



Title	皮膚透過性バリア形成におけるセラミド分解経路の関与とその異常による病態の解明
Author(s)	野尻, 光希
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第14840号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14840
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/85628
Type	theses (doctoral)
File Information	Koki_Nojiri.pdf



[Instructions for use](#)

令和3年度
博士学位論文

皮膚透過性バリア形成におけるセラミド分解経路の関与とその異常による病態
の解明

北海道大学 大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生化学研究室

野尻光希

令和4年3月

目次

略語一覧.....	4
脚注.....	6
1. 序論.....	7
1-1. 表皮の構造と機能.....	7
1-2. 表皮における脂質の多様性と機能.....	7
1-2-1. 表皮における脂質ラメラの役割.....	7
1-2-2. 脂質ラメラを構成するセラミドの多様性.....	8
1-3. Sjögren-Larsson 症候群.....	13
1-3-1. 疾患概要.....	13
1-3-2. 皮膚症状.....	13
1-3-3. 神経症状.....	14
1-4. アルデヒド脱水素酵素.....	14
1-4-1. ALDH3 サブファミリー.....	14
1-4-2. 長鎖塩基代謝経路における ALDH3A2 の関与.....	15
1-5. セラミド分解酵素.....	17
1-6. <i>Aldh3a2</i> KO マウスの解析.....	17
1-6-1. 皮膚表現型解析.....	17
1-6-2. 神経表現型解析.....	18
1-7. アルデヒドによる化学反応.....	20
2. SLS 皮膚病態発症メカニズムの解明.....	21
2-1. 研究背景・目的.....	21
2-2. 結果.....	21
2-2-1. DKO マウスの作製.....	21
2-2-2. DKO マウスにおける皮膚バリア機能の低下.....	23
2-2-3. DKO マウスにおける過角化.....	24

2-2-4. DKO マウス表皮におけるアシルセラミドの減少.....	26
2-2-5. DKO マウス表皮において結合型セラミドの量は正常である.....	27
2-2-6. DKO マウス表皮におけるトリグリセリドの増加.....	28
2-2-7. DKO マウス角質層におけるアシルセラミドの減少.....	30
2-2-8. DKO マウス表皮におけるアシルセラミド合成関連遺伝子の発現は正常である.....	31
2-2-9. DKO マウス由来の分化ケラチノサイトにおける長鎖塩基代謝異常.....	32
2-3. 考察.....	34
3. 表皮の長鎖塩基産生を担うセラミダーゼの探索.....	38
3-1. 研究背景と目的.....	38
3-2. 結果.....	38
3-2-1. <i>ASAHI</i> KO ケラチノサイトにおけるセラミド分解の低下.....	38
3-2-2. <i>ASAHI</i> KO ケラチノサイトにおける <i>SPH</i> の減少.....	40
3-2-3. セラミダーゼ KO ケラチノサイトでは脂肪酸量は変化しない.....	41
3-3. 考察.....	41
4. 材料と方法.....	45
4-1. マウス.....	45
4-2. 皮膚透過性バリアアッセイ.....	45
4-3. FALDH 活性測定.....	46
4-4. HE 染色.....	46
4-5. 透過型電子顕微鏡解析.....	46
4-6. 走査型電子顕微鏡解析.....	47
4-7. マウス表皮の脂質抽出.....	47
4-8. テープストリッピング.....	48
4-9. テープからの脂質抽出.....	48
4-10. TLC による解析.....	48
4-11. LC-MS/MS による解析.....	49

4-12. 定量的リアルタイム RT-PCR	50
4-13. ケラチノサイトの初代培養	50
4-14. [³ H]DHS トレーサー解析	50
4-15. プラスミドの作製.....	51
4-16. ヒト不死化ケラチノサイトの培養およびトランスフェクション	51
6. 表一覧.....	52
7. 参考文献.....	59

略語一覽

AAG	1-alkyl/alkenyl-2-acyl-glycerol
ABC	ATP-binding cassette
ABHD	α/β hydrolase domain-containing
ACER	alkaline ceramidase
ACS	acyl-CoA synthetase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
ALOX	arachidonate lipoxygenase
ASAH	acid ceramidase <i>N</i> -acylsphingosine amidohydrolase
Cer	ceramide
CERS	ceramide synthase
DHS	dihydrosphingosine
ELOVL	elongation of very long-chain fatty acid
FA	fatty acid
FATP	fatty acid transport protein
FALDH	fatty aldehyde dehydrogenase
FA2H	fatty acid 2-hydroxylase
GalCer	galactosylceramide
GBA	β -glucocerebrosidase
HE	hematoxylin eosin
KO	knockout
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
OAHFA	(<i>O</i> -acyl)- ω -hydroxy fatty acid
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PHS	phytosphingosine
PlsPE	plasmanyl/plasmenyl phosphatidylethanolamine
PNPLA	patatin-like phospholipase domain containing lipase
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDR	short chain dehydrogenase/reductase

SGPL	sphingosine 1-phosphate lyase
SLS	Sjögren-Larsson syndrome
SPG	spastic paraplegia
SPH	sphingosine
SPHK	sphingosine kinase
TECR	<i>trans</i> -2-enoyl-CoA reductase
TG	triglyceride
TLC	thin-layer chromatography
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
WT	wild type

脚注

本研究では、ヒトのタンパク質を全て大文字で表記し、マウスのタンパク質は頭文字のみ大文字で表記した。また、遺伝子は全てイタリックで表記した。

(例) ヒト：タンパク質 ALDH3A2, 遺伝子 *ALDH3A2*

マウス：タンパク質 Aldh3a2, 遺伝子 *Aldh3a2*

1. 序論

1-1. 表皮の構造と機能

皮膚は体外から体内への病原菌, アレルゲンなどの異物の侵入と体内から体外への過剰な水分蒸散を防ぐ透過性バリア (皮膚バリア) 機能を有している。皮膚は外側から表皮, 真皮, 皮下組織より構成されており, 表皮はさらに外側から角質層, 顆粒層, 有棘層, 基底層の4層に分けられる (図1)。表皮における細胞のほとんどはケラチノサイトであり, ケラチノサイトは基底層で増殖したのち, 分化とともに外層へ移行する。各層は層の数が異なっており, ヒトの場合, 基底層が1層, 有棘層が5-10層, 顆粒層が2-3層, 角質層が約10層で構成される。顆粒層のケラチノサイトには皮膚バリアに重要なタンパク質および脂質が貯留された顆粒が存在し, それぞれケラトヒアリン顆粒および層板顆粒と呼ばれる。ケラトヒアリン顆粒には主にプロフィラグリンが内包されており, プロフィラグリンは角質層においてプロセッシングを受け, フィラグリンとなる¹⁾。フィラグリンは角質細胞中の中間径フィラメントであるケラチン繊維を凝集させて皮膚バリア機能を強めるほか, 分解を受けて天然保湿因子となり, 皮膚の水分保持に寄与する¹⁾。角質層ではケラチノサイトは脱核した無核の角質細胞となる。角質細胞の細胞膜は周辺帯と呼ばれるインボルクリンやロリクリン, エンボプラキン, ペリプラキンで構成されるタンパク質の架橋構造体により裏打ちされており, さらにその内側にはフィラグリンが結合したケラチン繊維からなる細胞骨格が存在する²⁾。層板顆粒はセラミド前駆体などの脂質を豊富に含んでおり, その脂質は顆粒層と角質層の境界で細胞外へと放出され, 角質細胞間脂質となる。

1-2. 表皮における脂質の多様性と機能

1-2-1. 表皮における脂質ラメラの役割

角質細胞間脂質はラメラ状の構造をとることから脂質ラメラと呼ばれ^{3,4)}, その主要な構成成分はセラミド, コレステロール, 遊離脂肪酸である^{4,6)}。脂質ラメラにおいて, これらの脂質は炭化水素鎖同士の疎水性相互作用や水酸基やカルボン酸部分などの極性基同士の相互作用をとることでラメラ構造を形成している^{7,8)}。脂質ラメラは皮膚バリア機能に必須の構造体であり, そのラメラ構造と疎水性の高さによって, 体外からの異物の侵入防止や体内からの水分蒸散の防止するバリアの役割を果たしている。

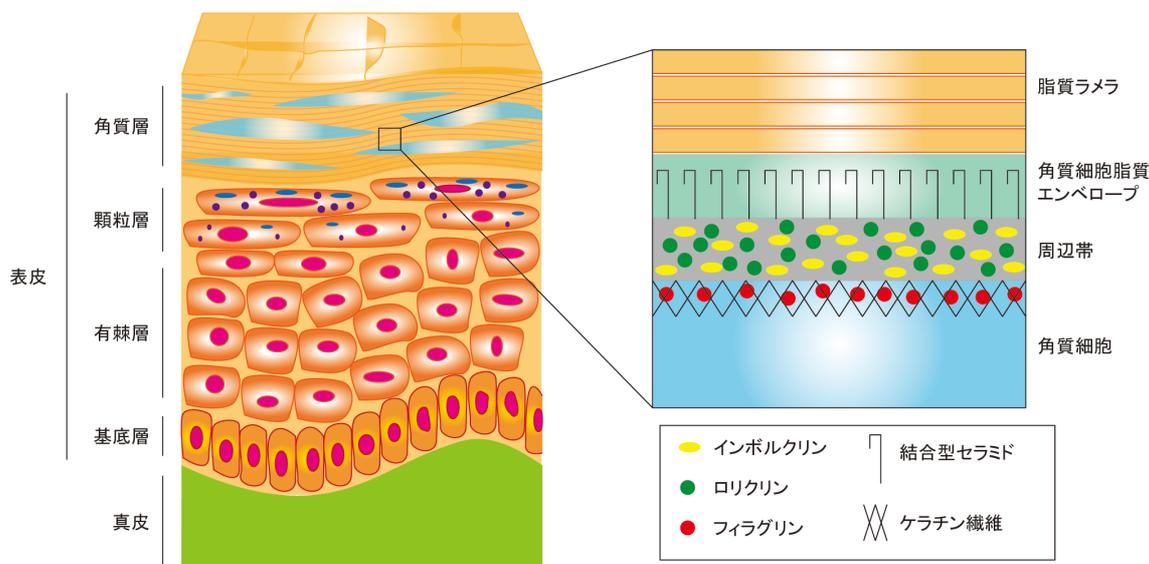
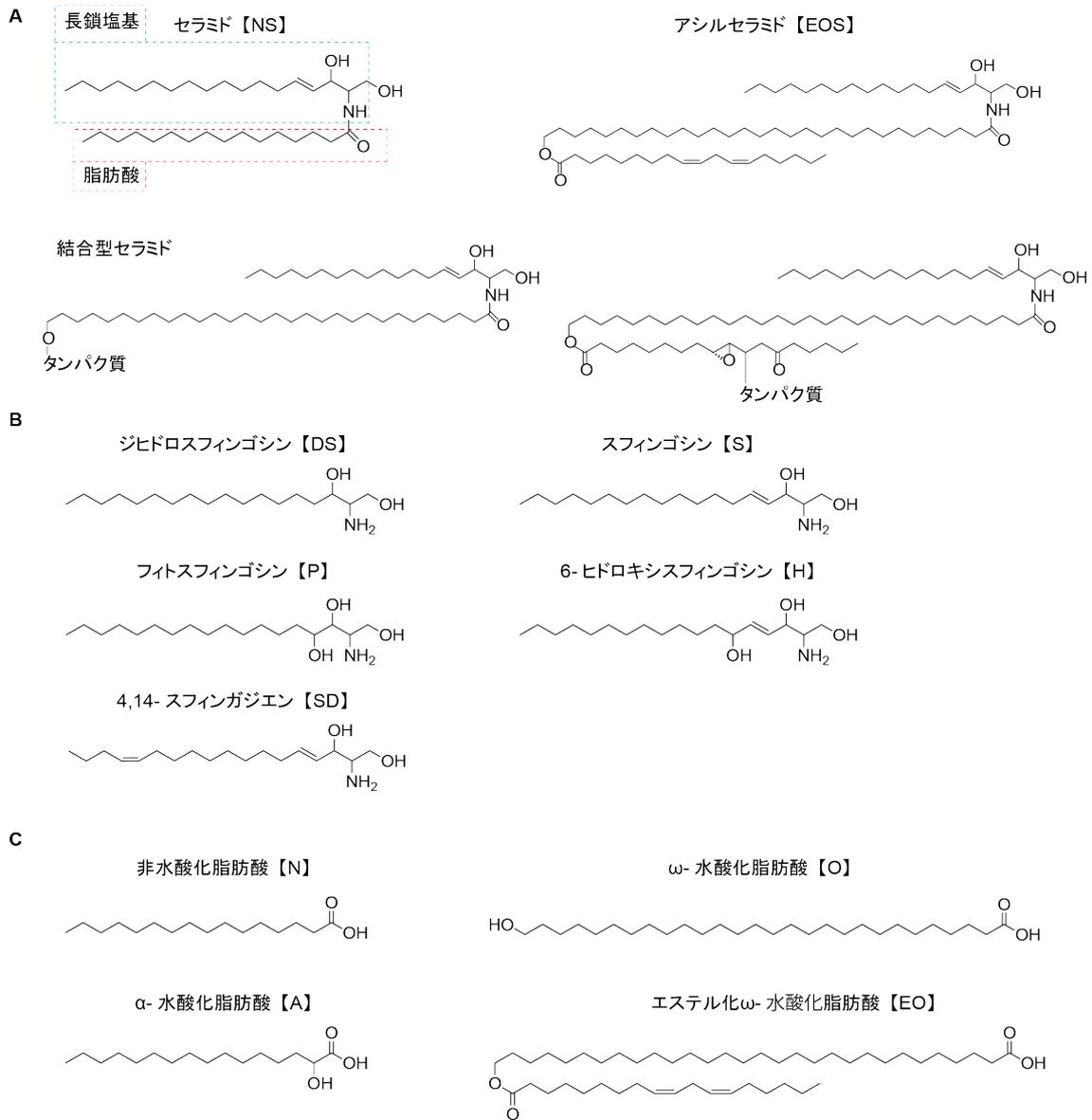


図 1. 皮膚の構造

皮膚の構造を示す（左図）。表皮は角質層，顆粒層，有棘層，基底層の4層に分けられる。角質層の拡大図を示す（右図）。角質細胞間は脂質ラメラによって満たされている。角質細胞はケラチン繊維やフィラグリンで構成される細胞骨格をもち，細胞膜の裏打ち構造としてインボルクリンやロリクリンなどのタンパク質が架橋された構造体である周辺帯をもつ。角質細胞表面を覆う角質細胞脂質エンベロープは，周辺帯のタンパク質と結合した結合型セラミドからなる。

