侵入や、乾燥による水分喪失のリスクに常に曝されています。皮膚の最も外側を構成する角質層はこれらのリスクから生体を守る透過性バリア（皮膚バリア）の役割を担っています。角質層には皮膚バリア機能に重要なセラミドを主成分とする二つの構造体（脂質ラメラと角質細胞脂質エンベロープ）が存在します。角質細胞脂質エンベロープは角質細胞表面タンパク質と共有結合したセラミド（結合型セラミド）からなる細胞膜様の構造体です。結合型セラミドは皮膚バリア形成に必須な役割を果たしますが、その正確な構造は不明でした。

これまで結合型セラミドの構造モデルとして、P-O モデルが広く受け入れられていました。これは、 $\omega$ -水酸化セラミドが  $\omega$ -水酸基を介してタンパク質のグルタミン酸残基とエステル結合したモデルで、P-O 脂肪酸（protein-bound  $\omega$ -hydroxy fatty acid）をもつため、この名前がついています（図1）。しかし近年、P-EO モデルと呼ばれる新たな構造モデルが提唱されました。このモデルは、アシルセラミドのリノール酸部分が複数段階の反応によりエポキシエノンセラミド（EE セラミド）へと変換され、エノン部分が求核性アミノ酸残基とマイケル付加反応あるいはシッフ塩基形成によってタンパク質と共有結合するというもので、P-EO 脂肪酸（protein-bound modified linoleic acid-esterified  $\omega$ -OH fatty acid）をもちます。P-O セラミドに関して報告されたのは 25 年前であり、その真偽及び表皮での存在量は検証の必要が残されていました。P-EO セラミドについては、実際に表皮に存在するのか実験的に証明されておらず、タンパク質との反応様式（シッフ塩基形成もしくはマイケル付加反応）や標的アミノ酸／タンパク質についても不明でした。そこで、研究グループは P-EO セラミドの表皮における存在の有無、存在量、構造、反応様式の解明を目的に研究を行いました。

## 【研究手法】

EE セラミドの大量調製が困難だったため、そのエポキシエノン構造を模した化合物の EE アナログを化学合成しました（図2A）。EE アナログと求核性アミノ酸（システイン、セリン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシン）を 37 °C で 1 時間反応させ、薄層クロマトグラフィーによる分離と検出を行いました。EE アナログとシステインの結合体は液体クロマトグラフィー連結型質量分析法<sup>\*3</sup> 及び核磁気共鳴分光法<sup>\*4</sup> により解析しました。次に、マウス表皮から EE セラミドを抽出し、求核性アミノ酸と反応させ、結合体を液体クロマトグラフィー連結型質量分析法で測定しました。実際のマウス表皮における結合型セラミドの解析では、マウス表皮を破碎後、遊離脂質を除いた画分（結合型セラミド画分）をタンパク質分解酵素（プロナーゼ E）で処理することでタンパク質をアミノ酸レベルまで分解させ、液体クロマトグラフィー連結型質量分析計を用いてアミノ酸に結合した結合型セラミドを検出しました。

## 【研究成果】

EE アナログと各種求核性アミノ酸が反応するかどうか調べた結果、EE アナログとシステインを混合した場合にのみ、EE アナログが消失し、結合体が検出されました（図2B）。次に、この結合体の構造を解明するために、質量分析解析、核磁気共鳴分光解析を行なったところ、この結合体が EE アナログのエノン部位の  $\beta$ -炭素とシステインのチオール基と結合した構造をもつ化合物であることが分かりました（図2C）。この結果は、EE アナログがシステインとマイケル付加反応によって結合したことを意味します。次に、EE セラミドをマウス結合型セラミド画分から抽出し、求核性アミノ酸と反応させました。その結果、EE アナログ同様、EE セラミドもシステインとのみ結合体（システイン結合型 P-EO セラミド）を形成しました（図3A）。この際、EE セラミド自身は結合に用いられたため、反応後に減少しました（図3B）。一方、EE セラミドはシステイン以外の求核性アミノ酸と結合体を形成しませんでした。

また、システイン結合型 P-EO セラミドがマウス表皮中に実際に存在するかを調べるため、マウス表皮から調製した結合型セラミド画分をタンパク質分解酵素によってアミノ酸にまで分解後、得られたアミノ酸と結合型セラミドの結合体を質量分析計によって解析しました。その結果、システイン結合型 P-EO セラミドが実際に検出されました（図4）。一方、システイン以外のアミノ酸と結合した P-EO セラミドや、従来提唱されていた P-O セラミドは検出できませんでした。