1-2-2. 脂質ラメラを構成するセラミドの多様性

脂質ラメラにはセラミド，コレステロール，遊離脂肪酸がおおよそ等モル比で存在しており，重量比ではセラミドは重量比で約 50%を占める⁴⁾。セラミドは長鎖塩基と脂肪酸により構成されるが（図 2A），哺乳類には長鎖塩基として飽和の炭素鎖をもつジヒドロスフィンゴシン（DHS; dihydrosphingosine），4位にトランス二重結合を有する一価不飽和のスフィンゴシン（SPH; sphingosine），4位に水酸基を有するフィトスフィンゴシン（PHS; phytosphingosine），4位にトランス二重結合と6位に水酸基を有する6-ヒドロキシスフィンゴシン，4位にトランス二重結合と14位にシス二重結合を持つ4,14-スフィンガジエンの5種が存在する（図 2B）。セラミドを表記する際は，それぞれの長鎖塩基はDHSが【DS】，SPHが【S】，PHSが【P】，6-ヒドロキシスフィンゴシンが【H】，4,14-スフィンガジエンが【SD】とさらに略されて表記される。一方，脂肪酸部分は水酸基を持たない非水酸化脂肪酸【N】， α 位に水酸基を持つ脂肪酸【A】， ω 末端に水酸基を持つ脂肪酸【O】， ω 末端にリノール酸がエステル結合した脂肪酸【EO】が存在する（図 2C）。また，脂肪酸の一部はタンパク質と結合した結合型脂肪酸【P-O】



脂肪酸 \ 長鎖塩基	ジヒドロスフィンゴシン【DS】	スフィンゴシン【S】	フィトスフィンゴシン【P】	6-ヒドロキシスフィンゴシン【H】	4,14-スフィンガジエン【SD】
非水酸化脂肪酸【N】	NDS	NS	NP	NH	NSD
α-水酸化脂肪酸【A】	ADS	AS	AP	AH	ASD
ω-水酸化脂肪酸【O】	ODS	OS	OP	OH	OSD
エステル化ω-水酸化脂肪酸【EO】	EODS	EOS	EOP	EOH	EOSD
結合型脂肪酸【P-O】	P-ODS	P-OS	P-OP	P-OH	P-OSD

図 2. 多様なセラミドクラス

(A) 長鎖塩基と非水酸化脂肪酸からなるセラミド、脂肪酸の ω 末端にリノール酸が結合したアシルセラミド、タンパク質と結合した結合型セラミド（左、従来考えられていた結合様式；右、新しく提唱された結合様式）の構造を示す。(B) 哺乳類の長鎖塩基の構造を示す。二重結合と水酸基の違いにより、セラミドの構成成分である長鎖塩基は【DS】、【S】、【P】、【H】、【SD】の5種類に分類される。(C) 脂肪酸の構造を示す。脂肪酸は【N】、【A】、【O】、【EO】の4種類に分類される。(D) セラミドのクラス一覧を示す。セラミドは長鎖塩基と脂肪酸の組み合わせから20種のクラスの非結合型セラミドと5クラスの結合型セラミドが存在し、それぞれの略形の組み合わせにより表記される。

となる。これらの組み合わせによりセラミドは20クラスの非結合型セラミドと5クラスの結合セラミドに分類され、それぞれ長鎖塩基と脂肪酸の略号の組み合わせで表記される。例として長鎖塩基にSPHを持ち、脂肪酸に非水酸化脂肪酸を有するセラミドはNSである(図2A, D)。多くの組織ではNSが最も多いセラミドクラスであり、NDS, NSDも微量ではあるが存在する。一方、脳の髄鞘においてはASタイプのセラミドがNSタイプのセラミドより豊富に存在するなど、セラミドクラス組成は組織毎に特徴がある⁹⁾。ヒト角質層ではNS, NDS, NH, NP, AS, ADS, AH, AP, EOS, EOP, EOHといった多様なセラミドクラスが存在する¹⁰⁾。なかでも、HタイプとPタイプが主要であり、角質層セラミドのうちHタイプが45.4%、Pタイプが34.7%存在する。EOタイプのセラミドはアシルセラミドと呼ばれ、表皮特異的に存在し、皮膚バリア機能に必須である^{4,6)}。角質細胞の表面の角質細胞脂質エンベロープ(図1)は周辺帯タンパク質とセラミドが結合した結合型セラミドにより構成されており、結合型セラミドも皮膚バリア機能に必須である。セラミドはこのように長鎖塩基と脂肪酸の組み合わせによって多くのクラスに分類されるが、それぞれのクラスには脂肪酸の炭素鎖長の異なるものも含まれるため、存在するセラミド分子種はさらに多様になる。脂肪酸はその炭素鎖長により分類され、定義によって異なるが炭素数(C)2-4のものを短鎖脂肪酸、C5-10のものを中鎖脂肪酸、C11-20のものを長鎖脂肪酸、C21以上のものを極長鎖脂肪酸と呼び、極長鎖脂肪酸のなかでもC26以上のものは超長鎖脂肪酸と呼ばれることもある。細胞膜を構成するグリセリン脂質の脂肪酸部分はC16-20の長鎖脂肪酸が主要である。一方、セラミドは多くの組織でC16とC24の脂肪酸を持つ分子種が主要であるが、表皮ではそれらに加えC26-C30といった超長鎖脂肪酸を含むセラミドも豊富に存在している。アシルセラミド、結合型セラミドを構成する脂肪酸はC30-36と特に長いことが特徴的である。

1-2-3. アシルセラミドの産生経路と皮膚バリア機能における重要性

魚鱗癬は皮膚が魚の鱗状になることから名付けられた皮膚角化症の一種であり、皮膚の肥厚、乾燥、落屑を特徴とする¹¹⁾。前述のように、アシルセラミドは表皮特異的に存在するセラミドであり、長鎖塩基、 ω -水酸化(OH)超長鎖脂肪酸、リノール酸の3本の疎水鎖からなる構造をもつ。この特殊な構造がラメラ構造の形成に働くと考えられている^{4,6)}。これまで同定されたアシルセラミド合成に関わる遺伝子全ては魚鱗癬の原因遺伝子として報告されている¹²⁻¹⁶⁾。アシルセラミドの生合成は基底層における未分化ケラチノサイトでは行われず、有棘層の上部から始まり、主に顆粒層で行われる。アシルセラミドは複数の反応ステップを経て産生される(図3)。まず、脂肪酸伸長酵素であるELOVL1, ELOVL4によって脂肪酸の活性化体であるアシルCoAが伸長され、C26以上の超長鎖アシルCoAとなる¹⁷⁻¹⁹⁾。次に、超長鎖アシルCoAはCoAが脱離して超長鎖脂肪酸となり、脂肪酸 ω -水酸化酵素CYP4F22によって ω 位が水酸化されて ω -OH超長鎖脂肪酸へ変換される²⁰⁾。 ω -OH超長鎖脂肪酸はアシルCoA合成酵素FATP4によるCoA付加を受け、 ω -OH超長鎖アシルCoAに変換されたのち、セラミド合成酵素CERS3によって長鎖塩基と縮合し、 ω -OH超長鎖セラミドとなる^{21,22)}。その後、トランスアシラーゼPNPLA1が触媒するトランスアシレーション反応によってトリグリセリド(TG; triglyceride)中に含まれるリノール酸鎖が ω -OH超長鎖セラミドの ω 末端に転移され、アシルセラミドが産生される²³⁻²⁶⁾。このPNPLA1によるトランスアシレーション反応には補助因子として α/β 加水分解酵素ファミリータンパク質ABHD5が必要であり、ABHD5はTGをPNPLA1へ受け渡す、あるいはPNPLA1のTGへのアクセスを促進する役割を担うと推測されている²³⁾。これらアシルセラミド産生に関与する遺伝子のノックアウト(KO; knockout)マウスは皮膚バリア機能の著しい低下を示し、新生致死となる^{16,19,20,23,27)}。

アシルセラミドは小胞体で産生された後、ゴルジ体においてグルコース転移酵素であるグルコシルセラミド合成酵素UGCGによって1位の水酸基へグルコースが付加され、アシルグルコシルセラミドとなる^{28,29)}。その後、ABCトランスポーターであるABCA12によって層板顆粒へ輸送され、貯留される^{30,31)}。顆粒層と角質層の境界面においてアシルグルコシルセラミドは細胞外に放出されたのち、 β -グルコセレブロシダーゼであるGBAによる脱グルコシル化を受けて再度アシルセラミドとなる^{5,32)}。角質層においてアシルセラミドは脂質ラメラの構成成分となるが、その一部はリノール酸鎖がリポキシゲナーゼALOX12B, ALOXE3による水酸化、エポキシ化反応を受けた後、周辺帯のタンパク質と結合した結合型セラミドへ代謝される³³⁾。従来、エポキシドヒドロラーゼによ

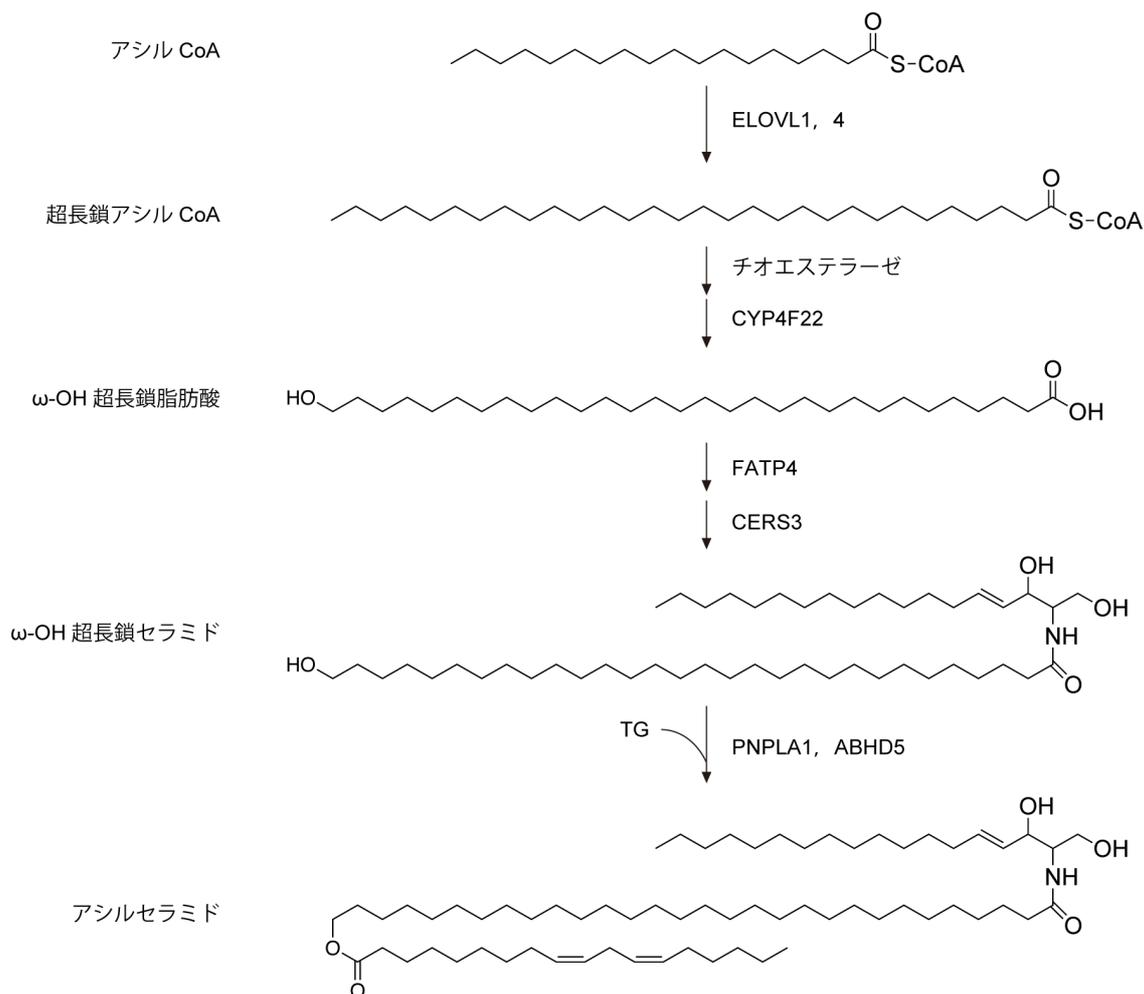


図 3. アシルセラミド合成経路

アシルセラミドの合成経路を示す。長鎖アシル CoA が ELOVL1 および ELOVL4 によって超長鎖アシル CoA に伸長され、CoA が脱離し、超長鎖脂肪酸となる。続いて CYP4F22 が触媒する ω 水酸化反応により、ω-OH 超長鎖脂肪酸が合成される。ω-OH 超長鎖脂肪酸は FATP4 による CoA 付加を受けたのち、CERS3 によって長鎖塩基と縮合し、ω-OH 超長鎖セラミドとなる。アシルセラミド合成の最終ステップとして、PNPLA1 によって ω-OH 超長鎖セラミドの ω 末端にリノール酸含有 TG からリノール酸が転移されることでアシルセラミドが合成される。ABHD5 は PNPLA1 による TG の利用を促進すると考えられている。

るエポキシ化体のトリオール体への変換後、エステラーゼによってトリオール鎖が切断され、再度 ω-OH セラミドとなり、続いてトランスグルタミナーゼ TGM1 によって ω 位の水酸基がタンパク質と結合されることで結合型セラミドが産生されることが考えられてきた³⁴⁾。しかし近年、エポキシ化体がデヒドロゲナーゼ SDR9C7 による酸化を受け、タンパク質と非酵素的に結合することで結合型セラミドが産生されるという新たな様

式が提唱されている³⁵⁾。結合型セラミドは角質細胞における化学的に安定な細胞膜として機能するだけでなく、脂質ラメラを角質細胞表面に繋ぎとめる機能ももつと推定されている。これら結合型セラミドの合成に関与する *ALOX12B*, *ALOXE3*, *SDR9C7* もすべて魚鱗癬の原因遺伝子として報告されている³⁶⁻³⁸⁾。このように、アシルセラミドは脂質ラメラの形成に関わるだけでなく、結合型セラミドの前駆体という側面ももっている。

1-3. Sjögren-Larsson 症候群

1-3-1. 疾患概要

Sjögren-Larsson 症候群 (SLS; Sjögren-Larsson syndrome) は 1957 年に Sjögren と Larsson によって報告された常染色体潜性遺伝性の皮膚神経疾患であり、その主症状は皮膚において魚鱗癬、神経において精神遅滞、痙性対麻痺である^{39,40)}。SLS の原因遺伝子は脂肪族アルデヒド脱水素酵素 (FALDH; fatty aldehyde dehydrogenase) をコードする *ALDH3A2* である。発症率はおよそ 10 万人に 0.4 人であり、希少疾患に分類される^{39,41)}。これまで 100 種類を超える *ALDH3A2* の変異が SLS 患者において見つかり、活性が調べられたすべての変異体で FALDH 活性が健常人の 10%以下に減少することが報告されている⁴²⁾。アルデヒドは反応性が高いため、*ALDH3A2* の活性低下によって蓄積した脂肪族アルデヒドが神経系および皮膚で重要な機能をもつタンパク質を攻撃し、機能障害を引き起こすことが SLS の発症要因であると考えられている⁴²⁾。しかし、生体内に存在するどの脂肪族アルデヒドが SLS の病態に関与するのか、また蓄積した脂肪族アルデヒドがどのタンパク質を攻撃して障害するのかといった詳細な発症の分子メカニズムはほとんど不明である。