EE セラミドは結合型セラミド画分を有機溶媒中に浸すことで可逆的に溶出されることが知られていました。本研究では、溶出された EE セラミドがシステイン結合型 P-EO セラミドに由来することを酸化剤及び還元剤を用いた実験により明らかにしました。この結果に基づいて、結合型セラミドを可逆的、非可逆的画分に分け、マウス表皮中のシステイン結合型 P-EO セラミド量を定量することで、システイン結合型 P-EO セラミドが結合型セラミドの少なくとも 60% を占めることを明らかにしました（図5）。

以上の結果から、表皮に存在する主要な結合型セラミドが、角質細胞表面タンパク質のシステイン残基と、EE セラミドがマイケル付加反応により結合したシステイン結合型 P-EO セラミドの二つであることが明らかになりました。

### 【今後への期待】

本研究によって、議論が続いていた結合型セラミドの構造が解明されました。本研究成果は皮膚バリア形成の分子機構の解明に大きく貢献しただけでなく、皮膚バリア異常を起因とするアトピー性皮膚炎や魚鱗癬などの治療薬の開発につながることで期待されます。

### 【謝辞】

本研究は日本学術振興会（科学研究費補助金: JP22K08372、JP22K15241、JP22H02738、JP22H04986）、日本医療研究開発機構（生命科学・創薬研究支援基盤事業、JP23ama121039）、武田科学振興財団（生命科学科学研究助成）、秋山記念生命科学振興財団（研究助成〈奨励〉）から助成を受けて行われました。

### 論文情報

論文名	Determining the structure of protein-bound ceramides, essential lipids for skin barrier function（皮膚バリア形成に必須の脂質である結合型セラミドの構造決定）
著者名	大野祐介 <sup>1</sup> 、中村哲也 <sup>2</sup> 、岩崎貴文 <sup>2</sup> 、勝山 彬 <sup>2</sup> 、市川 聡 <sup>2</sup> 、木原章雄 <sup>1</sup> （ <sup>1</sup> 北海道大学大学院薬学研究院、 <sup>2</sup> 北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育センター）
雑誌名	<i>iScience</i> （ライフサイエンス領域の専門誌）
DOI	10.1016/j.isci.2023.108248
公表日	2023年10月18日（水）（オンライン公開）

### お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 助教 大野祐介（おおのゆうすけ）  
TEL 011-706-3720 FAX 011-706-4900 メール yusuke-ohno@pharm.hokudai.ac.jp  
北海道大学大学院薬学研究院 教授 木原章雄（きはらあきお）  
TEL 011-706-3754 FAX 011-706-4900 メール kihara@pharm.hokudai.ac.jp  
URL <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.php>