1-3-2. 皮膚症状

SLS の主症状の一つである魚鱗癬は出生直後から発病する^{42,43)}。常染色体潜性先天性魚鱗癬は道化師様魚鱗癬、葉状魚鱗癬、先天性魚鱗癬様紅皮症に大別されるが、SLS は多くの症例で皮膚の紅潮や紅斑、皮疹を伴うことから先天性魚鱗癬様紅皮症として分類されることが多い^{42,43)}。

SLS ではヘマトキシリン・エオジン (HE; hematoxylin eosin) 染色による皮膚病変部位の観察から過角化と呼ばれる表皮角質層の異常多層化や表皮の肥厚などが病理所見として認められる^{44,45)}。過角化については、ケラチノサイトの異常な増殖亢進による増殖性過角化や角質層のターンオーバー不全による貯留性過角化が知られているが、SLS 患

者の表皮ではケラチノサイトの増殖亢進が報告されている^{46,47)}。また、SLS患者の表皮の層板顆粒のラメラ構造の欠落、ミトコンドリア数の増加、角質細胞内における脂質空胞の存在など様々な形態異常が電子顕微鏡解析によって明らかにされている^{44,45)}。角質層のセラミド組成に関しては、SLS患者の病変部位の表皮で健常人と比較してNSやTGの量は変化していないが、APやAH、アシルセラミドが減少し、遊離脂肪酸が増加していることが報告されている⁴⁸⁾。しかし、その報告では一例の患者のみのデータであること、脂質解析が薄層クロマトグラフィー (TLC; thin-layer chromatography) による解析であり、定性的および定量的解析としては不十分であることから、より詳細な解析が必要である。

1-3-3. 神経症状

SLSの主な神経症状は精神遅滞と痙性対麻痺であり、いずれも生後数年を経て発症する⁴³⁾。精神遅滞については多くの症例でIQが50を下回るような大幅な知能指数の低下や言語機能障害を伴うことが報告されており、痙性対麻痺については上肢よりも下肢において強く症状がみられ、けいれんや歩行障害が認められる症例も多く存在する⁴⁰⁾。SLSの病理所見としては、患者の脳のMRI解析から髄鞘の減少およびCT解析による白質の低形成などが報告されている⁴⁹⁾。また、¹H-MRS解析によりSLS患者の脳の白質において健常人ではみられない異常な脂質とみられるピークが検出されており、蓄積した脂肪族アルデヒドの代謝物であることが推測されている^{40,49)}。このようにSLS神経症状については非侵襲的な解析に限られており、発症に至る詳細な分子メカニズムについては明らかにされていなかった。

1-4. アルデヒド脱水素酵素

1-4-1. ALDH3 サブファミリー

生体内には脂質や神経伝達物質の代謝産物および食事由来などの多様なアルデヒド分子種が存在する^{50,51)}。アルデヒドは一般的に高い求電子性を持つため反応性が高く、その蓄積は生体に対して強い毒性を示す。そのため、生体内で生じたアルデヒドは速やかにカルボン酸などの反応性の低い別の分子に変換される必要がある。アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH; aldehyde dehydrogenase) はアルデヒドをカルボン酸に変換する酵素であり、ヒトに19種、マウスに21種存在する^{50,51)}。SLS原因遺伝子である *ALDH3A2* はALDH3サブファミリーに属する。ALDH3サブファミリーとしてヒトには *ALDH3A1*,

ALDH3A2, *ALDH3B1*, 偽遺伝子化した *ALDH3B2* が存在する。一方、マウスにはげっ歯類特有の *Aldh3b3* を加えた 5 種 (*Aldh3b2* は機能的) が存在する⁵⁰⁻⁵²⁾。*ALDH3A1* は角膜に高発現する可溶性タンパク質であり、紫外線暴露により生じる 4-ヒドロキシ 2-ノネナールの代謝を担い、角膜および水晶体の保護に寄与している^{53,54)}。実際、*Aldh3a1* KO マウスでは紫外線暴露による白内障の発症頻度が野生型 (WT; wild type) マウスに比べて高いことが報告されている^{53,55,56)}。*ALDH3A2* は広範な組織に発現がみられ、*in vitro* 解析では C6-24 までの幅広い鎖長の直鎖アルデヒドに活性を示す⁵⁷⁾。なかでも、C16 と C18 の長鎖アルデヒドに対して最も強い活性を有す^{52,58)}。*ALDH3A2* は長鎖塩基代謝経路において産生されるヘキサデセナールなどの長鎖アルデヒド、ロイコトリエン B₄ の分解経路において産生されるアルデヒド、食事由来のフィトールに由来する分岐鎖アルデヒドといった様々な経路由来のアルデヒドの代謝に関与する^{42,48,59-63)}。*ALDH3A2* には 2 種のスプライシングアイソフォームが存在することが知られており、メジャーアイソフォームが小胞体膜に、マイナーアイソフォームがペルオキシソーム膜に局在し、いずれも一回膜貫通タンパク質である⁶⁴⁾。

ALDH3B サブファミリーに関する解析は主に当研究室の北村によって行われた。*ALDH3B1* は肺、精巣、白血球で高発現しており、細胞膜に局在する⁶⁵⁻⁶⁷⁾。*ALDH3B1* は C6-9 の中鎖アルデヒドおよび長鎖アルデヒドに高い活性を持つ^{65,67,68)}。ヒト *ALDH3B2* は偽遺伝子化しており、活性を持たないが、マウス *Aldh3b2* およびげっ歯類特有の *Aldh3b3* が *ALDH3A2* と同様、中鎖から長鎖まで幅広いアルデヒドに活性を持つ⁵²⁾。*Aldh3b2* は肝臓、腎臓以外の表皮を含めた多くの組織で発現しており、脂肪細胞では脂肪滴に局在し、*Aldh3b3* は精巣に発現しており、細胞膜に局在する⁵²⁾。

1-4-2. 長鎖塩基代謝経路における *ALDH3A2* の関与

セラミドの構成成分である長鎖塩基は複数回の反応を受けてアシル CoA へと変換され、グリセロ脂質を含む様々な脂質へ代謝される (図 4)。この代謝経路において産生される長鎖アルデヒドの酸化を *ALDH3A2* が触媒することが当研究室の中原らの解析によって明らかとされている⁵⁹⁾。長鎖塩基はスフィンゴシンキナーゼ SPHK1 あるいは SPHK2 によりリン酸化を受け、長鎖塩基 1-リン酸となったのち、長鎖塩基 1-リン酸リアーゼ SGPL1 による開裂を受けてホスホエタノールアミンと C16 の長鎖アルデヒドとなる⁶⁹⁻⁷²⁾。DHS からは飽和アルデヒドであるヘキサデカナールが生じ、哺乳類で最も主要な長鎖塩基 SPH からは 1 価不飽和であるトランス-2-ヘキサデセナールが生じる。トランス-2-ヘキサデセナールは α , β 不飽和アルデヒドであり、一般的なアルデヒドよ

りも反応性が高く、その蓄積は細胞毒性が高いことが知られているため^{73,74}、トランス-2-ヘキサデセナールの速やかな代謝は生体において特に重要であると考えられる。DHS 由来のヘキサデカナールは、ALDH3A2 によって酸化されてパルミチン酸となり、アシル CoA 合成酵素 ACSL1-6 による CoA 付加を受けてパルミトイル CoA へと変換される^{59,75}。一方、SPH 由来のトランス-2-ヘキサデセナールは、ACSL1-6 による CoA 付加を受けたのち、トランス-2-エノイル CoA レダクターゼ TECR による飽和化を受け、パルミトイル CoA へと変換される^{59,75}。これら一連の反応は小胞体膜上で行われ、産生されたパルミトイル CoA は主にグリセロ脂質合成に利用される。

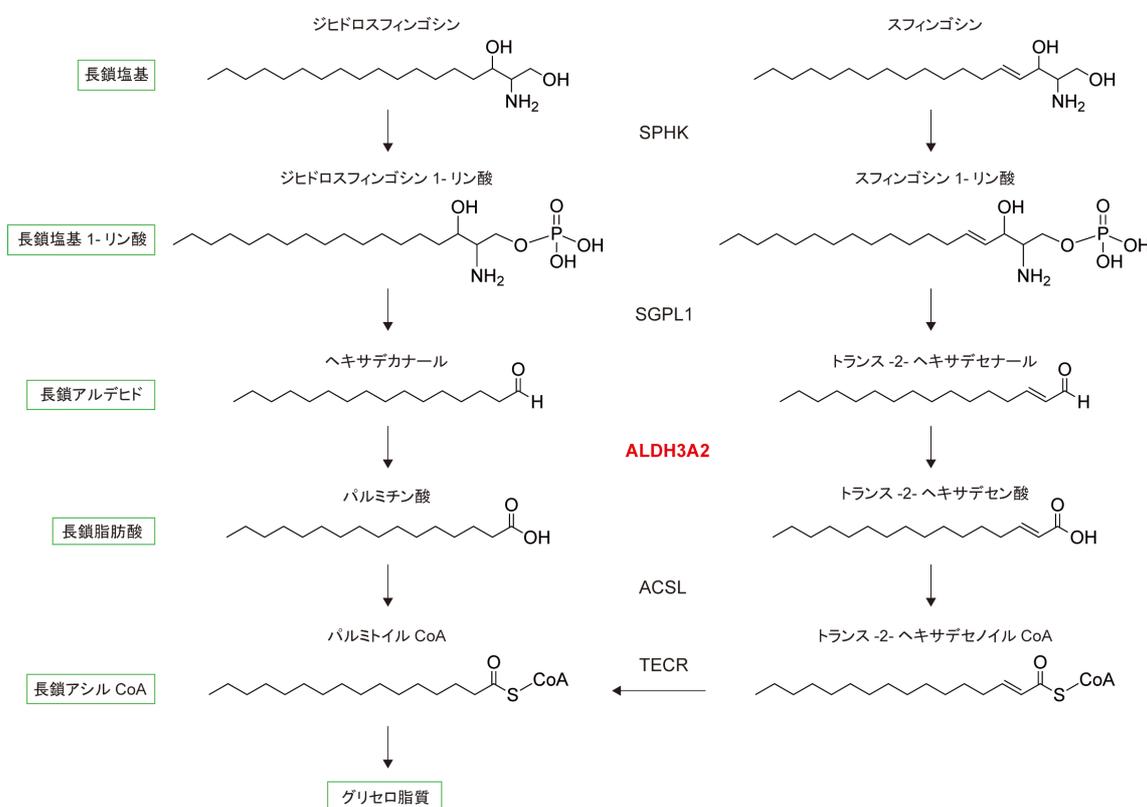


図 4. 長鎖塩基代謝経路

スフィンゴ脂質の唯一の異化経路である長鎖塩基代謝経路を示す。長鎖塩基は SPHK1/2 によるリン酸化を受け、長鎖塩基 1-リン酸となったのちに SGPL1 による開裂を受け、ホスホエタノールアミンと C16 の長鎖アルデヒドになる。次に、ALDH3A2 によって長鎖アルデヒドは長鎖脂肪酸へと変換されたのち、ACSL1-6 による CoA 付加を受け、長鎖アシル CoA が生成される。DHS 由来の場合は、この経路によってパルミトイル CoA が生成されるため、そのままグリセロ脂質などに組み込まれる。一方、SPH 由来の場合は、生成されたトランス 2-ヘキサデセノイル CoA の二重結合が TECR により飽和されてパルミトイル CoA へと変換された後、グリセロ脂質などに取り込まれる。

この長鎖塩基代謝経路は唯一のスフィンゴ脂質の異化経路であることから、スフィンゴ脂質量の調節に重要な役割を果たしており、生体内の全ての組織で恒常的に働いている。そのため、長鎖塩基代謝経路の異常は様々な疾患の要因となる。例えば、*SGPL1* 遺伝子はネフローゼ症候群 14 型や遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子である^{76,77)}。また、すでに述べたように *ALDH3A2* は SLS の原因遺伝子である⁴⁰⁾。

1-5. セラミド分解酵素

セラミダーゼはセラミドのアミド結合の開裂反応を触媒し、セラミドを長鎖塩基と脂肪酸に分解する酵素である^{78,79)}。セラミダーゼは酵素活性を示す至適 pH によって分類され、哺乳類には酸性セラミダーゼ *ASAHI*、中性セラミダーゼ *ASAH2*、塩基性セラミダーゼ *ACER1*、*ACER2*、*ACER3* が存在する^{78,79)}。*ASAHI* はリソソームに局在し、広範な組織で発現がみられる⁸⁰⁾。*ASAHI* の変異は疼痛を伴う関節腫脹変形や皮下結節、中枢神経障害などを主症状とするファバー病を引き起こす^{78,79)}。ファバー病はリソソームにおいてスフィンゴ脂質が蓄積するスフィンゴリピドーシスの一種であり、多くの症例では生後数年以内に死亡するが、軽症例では成人にまで生存する例も存在する^{81,82)}。また、*Asah1* KO マウスは胎生致死であることが報告されている⁸³⁾。*ASAH2* は細胞膜およびゴルジ体に局在し、小腸および大腸で高発現する^{84,85)}。*Asah2* KO マウスでは小腸においてセラミド量が増加し、SPH 量が減少することが報告されており⁸⁴⁾、*Asah2* が食事由来のスフィンゴ脂質の分解や小腸におけるセラミドおよび SPH 量の調節に寄与していると考えられている。*ACER1-3* は小胞体膜およびゴルジ体に局在しており、*ACER1* は表皮に、*ACER2* は胎盤、膵臓、心臓に、*ACER3* は広範な組織に発現し、特に胎盤で高発現している⁸⁶⁻⁸⁹⁾。*ACER1-3* 変異と疾患との関連性は明らかにされていないが、*Acer1* KO マウスでは皮膚バリア機能の低下や皮膚、毛、皮脂腺の形態異常がみられ、皮膚のセラミド量がわずかに増加していることが報告されている⁹⁰⁾。

1-6. *Aldh3a2* KO マウスの解析

1-6-1. 皮膚表現型解析

当研究室ではこれまで SLS 発症メカニズムの解明を目指して *Aldh3a2* KO マウスを製作し、解析を行ってきた。*Aldh3a2* KO マウスは明確な SLS 様皮膚表現型を示さなかったが、いくつかの軽微な皮膚表現型は観察された⁹¹⁾。例えば、表皮基底層では細胞間隙

が拡大していた。細胞間隙の拡大は細胞増殖が亢進しているケラチノサイトではしばしばみられるが、*Aldh3a2* KO マウスの初代培養ケラチノサイトでも細胞増殖が亢進していた。また、皮膚バリアを部分的に破壊するアセトン処理後の皮膚バリア機能回復では *Aldh3a2* KO マウスで遅延が見られた。このように、これまで報告された全ての魚鱗癬原因遺伝子の KO マウスが皮膚バリア機能不全によって新生致死になるのに対し^{16,22,23)}, *Aldh3a2* KO マウスは皮膚バリア機能の低下を示さず、正常に発育して軽微な表現型を示すのみであった。これは、*Aldh3b2* との機能重複のためであると考えられる。実際、*Aldh3a2* KO マウスにおける FALDH 活性が表皮で減少しなかった⁹¹⁾。上述の通り、ヒトでは偽遺伝子化して機能を失った *Aldh3b2* がマウスでは *Aldh3a2* と同様幅広い脂肪族アルデヒドに活性を示し⁵²⁾, マウス表皮では *Aldh3b2* が高発現 (*Aldh3a2* の 10 倍以上) している⁹¹⁾。

1-6-2. 神経表現型解析

表皮では *Aldh3a2* の欠損によって FALDH 活性が低下しなかったが、脳においては WT マウスの約 3 割にまで低下した。その結果、*Aldh3a2* KO マウスが明確な SLS 様の皮膚表現型を示さなかった一方、神経系の表現型については示すことが当研究室の金武らによって明らかにされている⁹²⁾。例えば、*Aldh3a2* KO マウスはビームテストにおける歩行速度の減少や足を滑らせた回数の増加など、軽度の運動機能異常を示す。髄鞘は脂質に富む組織であり、SLS 患者では低髄鞘化がみられる。*Aldh3a2* KO マウスの脳では、2-OH ガラクトシルセラミド (GalCer; galactosylceramide) が WT マウスの半分程度に減少している。2-OH GalCer は GalCer の脂肪酸部分の 2 位が水酸化されたセラミドであり、髄鞘に豊富に存在する脂質 (総脂質の約 25%) である。また、多くの GalCer は 2-OH 化されており、2-OH GalCer は髄鞘に存在する GalCer の 50%以上を占める⁹³⁾。2-OH GalCer は髄鞘の形成、機能維持に重要であり、2-OH 化を担う脂肪酸 2 位水酸化酵素 *FA2H* の KO マウスは髄鞘の異常を示す⁹⁴⁻⁹⁶⁾。*FA2H* は脳の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイト、結腸、精巣に発現しており、小胞体膜に局在する⁹⁷⁾。ヒトにおいて *FA2H* は遺伝性の神経疾患である SPG35 の原因遺伝子であり、患者では痙性対麻痺と精神遅滞が認められる^{98,99)}。このように SPG35 の症状は SLS 神経症状と類似しており、*Aldh3a2* KO マウス脳において 2-OH GalCer の減少がみられることから、SLS 神経症状発症メカニズムとして ALDH3A2 の活性低下によってオリゴデンドロサイトで蓄積した脂肪族アルデヒドが *FA2H* を攻撃することで酵素活性の低下を引き起こして髄鞘の 2-OH GalCer を減少させ、髄鞘機能低下に至るといふ仮説を当研究室では提案した⁹²⁾(図 5A)。

FA2Hはヒスチジンボックスを有している。これらのヒスチジン残基がFA2Hの活性中心を構成しており、触媒反応に関与する金属イオンとの配位に必須である。SLSではFALDH活性の低下によって長鎖塩基由来のトランス-2-ヘキサデセナールなどの α , β 不飽和長鎖アルデヒドが蓄積し、この蓄積したアルデヒドがマイケル付加反応によって活性中心のヒスチジン残基に結合することで、FA2Hの酵素活性の低下が引き起こされていると考えられる(図5B)。

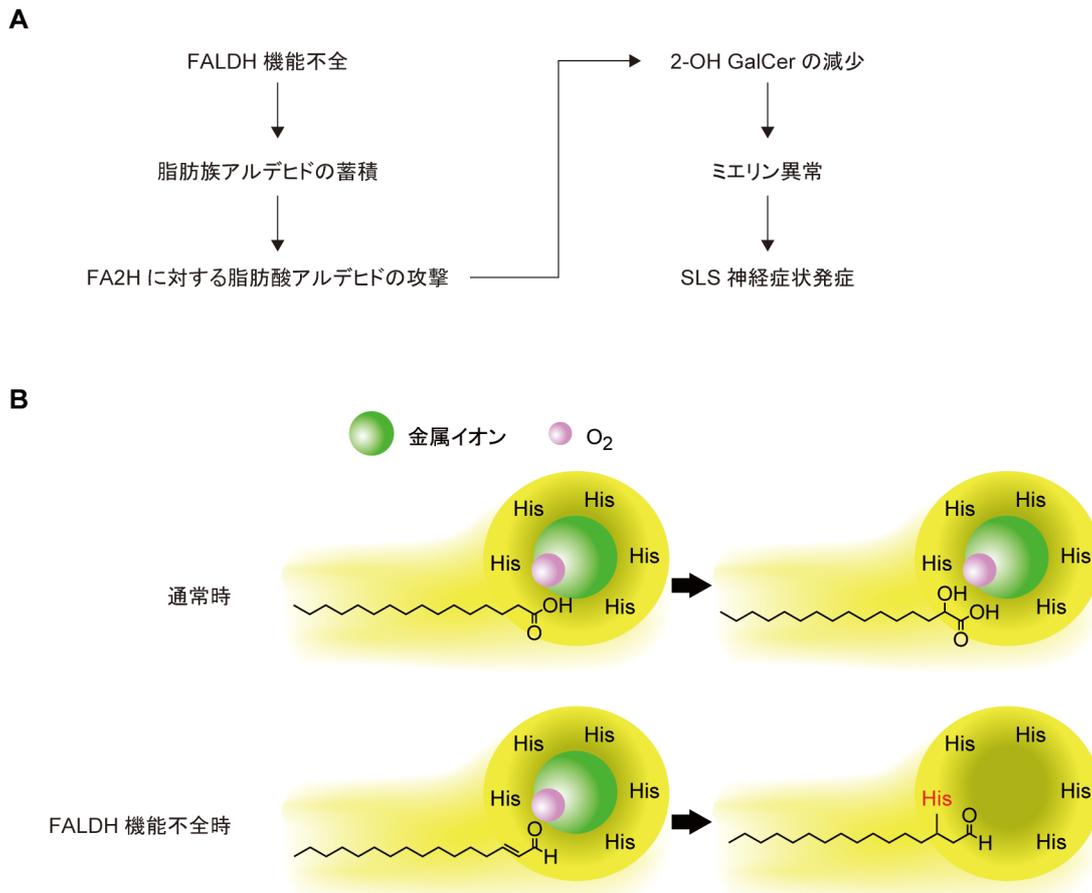


図 5. SLS 神経症状発症のモデル

(A) SLS 神経症状発症メカニズム仮説を示す。*Aldh3a2* KO マウスにおいて、2-OH GalCer の産生を担う酵素 FA2H に対し、FALDH 機能不全により蓄積したアルデヒドが攻撃することで活性低下を引き起こす。その結果、ミエリンに重要な 2-OH GalCer が減少する。(B) FA2H に対するアルデヒド修飾の模式図を示す。FA2H は活性に必須な金属イオンをキレートするヒスチジン残基を活性中心に有し、脂肪酸の 2 位を水酸化する。一方、FALDH 機能不全時には、ヘキサデセナールなどの α , β 不飽和アルデヒドが FA2H の活性中心に入り込み、ヒスチジン残基とマイケル付加反応により結合することで金属イオンの安定性が低下し、FA2H の機能を阻害する。

1-7. アルデヒドによる化学反応

求電子性が高く、反応性が高いアルデヒド分子種はその構造の違いによって異なる反応をする。飽和アルデヒドの場合、カルボニル炭素に対し、第一級アミンの窒素原子が求核攻撃をすることでシッフ塩基を形成する (図 6A)。一方、 α , β 不飽和アルデヒドはシッフ塩基の他に 1, 4 付加反応であるマイケル付加反応体を生じる (図 6B)。 α , β 不飽和アルデヒドは飽和アルデヒドとは異なり、炭素-炭素二重結合を有しており、求核剤が β 位の炭素に求核攻撃をした際、不安定な炭素陰イオンが生じるのではなく、電子吸引基であるカルボニル基との間で共鳴安定化されたエノラートアニオンを生成するため、結合体を形成しやすい^{73,100}。そのため、 α , β 不飽和アルデヒドはアルデヒドの中でも特に反応性が高い。この反応性の高さにより、 α , β 不飽和アルデヒドは飽和アルデヒドよりも反応するアミノ酸の候補が増える。飽和アルデヒドに対しては、塩基性アミノ酸であるリシン残基、アルギニン残基が求核攻撃をすることでシッフ塩基を形成する。一方、 α , β 不飽和アルデヒドに対しては、塩基性アミノ酸の他にヒスチジン残基やシステイン残基が求核攻撃をするマイケル付加反応が起こりやすい。長鎖塩基代謝経路において SPH から産生されるトランス-2-ヘキサデセナールは α , β 不飽和アルデヒドであり、DHS から産生される飽和アルデヒドであるヘキサデカナールに比べて反応性が高い。実際、トランス-2-ヘキサデセナールは *in vitro* 解析から BSA 及び細胞由来ライセート中のタンパク質の塩基性アミノ酸残基やシステイン残基、ヒスチジン残基などとマイケル付加反応によって結合し、なかでもヒスチジン残基に対して最も安定な結合体を形成することが明らかにされている¹⁰⁰。このことから、SLS において蓄積したトランス-2-ヘキサデセナールが何らかのタンパク質のヒスチジン残基を攻撃して機能不全を引き起こしている可能性が高い。

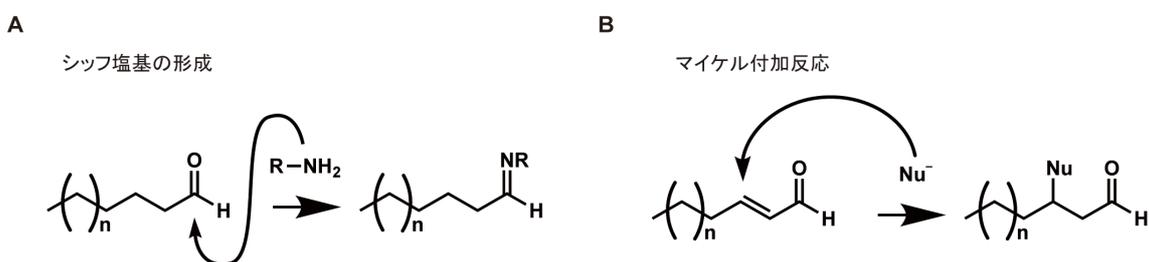


図 6. アルデヒドと求核剤の反応性

アルデヒドによる化学反応を示す。(A) シッフ塩基の形成：アルデヒドのカルボニル炭素に第一級アミンの窒素原子が求核攻撃することにより、C=N 結合を持つシッフ塩基が生成する。

(B) マイケル付加反応： α , β 不飽和アルデヒドは反応性が高く、求核剤 (Nu^-) は α , β 不飽和アルデヒドの β 位の炭素に付加する。

2. SLS 皮膚病態発症メカニズムの解明

2-1. 研究背景・目的

SLS は *ALDH3A2* の変異によって引き起こされる皮膚神経疾患であり、皮膚において魚鱗癬、神経系において精神遅滞と痙性対麻痺を主症状とする。SLS の発症には *ALDH3A2* の活性低下によって蓄積したアルデヒド分子種が関与すると考えられているが、具体的にどのアルデヒド分子種が関わるか、どのタンパク質がターゲットとなるかは不明である。また、SLS 皮膚症状の発症の原因も明らかにされていない。これまで当研究室では、SLS の病態発症メカニズムの解明を目的として、*Aldh3a2* KO マウスを作製し、解析を行ってきた。その結果、*Aldh3a2* 活性低下により蓄積したアルデヒドが 2-OH GalCer の産生を担う FA2H を不活性化させるという SLS 神経症状発症メカニズムの仮説を提唱するに至った。一方、*Aldh3a2* KO マウスの皮膚バリア機能は正常であり、明確な SLS 様皮膚表現型を示さなかった。マウス表皮では、ヒトでは偽遺伝子化している *Aldh3b2* が高発現している。そのため、*Aldh3a2* KO マウスが SLS 様の皮膚表現型を示さなかった要因は、*Aldh3b2* が *Aldh3a2* の活性を相補しているためであると考えられた。そこで、*Aldh3a2* に加え、*Aldh3b2* も欠損させた二重欠損 (DKO) マウスを作製することで、*Aldh3a2* KO マウスが示さなかった SLS 様皮膚表現型についての解析が可能になると期待された。本研究では、DKO マウスを作製し、真の SLS モデルマウスを作製するとともに、その解析から SLS 皮膚病態発症の原因とその分子メカニズムの解明を目指した。

2-2. 結果

2-2-1. DKO マウスの作製

SLS 皮膚病態の分子機構解明のためのモデルマウスとして DKO マウスの作製を試みた。すでに *Aldh3a2* KO マウスは当研究室の永沼らによって作成済みであったので、*Aldh3b2* KO マウスを作製した。CRISPR/Cas9 システムによってマウス *Aldh3b2* ゲノムのエキソン 2 において 8 塩基が欠失した *Aldh3b2* KO (*Aldh3b^{-/-}*) マウスを得た (図 7A)。*Aldh3b2* KO マウスは正常に生まれ、成体にまで成長した。DKO マウス (*Aldh3a2^{-/-} Aldh3b2^{-/-}*) は *Aldh3a2^{+/+} Aldh3b2^{-/-}* 同士の交配によって調製し、以下の実験では同腹の *Aldh3b2* KO マウス (*Aldh3a2^{+/+} Aldh3b2^{-/-}*) をコントロールとして使用した。また、*Aldh3b2* KO マウスに加えて、一部の実験では同じ日に生まれた WT マウスもコントロールとし

で使用した。*Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-}マウス同士の交配で生まれた仔マウスは3週齢の時点で *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-} (*Aldh3b2* KO) マウスが26匹, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-}マウスが48匹生存していたのに対して, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-} (DKO) マウスは一匹も生存していなかった。一方, 生後0日でのジェノタイプングの結果では, *Aldh3b2* KO マウスが13匹, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-}マウスが35匹, DKO マウスが16匹であったことから, DKO マウスは正常に出生していることが明らかとなった。生後2日を越えて生存する個体を確認することはできず, 死んでいるDKOマウスの胃にはミルクが見られず, 多くが巣の外に放棄されていた。