### 配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）  
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

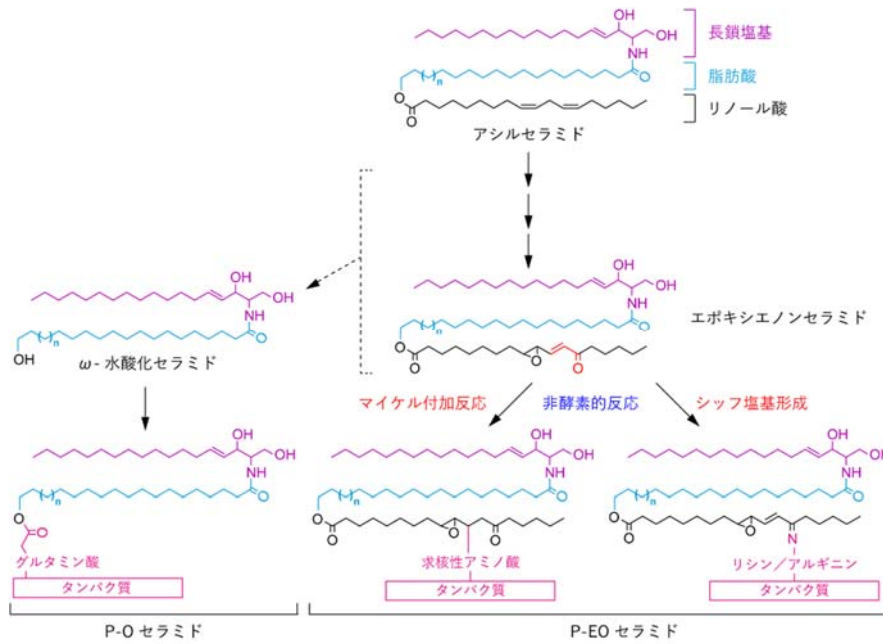


図 1. 提唱されている結合型セラミドの構造モデルとその産生経路。

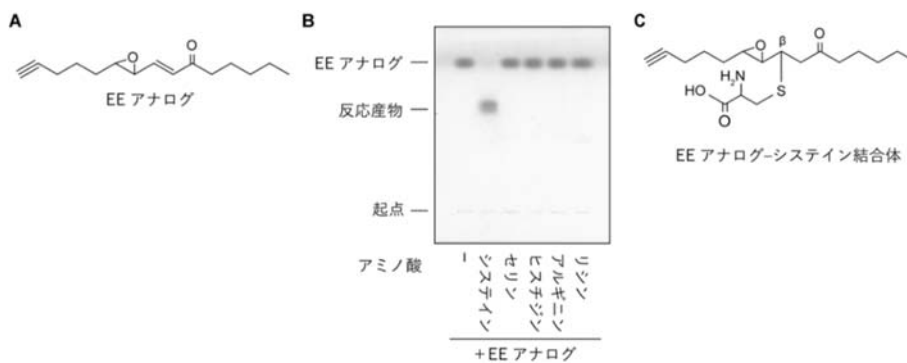


図 2. EE アナログとシステインの結合。A. EE アナログの構造。B. EE アナログと求核性アミノ酸の結合解析結果。C. EE アナログとシステインの結合体の構造。

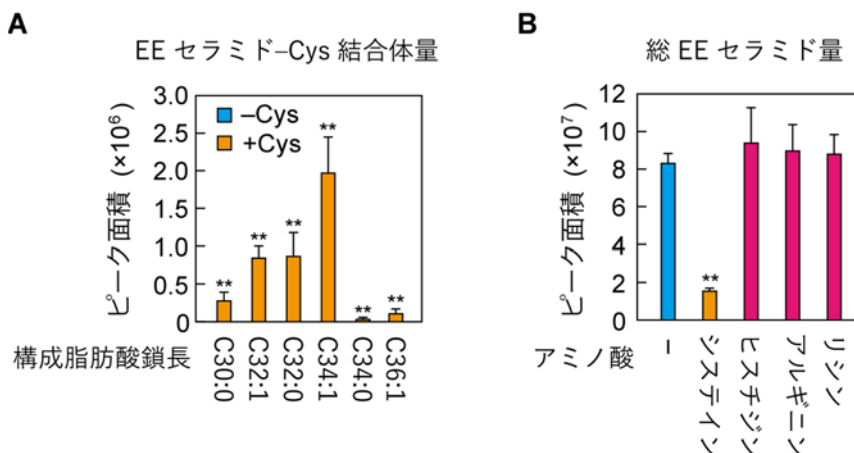


図 3. EE セラミドとシステインの結合。A. EE セラミドとシステインの結合反応後の結合体の定量結果。B. EE セラミドと求核性アミノ酸の結合反応後の EE セラミド量の定量結果。EE セラミドとシステインの結合により、反応後の EE セラミド量が減少。アスタリスクは (-) サンプルに対する統計的な有意差を示す (\*\* $P < 0.01$ )。