Aldh3b2 KO 及びDKO マウスにおいて他の *Aldh3* ファミリーの相補的な発現亢進がないかを調べるため, 生後0日目のWT, *Aldh3b2* KO, DKO マウスの表皮における *Aldh3* ファミリーの mRNA 発現量を定量的RT-PCRにより解析した(図7B)。WT マウスにおいては以前の研究⁹⁾と一致して *Aldh3b2* が最も多く発現しており, 次いで *Aldh3a2* の発現が多かった。*Aldh3b2* KO マウス, DKO マウスにおいては, KOした遺伝子以外の *Aldh3* ファミリーの発現量はWTマウスと同程度であり, 代償的な発現亢進は見られなかった。*Aldh3b2* の発現量は *Aldh3b2* をKOしたマウス (*Aldh3b2* KO マウスとDKO マウス)においてWTマウスのおよそ30%, *Aldh3a2* の発現量はDKOマウスにおいてWT

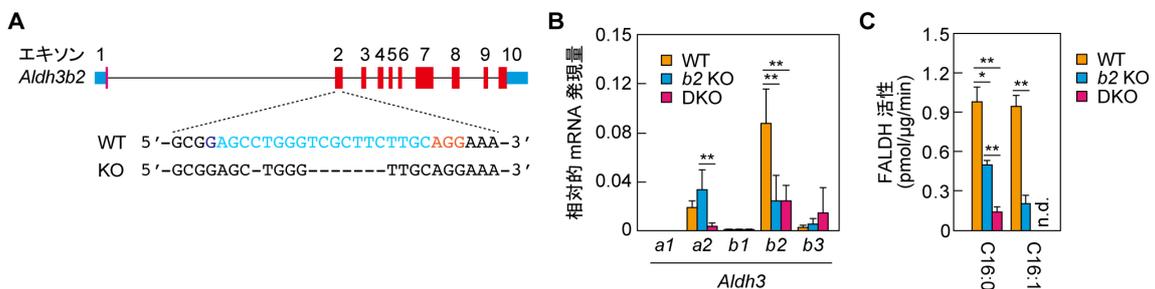


図7. DKO マウスの作製

(A) *Aldh3b2* KO マウスをCRISPR/Cas9システムを用いて作製した。*Aldh3b2*のエキソン構造とWTおよび*Aldh3b2* KOマウスのガイドRNAターゲット配列付近の配列を示す。エキソン中の赤色は翻訳領域, 青色は非翻訳領域を示す。WTの塩基配列上における明るい青色は標的配列を, 橙色はPAM配列を示す。(B) 総RNAをWT (n=3), *Aldh3b2* KO (n=3), DKOマウス (n=3)の表皮から調製し, 定量的リアルタイムRT-PCRによって*Aldh3a1*, *Aldh3a2*, *Aldh3b1*, *Aldh3b2*, *Aldh3b3*のmRNA量を測定した。値は*Gapdh*との相対値として求めた平均値+標準偏差を示し, Tukey's testによって有意検定を行った (** P < 0.01)。(C) 総ライセートをWT (n=3), *Aldh3b2* KO (n=3), DKOマウス (n=3)の表皮から調製し, 1.5 mMのNAD⁺と100 μMのヘキサデカナール (C16:0) もしくはトランス-2-ヘキサデセナール (C16:1)を加え, 37°Cで30分インキュベートした。生成したNADHの蛍光を測定することでFALDH活性を算出した。値は平均値+標準偏差を示し, Tukey's testによって有意検定を行った (* P < 0.05, ** P < 0.01; n.d., not detected.)。b2 KO, *Aldh3b2* KO

のおよそ 20%に低下していた。これらはナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(Nonsense-mediated mRNA decay) によるものと考えられる。

次に, WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウスの表皮における C16:0, C16:1 アルデヒドに対する FALDH 活性を測定した。その結果, *Aldh3b2* KO マウスにおいて WT マウスに比べて C16:0 に対する活性がおよそ 50%に, C16:1 に対する活性がおよそ 20%に低下していた (図 7C)。DKO マウスにおいては WT マウスに比べて C16:0 に対する活性がおよそ 15%に低下し, C16:1 に対する活性は消失していた。上述の *Aldh3a2* KO マウスの表皮における FALDH 活性が WT マウスと比べてほとんど変化していないことを踏まえると⁹¹⁾, *Aldh3b2* と *Aldh3a2* は重複した FALDH 活性を持つものの, *Aldh3b2* がマウス表皮における主要な FALDH であることが明らかとなった。

2-2-2. DKO マウスにおける皮膚バリア機能の低下

生後 0 日の *Aldh3b2* KO, DKO マウスの皮膚の様子を観察すると, *Aldh3b2* KO マウスは WT に比べて変化はなく正常であったが, DKO マウスの皮膚の肌理は *Aldh3b2* KO マウスと比較して粗くなっていた (図 8A)。次に, 走査型電子顕微鏡を用いて詳細に観察したところ, DKO マウスは *Aldh3b2* KO と比較して皮溝が浅くなっていた (図 8B)。

DKO マウスの新生致死性について詳細に調べるため, *Aldh3b2* KO, DKO マウスを胎生 18.5 日のマウスから帝王切開で取り出し, 経時的に生存率を測定した。その結果, *Aldh3b2* KO マウスは母マウスから離してミルクが飲めないこの実験状況では 20–26 時間の間に死亡した (平均 23.8 時間) (図 8C)。この結果は, これまで当研究室で報告した WT マウスでの結果と同様であった¹⁹⁾。DKO マウスは *Aldh3b2* KO マウスと比較して死亡する時間が平均で 1.5 時間早くなっていた。しかし, この結果は自然分娩下で見られた新生致死性を説明できるほどの大きな違いではなかった。帝王切開後のマウスの経時毎の体重減少率を測定した結果, DKO マウスでは *Aldh3b2* KO マウスに比べてわずかではあるものの有意に体重の減少が亢進していた (図 8D)。

体重減少が皮膚バリア異常による体内からの水分の損失の増加に起因するかを調べるため, 経皮水分蒸散量の測定を行った。*Aldh3b2* KO マウスと WT マウスの間に経皮水分蒸散量の違いは観察されなかった (図 8E)。一方, DKO マウスでは WT マウスおよび *Aldh3b2* KO マウスと比べて約 2 倍に経皮水分蒸散量が増加していることが明らかとなった。次に, 体外から体内への皮膚バリア機能をトルイジンブルー染色によって調べた。短時間 (24 時間) の染色では明確な差が認められなかったものの, 長時間 (40 時間) の染色によって, DKO マウスでは *Aldh3b2* KO マウスと比べて濃い染色が観察され

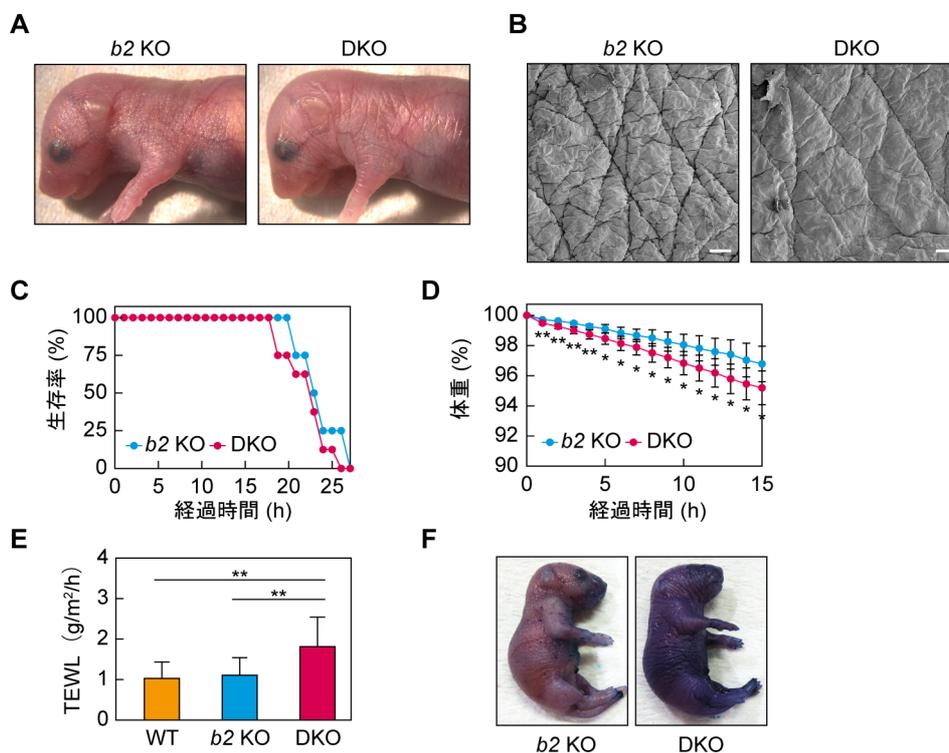


図 8. DKO マウスにおける皮膚バリア機能の低下

(A, B) 生後 0 日の *Aldh3b2* KO マウスと DKO マウスの写真 (A) と走査型電子顕微鏡写真を示す (B)。スケールバーは 100 μm を示す。(C, D) 帝王切開により回収した胎生 18.5 日の *Aldh3b2* KO マウス ($n=4$) と DKO マウス ($n=8$) の経過時間ごとの生存率 (C) および体重 (D) を示す。D における値は平均値+標準偏差を示し、Student's *t*-test によって有意検定を行った ($*P<0.05$, $**P<0.01$)。(E) 生後 0 日の WT ($n=8$), *Aldh3b2* KO マウス ($n=13$), DKO マウス ($n=16$) の経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。値は平均値+標準偏差を示し、Tukey's test によって有意検定を行った ($**P<0.01$)。(F) 生後 0 日の *Aldh3b2* KO マウスと DKO マウスを 0.1% のトルイジンブルー溶液により 40 時間染色した。
b2 KO, *Aldh3b2* KO

た (図 8F)。これらの結果より、DKO マウスが弱い皮膚バリア異常を示すことが明らかとなった。

2-2-3. DKO マウスにおける過角化

DKO マウスにおける皮膚バリア異常の原因を調べるため、HE 染色による表皮の組織学的解析を行った。*Aldh3b2* KO マウス表皮では角質層で間隙が観察された (図 9A)。この間隙は染色操作前に脂質ラメラが存在していた領域であり、染色におけるアルコール脱水過程において脂質が溶出したために生じたものである。WT マウスでは間隙が観

察されるが、脂質ラメラ形成不全を示すマウスでは間隙の消失が報告されている^{16,19,22}。DKO マウス表皮においても角質層における間隙が観察されたが、*Aldh3b2* KO マウスと比較して角質層の間隙が狭くなっているようであった (図 9A)。

表皮のより詳細な解析を行うため、透過型電子顕微鏡観察を行った。その結果、HE 染色と同様に DKO マウス表皮において *Aldh3b2* KO マウスと比較して脂質ラメラが有意に狭小化していた (図 9B, C)。さらに、角質層の細胞層数が DKO マウス表皮において *Aldh3b2* KO マウスのおよそ 2 倍に増加していた (図 9D)。DKO マウスにおいて見られるこれら角質層における脂質ラメラの形成異常や過角化は、SLS 患者においても同様に見られる病理所見である⁴³)。以上より、DKO マウスは SLS 様の皮膚病態を示し、SLS 病態モデルマウスとして有用であるということが明らかとなった。

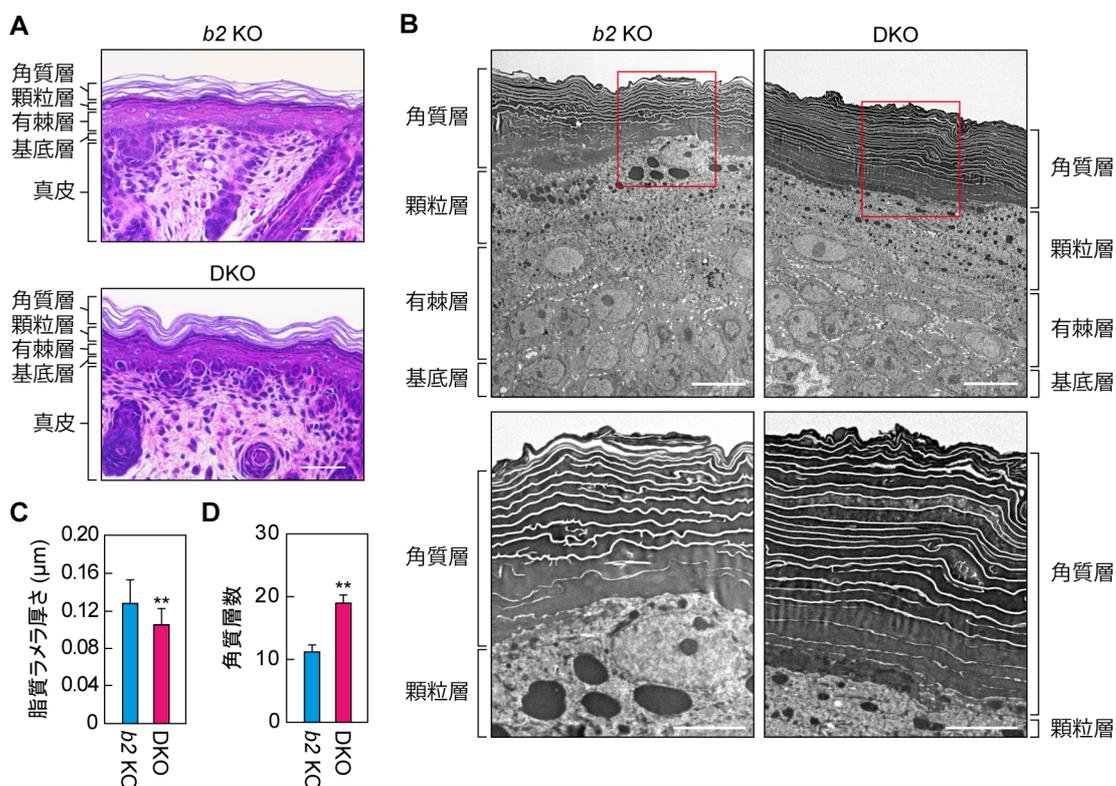


図 9. DKO マウス表皮における過角化と脂質ラメラの狭小化

A) 生後 0 日の *Aldh3b2* KO マウスおよび DKO マウスから回収した皮膚切片を用い、HE 染色を行った。スケールバーは 50 μm を示す。(B–D) 生後 0 日の *Aldh3b2* KO マウスおよび DKO マウス皮膚から超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。B の下側の図は上側の図の赤で囲んだ領域の拡大した図を示す。スケールバーは上の図において 10 μm を、下の図において 5 μm を示す。脂質ラメラの厚さ (C) および角質層の層数 (D) は 5 つの視野を用いて計数した値の平均値+標準偏差を示し、Student's *t*-test によって有意検定を行った (***P* < 0.01)。b2 KO, *Aldh3b2* KO

2-2-4. DKO マウス表皮におけるアシルセラミドの減少

DKO マウス表皮において脂質ラメラの形成異常が生じていた原因を調べるために、マウス表皮の脂質組成を解析した。生後 0 日の WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウス表皮から回収した脂質を TLC によって分離後、脂質を非特異的に検出できる銅リン酸試薬によって呈色した。その結果、WT マウスと *Aldh3b2* KO マウスは同様の脂質組成であったが、DKO マウスの表皮ではこれらのマウスと比較して、アシルセラミドやアシルセラミドの分解産物であると考えられる *O*-アシル- ω -OH 脂肪酸 (OAHFA) の減少及びアシルセラミドの前駆体である ω -OH セラミドの増加が見られた (図 10A)。その他の脂質の量には WT, *Aldh3b2* KO マウスおよび DKO マウスの間に明らかな違いは見られなかった。

次に、TLC において量の変化が見られた脂質について、液体クロマトグラフィー連結タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) によって詳細かつ定量的な解析を行った。まず、アシルセラミドの解析を行ったところ、WT マウスと *Aldh3b2* KO マウスと比較して、DKO マウスの表皮ではアシルセラミドの総量が減少しており、WT マウスの約 6 割程度であった (図 10B)。アシルセラミドには ω -OH 脂肪酸部分の鎖長の違いによる異なる分子種が存在するが、DKO マウス中で特に C32:1, C34:1 アシルセラミドの量の減少が大きく、WT マウスのおよそ半分であった。

アシルセラミドの分解産物と考えられるリノール酸含有 OAHFA の量は DKO マウス表皮において WT マウスと比較して多くの分子種で減少しており、総量でおよそ WT マウスの 25%であった (図 10C)。一方、アシルセラミドの前駆体である ω -OH セラミドの量は DKO マウス表皮においてほとんど全ての分子種で WT マウスよりも増加しており、総量では WT マウスの約 4 倍であった (図 10D)。以上のように、DKO マウス表皮ではアシルセラミド産生の最終ステップのトランスアシレーション反応の基質である ω -OH セラミドの増加と、生成物であるアシルセラミドおよびその分解産物と考えられる OAHFA の減少が観察された。このことは DKO マウス表皮においてトランスアシレーション反応が阻害されていることを示唆している。アシルセラミドは皮膚バリア機能に必須な役割を担う脂質であり、その合成に関わる遺伝子の全てが魚鱗癬原因遺伝子である¹²⁻¹⁶⁾。このことから、DKO マウスでの皮膚バリア異常はアシルセラミドの減少に起因すると予測される。

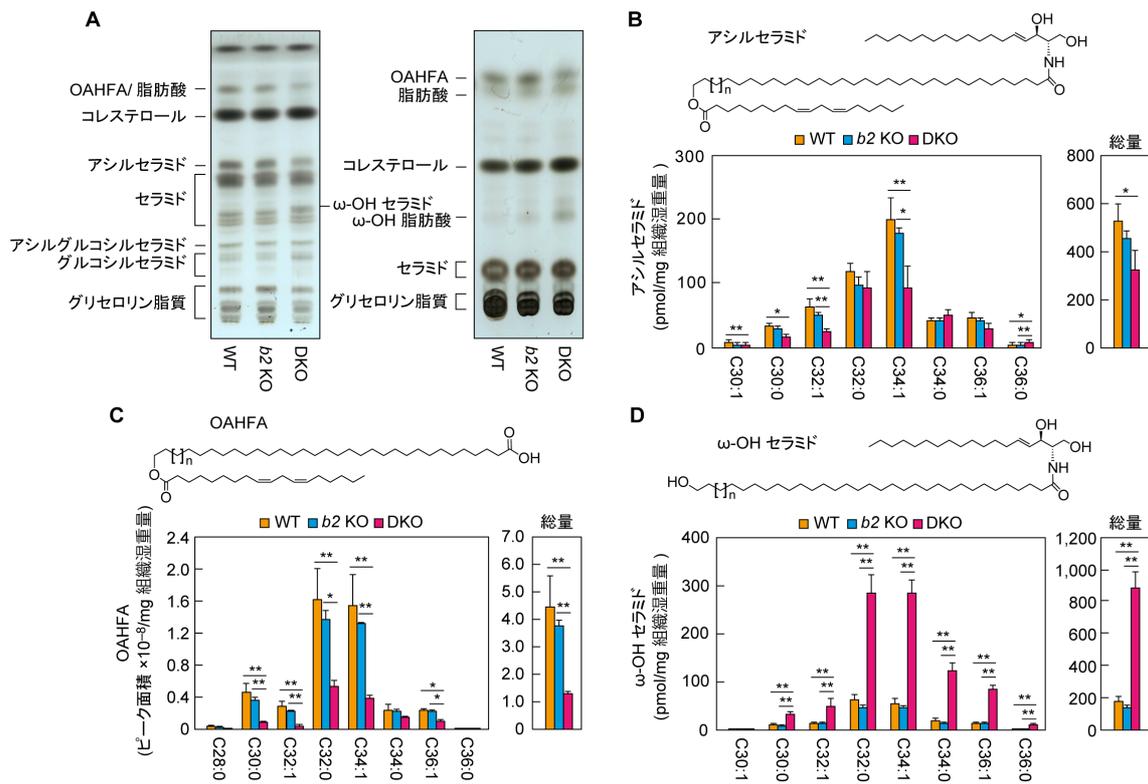


図 10. DKO マウス表皮におけるアシルセラミドの減少

(A) 生後 0 日の WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウス表皮から脂質を抽出し, TLC を用いて 2 種の展開系で分離した。左の図はセラミドの分離に適した展開系で分離し, 右の図はより極性の低い脂質の分離に適した展開系で分離した結果を示す。脂質は銅リン酸試薬を用いて検出した。(B-D) 生後 0 日の WT (n=3), *Aldh3b2* KO マウス (n=3), DKO マウス (n=3) の表皮から脂質を抽出し, アシルセラミド (B), OAHFA (C), ω-OH セラミド (D) を LC-MS/MS によって解析した。左のグラフは鎖長と不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を示し, 右のグラフは総量を示す。それぞれの脂質の構造をグラフの上に示す。値は平均値+標準偏差を示し, Tukey's test によって有意検定を行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。b2 KO, *Aldh3b2* KO

2-2-5. DKO マウス表皮において結合型セラミドの量は正常である

アシルセラミドの一部は角質細胞の表面タンパク質と共有結合した結合型セラミドへ変換される。結合型セラミドは角質細胞の細胞表面を覆う角質細胞脂質エンベロープの構成成分であり, アシルセラミドと共に皮膚バリア形成に重要である。そこで, 次に結合型セラミドを LC-MS/MS によって定量した。その結果, WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウスの間で結合型セラミド量に有意な差は見られなかった (図 11A)。

次に, 一般的な非アシル化セラミドクラスである NS タイプのセラミドの定量を行った。DKO マウス中では WT と *Aldh3b2* KO マウスと比較して, ほぼ全ての分子種でセラ

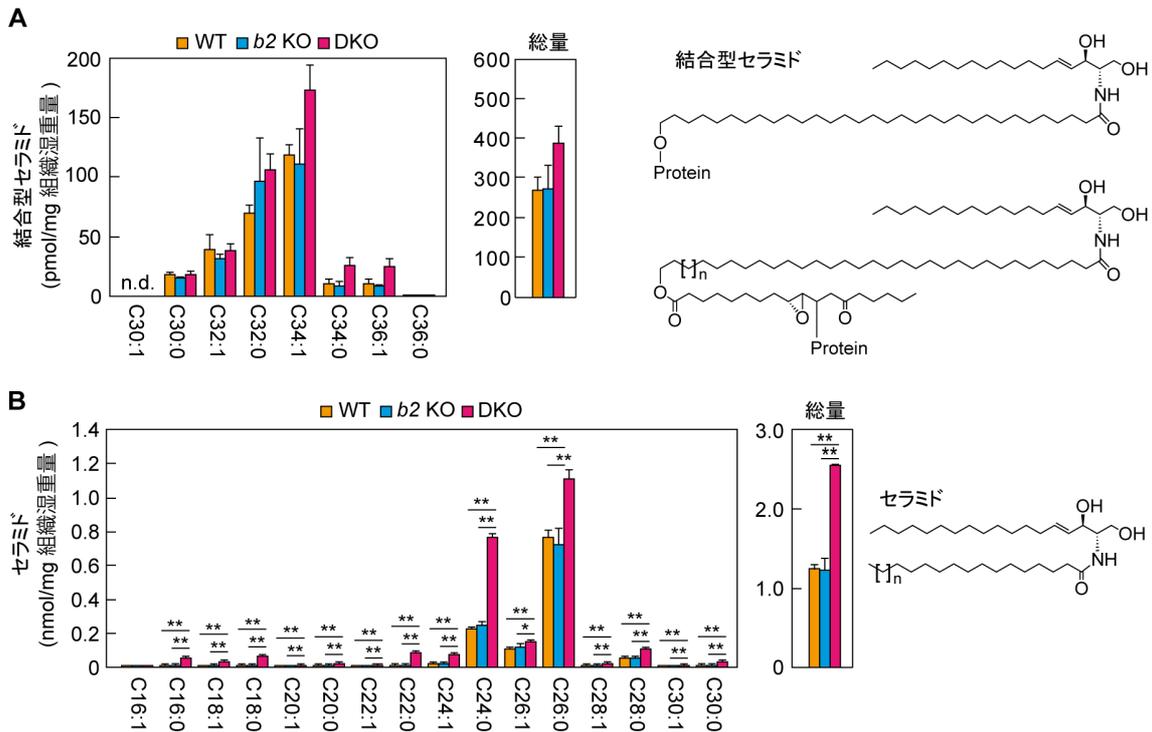


図 11. DKO マウス表皮において結合型セラミド量は変化しない

(A, B) 生後 0 日の WT (n = 3), *Aldh3b2* KO マウス (n = 3), DKO マウス (n = 3) 表皮から脂質を抽出し, 結合型セラミド (A) とセラミド (B) を LC-MS/MS により解析した。左のグラフは鎖長, 不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を示し, 右のグラフは総量を示す。それぞれの脂質の構造をグラフの右に示す。値は平均値+標準偏差を示し, Tukey's test によって有意差検定を行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。b2 KO, *Aldh3b2* KO

ミド量が増加しており, 総量でおよそ 2 倍であった (図 11B)。以上のように, DKO マウス中ではアシルセラミドが減少し, そのかわりに非アシル化セラミドが増加していることが明らかとなった。また, 結合型セラミドはアシルセラミドから派生するにもかかわらず, DKO マウス中で減少していなかった。このことから, DKO マウスにおける皮膚バリア機能低下はアシルセラミド減少のみに起因すると考えられる。

2-2-6. DKO マウス表皮におけるトリグリセリドの増加

アシルセラミドは長鎖塩基と結合した脂肪酸の ω 末端にリノール酸がエステル結合した構造を持つ。アシルセラミド産生の最終ステップ (トランスアシレーション反応) では ω -OH セラミドへリノール酸含有 TG からリノール酸が転移される。DKO マウス表皮においてトランスアシレーション反応の基質である ω -OH セラミドの増加が観察

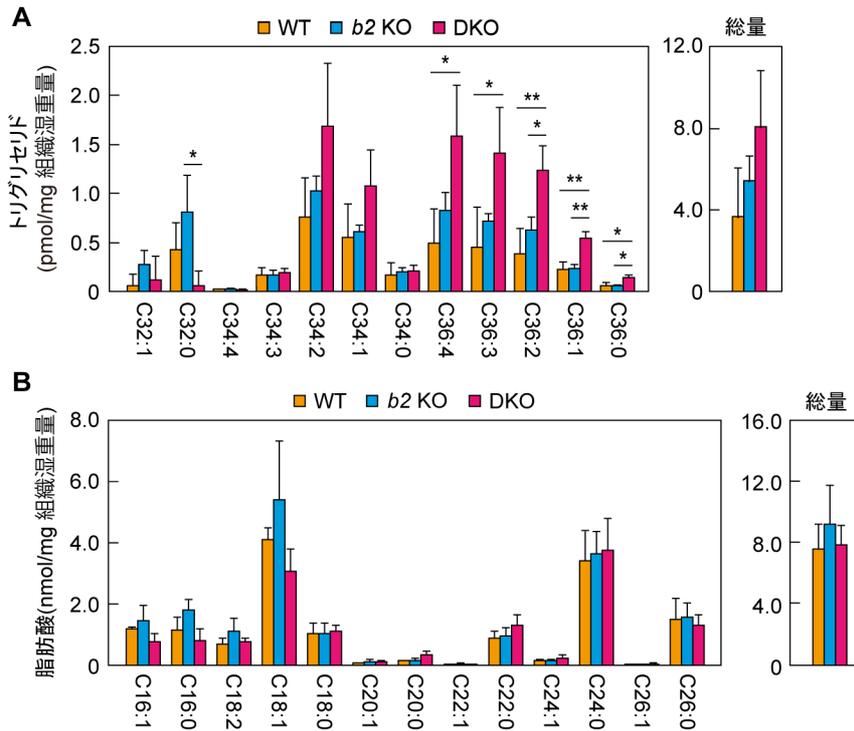


図 12. DKO マウス表皮におけるトリグリセリドの増加

(A, B) 生後 0 日の WT (n = 3), *Aldh3b2* KO マウス (n = 3), DKO マウス (n = 3) 表皮から脂質を抽出し、リノール酸含有トリグリセリド (A) と遊離脂肪酸 (B) を LC-MS/MS により解析した。左のグラフは鎖長, 不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を示し, 右のグラフは総量を示す。図 A の横軸の鎖長の数字はリノール酸以外の 2 本の脂肪酸部分の合計を示す。値は平均値+標準偏差を示し, Tukey's test によって有意差検定を行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。b2 KO, *Aldh3b2* KO

された (図 10D) ため, もう 1 つの基質であるリノール酸含有 TG の量を調べることにした。LC-MS/MS 解析によりリノール酸含有 TG を定量した結果, DKO マウス表皮では WT マウスと *Aldh3b2* KO マウスに比べて多くのリノール酸含有 TG 分子種が増加しており, 総量では WT マウスの約 2 倍であった (図 12A)。次に, 表皮中の遊離脂肪酸量を測定した。リノール酸を含めたいずれの遊離脂肪酸量も WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウス間で差はなかった (図 12B)。以上の結果から, DKO マウス表皮においてリノール酸含有 TG が増加しており, アシルセラミドの減少は基質量の減少が原因ではないことが示され, DKO マウスにおいてトランスアシルレーション反応の基質である ω -OH セラミドと TG が共に増加することが明らかとなった。