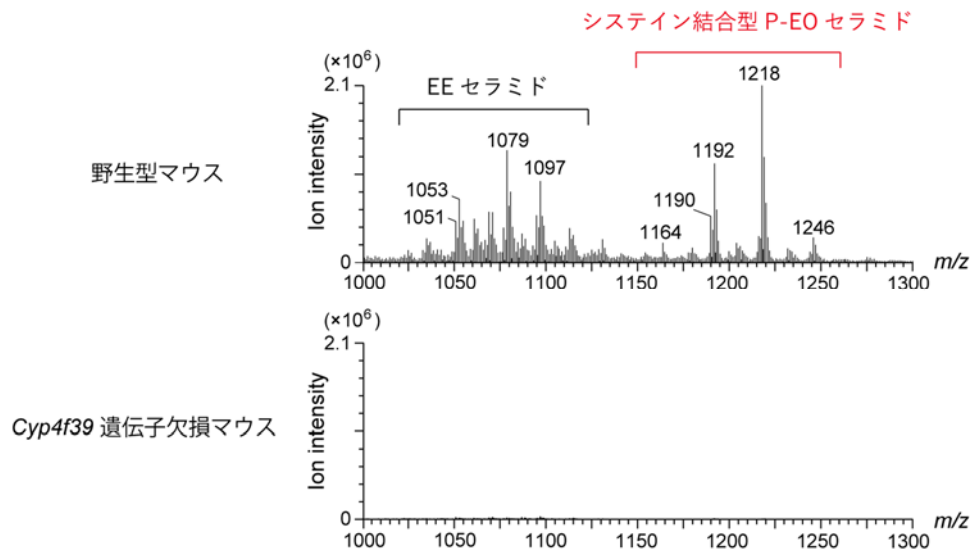


図 4. マウス表皮におけるシステイン結合型 P-EO セラミドの存在。

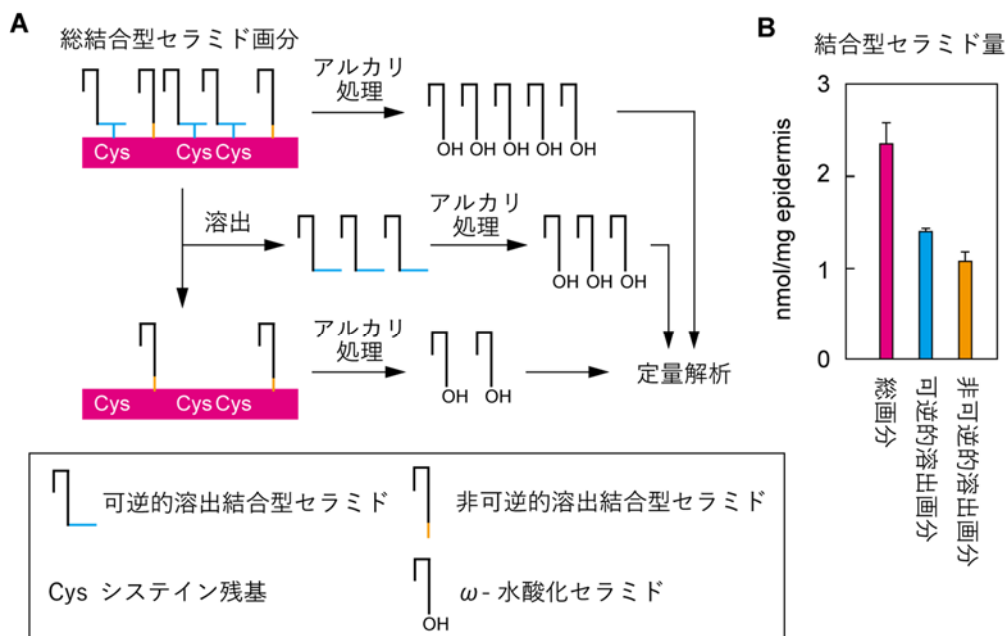


図 5. 結合型セラミドの定量解析。A. 総結合型セラミド画分、可逆的溶出画分（システイン結合型 P-EO セラミドを含む画分）、非可逆的溶出画分（未同定の結合型セラミドを含む画分）の分離スキーム。B. 各画分のアルカリ処理により結合型セラミドから遊離させた $\omega$ -水酸化セラミドの定量結果。

### 【用語解説】

- \*1 セラミド… 真核生物及び一部の原核生物に存在するスフィンゴ脂質の基本構造。長鎖塩基と脂肪酸からなる。
- \*2 魚鱗癬 … 角質層が肥厚する角化症で、皮膚が魚の鱗のように見えることからその名がついた。
- \*3 質量分析法 … 質量（正確には質量と電荷の比）の違いによって分子（今回は脂質）を分離・検出する方法。質量が既知の化合物の定量解析、及び未知の化合物の質量の決定ができる。
- \*4 核磁気共鳴分光法 … 磁場を与えられた状態の  $^1\text{H}$  や  $^{13}\text{C}$  などの原子核に特定の周波数の電磁波を照射すると、原子核がそれぞれの化学的環境に応じた特定の電磁波を吸収する特性を利用した解析方法。化合物の構造決定ができる。