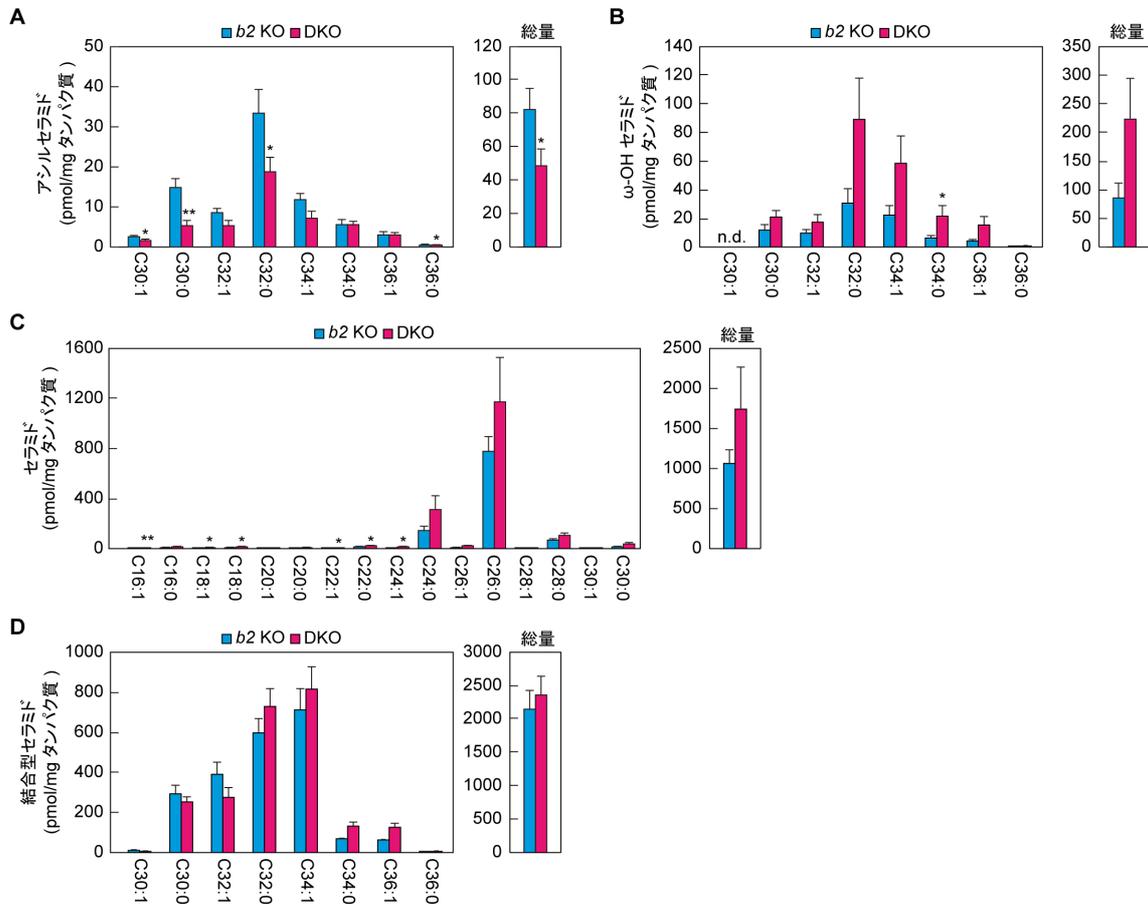


図 13. DKO マウス角質層におけるアシルセラミドの減少

(A-D) 生後 0 日の *Aldh3b2* KO マウス (n=3) と DKO マウス (n=3) にテープストリッピングを行い、角質層サンプルを回収した。角質層を回収したテープから脂質を抽出し、アシルセラミド (A), ω-OH セラミド (B), セラミド (C), 結合型セラミド (D) を LC-MS/MS を用いて解析した。左のグラフは鎖長と不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を示し、右のグラフは総量を示す。値は平均値+標準偏差を示し、Tukey's test によって有意差検定を行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n.d., not detected.)。 *b2* KO, *Aldh3b2* KO

2-2-7. DKO マウス角質層におけるアシルセラミドの減少

脂質ラメラは表皮において角質層に存在し、皮膚バリア機能に必須である。DKO マウス表皮においてアシルセラミドが減少していることが明らかとなったが (図 10B), 表皮全体ではなく脂質ラメラが存在する角質層においてもアシルセラミドの減少が生じているかを次に調べた。テープストリッピングによって生後 0 日目の *Aldh3b2* KO 及び DKO マウスから角質層を回収し、脂質を抽出したのち、LC-MS/MS により解析した。その結果、アシルセラミドの総量が DKO マウスにおいて *Aldh3b2* KO マウスの 60%程

度に減少していた (図 13A)。なかでも, C30:0 と C32:0 アシルセラミドの減少量が *Aldh3b2* KO マウスのそれぞれ 40%, 55%程度であった。この結果は表皮の解析結果とほぼ一致していた。一方, ω -OH セラミドの総量は DKO マウス角質層において有意ではないものの, *Aldh3b2* KO マウスの 2.6 倍に増加していた (図 13B)。DKO マウス角質層では NS タイプのセラミドの総量も *Aldh3b2* KO マウスの 1.6 倍の増加傾向を示した (図 13C)。結合型セラミドについては, DKO マウスと *Aldh3b2* KO マウスとの間に変化は見られなかった (図 13D)。以上の結果は表皮全体の脂質解析結果とほぼ一致しており, アシルセラミドの減少が DKO マウスの皮膚バリア機能異常の要因となることが確認された。

2-2-8. DKO マウス表皮におけるアシルセラミド合成関連遺伝子の発現は正常である

アシルセラミド合成の最終ステップであるトランスアシレーション反応はトランスアシラーゼである PNPLA1 によって触媒される²³⁻²⁶。また, α/β 加水分解酵素ファミリータンパク質 ABHD5 もこの反応には必要であり, PNPLA1 による TG の利用を促進させ

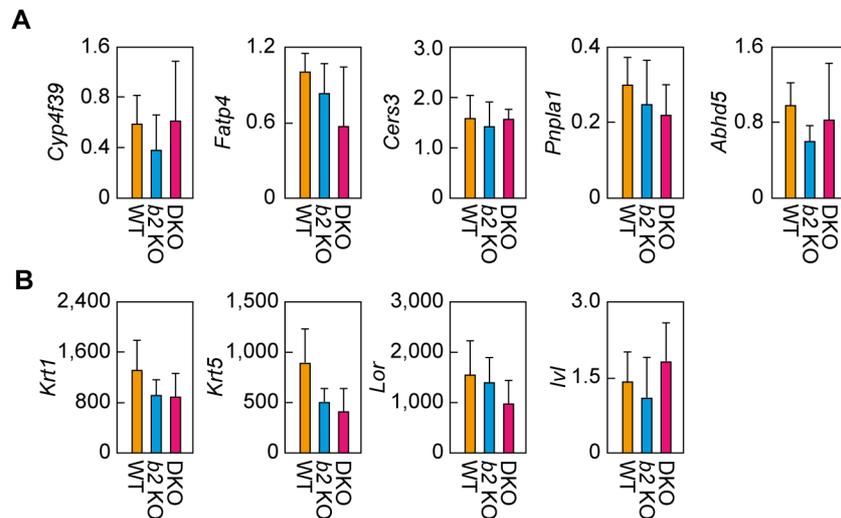


図 14. DKO マウス表皮においてアシルセラミド合成関連遺伝子とケラチノサイト分化マーカー遺伝子の発現量は変化しない

(A, B) 生後 0 日の WT (n = 3), *Aldh3b2* KO マウス (n = 3), DKO マウス (n = 3) 表皮から総 RNA を調製し, 定量的 RT-PCR によりアシルセラミド合成関連遺伝子 (*Cyp4f39*, *Fatp4*, *Cers3*, *Pnpla1*, *Abhd5*; A) と分化マーカー (*Krt1*, *Krt5*, *Lor*, *Ivl*; B) の mRNA 発現量を測定した。値は *Hprt1* との相対値として求め, 平均値+標準偏差を示す。b2 KO, *Aldh3b2* KO

る役割があると考えられている²³⁻²⁶。アルデヒドはシッフ塩基の形成およびマイケル付加反応によってタンパク質と結合するため¹⁰⁰、DKO マウスにおけるアシルセラミド量の減少は蓄積したアルデヒドが PNPLA1 あるいは ABHD5 タンパク質を攻撃して活性低下を引き起こしていることに起因すると推測されるが、これらの遺伝子発現の低下が原因であることも否定はできない。そこで、*Pnpl1*、*Abhd5* の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた。その結果、*Pnpl1* と *Abhd5* の mRNA 量は WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウス間で差はなかった (図 14A)。また、他のアシルセラミド合成関連遺伝子 (*Cyp4f39*, *Fatp4*, *Cers3*) やケラチノサイト分化マーカー (基底層, ケラチン 5/*Krt5*; 有棘層および顆粒層, ケラチン 1/*Krt1*, ロリクリン/*Lor*, インボルクリン/*Ivl*) についてもこれらマウス間で発現量に違いはなかった (図 14A, B)。以上の結果より、DKO マウス表皮におけるアシルセラミドの減少はアシルセラミド合成関連遺伝子の発現低下やケラチノサイトの分化異常によるものではないことが示された。

2-2-9. DKO マウス由来の分化ケラチノサイトにおける長鎖塩基代謝異常

ケラチノサイトにおける主要な脂肪族アルデヒドの 1 つが長鎖塩基由来の長鎖アルデヒド (SPH から由来するトランス-2-ヘキサデセナールや DHS に由来するヘキサデカナールなど) である。*de novo* スフィンゴ脂質合成経路あるいはスフィンゴ脂質/セラミドの分解によって生じた長鎖塩基は複合スフィンゴ脂質 (スフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質) へと代謝されるか、長鎖塩基 1-リン酸を介した分解経路によって (エステル型) グリセロ脂質へと代謝される (図 15A)^{6,59}。これまでに当研究室では *Aldh3a2* が欠損した CHO-K1 細胞, 神経細胞, 未分化のケラチノサイト中で長鎖アルデヒドから長鎖脂肪酸への変換が損なわれ, その代わりに長鎖アルデヒドは長鎖アルコールへと変換後, エーテル型グリセロ脂質 (プラズマニル/プラズメニルエタノールアミンなど) へ異常代謝されることを明らかにしている^{59,91,92}。

DKO マウスから調製したケラチノサイト中での長鎖塩基代謝を調べるために、^[3H]DHS のトレーサー解析を行った。脂質抽出後, 半分はアルカリ処理 (グリセロ脂質などに含まれるエステル結合を加水分解) を行わず, 残りの半分はアルカリ処理に供したのち, TLC によって分離し, オートラジオグラフィによって検出した。WT マウス由来の未分化ケラチノサイト中では, DHS はスフィンゴ脂質 (セラミド, グルコシルセラミド, スフィンゴミエリン) およびグリセロ脂質 (ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルセリン, ホスファチジレイノシトール, ホスファチジルコリン, TG) へ代謝された (図 15B)。未分化の *Aldh3a2* KO マウス由来ケラチノサイト中では, 以前

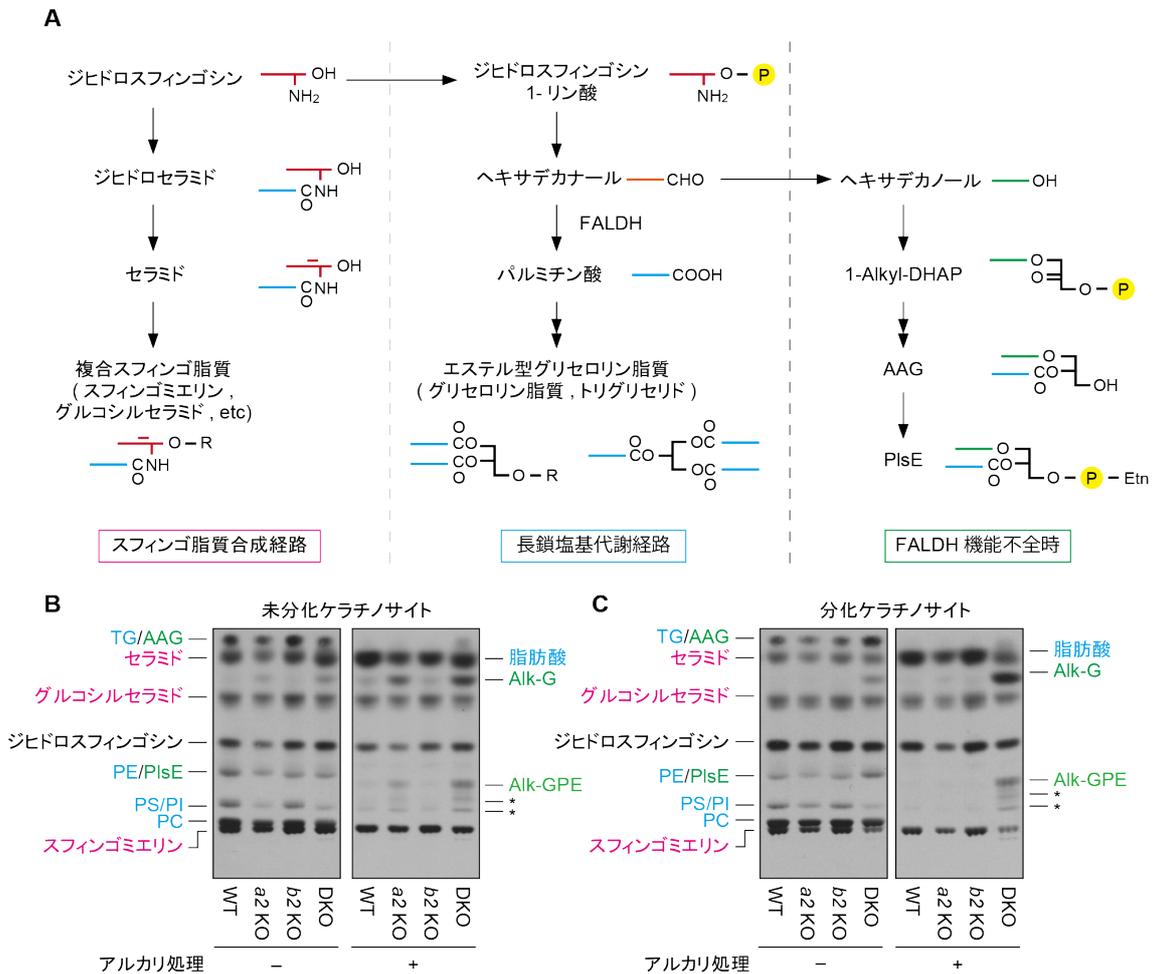


図 15. DKO マウスケラチノサイトにおける長鎖塩基代謝異常

(A) DHS の代謝経路を示す。DHS は通常、左の経路に示すようにスフィンゴ脂質に取り込まれるか、中央の経路に示すように長鎖塩基代謝経路によりエステル型グリセロ脂質へと代謝される。しかし、FALDH に機能異常が生じている場合、DHS は右の経路に示すようにエーテル型グリセロ脂質へと代謝される。それぞれの脂質分子の簡易的な構造も示す。

DHAP, ジヒドロキシアセトンリン酸; AAG, 1-アルキル/アルケニル-2-アシル-グリセロール; PlsE, プラズマニル/プラズメニルエタノールアミン。(B, C) 生後 0 日の WT, *Aldh3b2* KO, DKO マウスから初代培養ケラチノサイトを調製し、未分化ケラチノサイト

(B) および分化ケラチノサイト (C) を $[^3\text{H}]\text{DHS}$ で 37°C , 4 時間標識した。脂質を抽出し、半分をアルカリ処理した後、TLC を用いて展開し、オートラジオグラフィーで検出した。アスタリスクはアルカリ処理によりプラズマニル/プラズメニルエタノールアミンを分解した際に生じる分解産物。スフィンゴ脂質合成経路により生じた脂質をマゼンタで、通常時の長鎖塩基代謝経路により生じた脂質を水色で、FALDH 機能不全時の長鎖塩基代謝経路により生じた脂質を緑で示す。Alk-G, 1-アルキル/アルケニルグリセロール; Alk-GPE, 1-アルキル/アルケニルグリセロホスホエタノールアミン; PC, ホルファチジルコリン; PE,

ホスファチジルエタノールアミン ; PI, ホスファチジルイノシトール ; PS, ホスファチジルセリン ; a2 KO, *Aldh3a2* KO ; b2 KO, *Aldh3b2* KO

の報告通り⁹¹⁾, DHS からの (エステル型) グリセロ脂質への代謝が減少し, その代わりにエーテル型グリセロ脂質 (プラズマニル/プラズメニルエタノールアミン (PlsE) と 1-アルキル/アルケニル-2-アシル-グリセロール (AAG)) へと一部が代謝されていた。アルカリ処理を行ったサンプルでは, エステル型グリセロ脂質から脂肪酸が遊離したのに対して, エーテル型グリセロ脂質からは 1-アルキル/アルケニルグリセロール (Alk-G) とそのホスホエタノールアミン付加体が検出された。*Aldh3b2* KO マウス由来未分化ケラチノサイト中での DHS の代謝は正常であった。DKO マウスから調製した未分化ケラチノサイトでは, DHS からエーテル型グリセロ脂質への代謝異常が *Aldh3a2* KO マウス由来ケラチノサイトよりも亢進していた。

次に分化したケラチノサイトを用いて³H]DHS のトレーサー解析を行った。*Aldh3a2* KO, *Aldh3b2* KO マウス由来分化ケラチノサイト中での DHS の代謝は WT マウス由来ケラチノサイトと同様であった (図 15C)。一方, DKO マウスから調製した分化ケラチノサイトでは, DHS からエーテル型グリセロ脂質への異常代謝が観察された。以上の結果より, DKO マウス由来のケラチノサイトでは未分化, 分化に関わらず, 長鎖塩基の代謝異常が生じており, SLS 皮膚病態発症に長鎖塩基の代謝異常が関与することが示唆された。

2-3. 考察

ALDH3A2 は SLS の原因遺伝子であり, これまで SLS モデルマウスとして *Aldh3a2* KO マウスの解析が行われてきた^{91,92)}。*Aldh3a2* KO マウスの脳では長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が WT マウスの約 3 割に低下し, *Aldh3a2* KO マウスは運動機能異常などの神経系の表現型を示した⁹²⁾。一方, 表皮においては *Aldh3a2* KO マウス中で FALDH 活性は低下せず, 皮膚バリア機能はほぼ正常であった⁹¹⁾。これは *Aldh3b2* との重複性によるものである予想された。そこで本研究では真の SLS モデルマウスの作成を目指し, *Aldh3a2 Aldh3b2* DKO マウスを作製し, このマウスが SLS 患者において見られる皮膚症状に似た表現型 (皮膚バリア機能低下や過角化) を示すことを明らかにした (図 8, 9)。

DKO マウス表皮においてアシルセラミド量は WT マウスの 6 割程度へ減少していた (図 10B)。アシルセラミドの減少は SLS 患者においても一例のみで TLC による簡易的な測定ではあるが, 報告されている⁴⁸⁾。アシルセラミド合成関連遺伝子あるいは他の

魚鱗癬原因遺伝子の KO マウスを用いた解析から、アシルセラミド量の減少量と皮膚バリア異常の程度にはよい相関があることが示されている^{16,19,101}。本研究における DKO マウスの皮膚バリア機能低下は軽微であった（図 8）。このことは DKO マウス表皮においてアシルセラミドが 6 割程度残存していたこととよい相関を示す。一方、アシルセラミドから産生される結合型セラミド量は DKO マウスにおいて正常であった（図 11A）。このようなアシルセラミドと結合型セラミド量の非相関の原因は不明であるが、アシルセラミド合成に関わる *Fatp4* KO マウスでもそのような非相関が観察されている²²）。*Fatp4* KO マウスの表皮ではアシルセラミド量が WT マウスの約 10%にまで大きく減少しているのに対し、結合型セラミド量は 65%であった²²）。DKO マウスの表皮では、アシルセラミドとその分解産物と考えられる OAHFA 以外に顕著に量が減少している脂質はなかった（図 10-12）。以上のことから、アシルセラミド量の減少が DKO マウスにおける皮膚バリア異常の主要な原因であると考えられる。

自然分娩条件下において、生後 2 日目以降に生存した DKO マウスは存在しなかった。帝王切開によって調製したマウスの経時的な生存率を比較すると、DKO マウスは平均で 1.5 時間早く *Aldh3b2* KO マウスよりも早く死亡したものの（図 8C）、自然分娩での新生致死性を説明するほどの差ではなかった。DKO マウスの胃にはミルクが見られず、しばしば巣の外に放棄されていた。このことから、自然分娩条件下における DKO マウスの新生致死性は皮膚バリア異常による体内の水分の損失が原因ではなく、母マウスの育児放棄が主な原因である可能性が高い。実際、母マウスによる育児がない状況（帝王切開後の経時的な生存率の解析）では、WT マウスや *Aldh3b2* KO マウスでも約 1 日で死亡する。DKO マウスの見た目（皮膚形態の違い）あるいは臭いが、母マウスの育児放棄につながっている可能性がある。このような母マウスの育児放棄はアシルセラミド産生に関わるセラミド合成酵素 *Cers3* の KO マウスでも報告されており²⁷）、アシルセラミド産生不全によって引き起こされる皮膚バリア異常マウスに共通しているようである。

SLS 病態は蓄積した脂肪族アルデヒドの毒性によって引き起こされると考えられている^{52,57}）。アルデヒドは一般的に第一級アミン（リシン、アルギニン残基）とシッフ塩基を形成する。さらに、アルデヒドの中でも、 α , β 不飽和アルデヒドはカルボニル基と共役し、一般的な求核基を持つアミノ酸残基（ヒスチジン、システイン、トリプトファン残基）ともマイケル付加反応によって反応できるため、通常アルデヒドに比べて毒性が高い^{73,100}）。SLS の患者中の脳あるいは表皮では、重要な働きを持つ何らかのタンパク質が蓄積した脂肪族アルデヒドによって攻撃を受け、活性低下が引き起こされてい

ると考えられる。それでは、どのようなタンパク質が SLS 患者中で実際に阻害されているのであろうか？ALDH3A2 は小胞体タンパク質であるため、*ALDH3A2* 遺伝子変異によって小胞体膜で脂肪族アルデヒドが蓄積すると予測される⁶⁴⁾。そのため、小胞体膜タンパク質が蓄積した脂肪族アルデヒドのターゲットとなっている可能性が高い。また、その中でも脂肪族アルデヒドが活性中心に入り込めるようなタンパク質、つまり基質が脂質であるような酵素、かつアルデヒドによる求核攻撃を受け得るようなアミノ酸残基を活性中心にもつ酵素がターゲットの候補である。当研究室では以前に SLS の神経症状を引き起こす分子機構の解析を通じて、髄鞘に存在する脂肪酸 2 位水酸化酵素 FA2H の機能が低下していることを明らかにした⁹²⁾。FA2H は長鎖脂肪酸を基質とし、2-OH 脂肪酸の産生を触媒する¹⁰²⁾。2-OH 脂肪酸は髄鞘で重要な働きを持つ脂質、2-OH GalCer の前駆体である。FA2H は小胞体膜タンパク質であり、活性中心にヒスチジン残基を有し、上述の SLS で障害されうる酵素のクライテリアを満たしている^{103,104)}。DKO マウス表皮においてアシルセラミド量は減少していたが、その基質である ω -OH セラミドとリノール酸含有 TG は蓄積していた。(図 10, 12)。このことは ω -OH セラミドとリノール酸含有 TG からアシルセラミドを産生するトランスアシレーション反応が阻害されていることを示唆している。この反応はトランスアシラーゼ PNPLA1 によって触媒され、 α/β 加水分解酵素ファミリータンパク質 ABHD5 が PNPLA1 の TG 利用を促進すると考えられている^{25,26)}。ABHD5 は PNPLA1 以外にもトリグリセリドリパーゼである ATGL/PNPLA2 や PNPLA3 の TG 利用も促進すると考えられている^{105,106)}。PNPLA1 は常染色体潜性先天性魚鱗癬、ABHD5 は症候性魚鱗癬であるドルフマン・シャナリン症候群の原因遺伝子である¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾。DKO マウス表皮において、これらのタンパク質のどちらかが蓄積した脂肪族アルデヒドによる攻撃をうけると予測される。Pnpl1 KO マウス表皮における TG 量は正常であるのに対し、Abhd5 KO マウス表皮では TG 量が増加することが報告されている²³⁾。本研究において DKO マウス中で TG 量が増加していること(図 12A)を考慮すると、Abhd5 が DKO マウス中で阻害されている可能性が高い。ABHD5 は α/β 加水分解酵素ファミリーに属す。このファミリータンパク質は求核性アミノ酸残基(セリン, システイン, アスパラギン酸), 酸性アミノ酸残基(アスパラギン酸, グルタミン酸), ヒスチジン残基からなる触媒三残基を有す¹⁰⁸⁾。しかし、ABHD5 では求核性アミノ酸残基がアスパラギン残基に置換されているため、加水分解活性を持たない。その代わりに、TG に結合する能力を保持し、PNPLA タンパク質に提示する活性を持つと推測される。ABHD5 は脂肪滴と小胞体の境界面に局在し、活性中心にヒスチジン残基を持つ。このように、ABHD5 は上述の SLS で障害されうる酵素のクライテリ

アを満たしており、SLSにおいて蓄積した長鎖アルデヒドのターゲットタンパク質である可能性が高い。

生体内では様々な経路／反応から ALDH3A2 の基質である脂肪酸アルデヒドが産生される。これらにはセラミド／長鎖塩基の分解経路、脂肪酸アルコールの酸化、エーテルリン脂質の分解、脂質の過酸化、ロイコトリエン B₄ の代謝を含む^{6,42)}。これらのうち、FALDH 活性低下によってケラチノサイトにおいて代謝異常が生じることが証明されたのはセラミド／長鎖塩基の分解経路のみである (図 15B, C)。セラミド／長鎖塩基の分解経路では、長鎖アルデヒドを産生する SPH 1-リン酸リアーゼが小胞体に局在するため、長鎖アルデヒドは小胞体で産生される¹¹⁰⁾。セラミドは表皮に多量に存在 (他の組織の数 10 倍) するため、その分解過程で生じる長鎖アルデヒド量も他の組織よりも多いと予測される¹¹¹⁾。セラミドを構成する長鎖塩基の中で、最も量が多いのは SPH である。SPH の分解過程で生じるトランス-2-ヘキサデセールはアルデヒドの中でも反応性の高い α , β 不飽和アルデヒドである。*in vitro* の実験からトランス-2-ヘキサデセナールはヒスチジン残基と最も安定的な付加反応体を産生することが報告されている¹⁰⁰⁾。ヒスチジン残基は SLS 中で活性が低下していると予測される FA2H と ABHD5 の活性中心を構成するアミノ酸残基である¹⁰⁴⁾。また、当研究室では、ALDH3A2 KO ヒト不死化ケラチノサイトを作製・解析し、アシルセラミド量が減少することを明らかとしている (荒井未発表データ)。さらに、長鎖塩基由来の長鎖アルデヒドが実際にアシルセラミド産生に影響しているかどうかを明らかにするため、SGPL1 (SPH 1-リン酸リアーゼ) も欠損させることで長鎖塩基由来の長鎖アルデヒド産生経路を遮断させた ALDH3A2 SGPL1 DKO ケラチノサイトを作製し、アシルセラミド量を解析したところ、アシルセラミド量の減少が回復することを見出している (荒井未発表データ)。以上のことから、脂肪酸アルデヒドの中でも、セラミド／長鎖塩基の分解経路で生じる長鎖アルデヒドが SLS 発症に主要に寄与していると考えられる。

本研究では真の SLS 皮膚病態モデルマウスを確立し、アシルセラミドの減少が SLS 皮膚病態発症を引き起こすことを明らかにした。また、アシルセラミド減少の分子機構として、長鎖塩基／セラミド分解経路で生じるトランス-2-ヘキサデセナールがアシルセラミド産生の最終ステップの反応を阻害 (特に ABHD5 の活性阻害) するというモデルを提唱した。ABHD5 とトランス-2-ヘキサデセールとの付加反応体に関しては、技術的な問題から検出できていないが、将来の技術的な進歩 (特に付加反応体の検出感度の上昇) による解明が望まれる。また、長鎖塩基／セラミド分解経路の阻害剤による SLS 治療への応用が期待される。

3. 表皮の長鎖塩基産生を担うセラミダーゼの探索

3-1. 研究背景と目的

セラミドはセラミダーゼによって長鎖塩基と脂肪酸へ分解される。産生された長鎖塩基は、再度セラミド合成に用いられるか、長鎖塩基分解経路によって分解される。これまでの解析から、SLS では FALDH 機能低下により長鎖塩基代謝経路に異常が生じ、蓄積した長鎖アルデヒドが病態発症に関与することが示唆された。そのため、長鎖アルデヒドの前駆体である長鎖塩基を減少させることが SLS 病態の治療につながると考えられる。長鎖塩基のうち、DHS は *de novo* 合成経路およびセラミダーゼによるセラミド分解経路の両方によって産生されるが、SPH などの他の長鎖塩基はセラミド分解経路のみで生じる。

哺乳類の多くの組織に存在する遊離脂肪酸は長鎖脂肪酸が主要である一方、表皮においては極長鎖脂肪酸が豊富に存在する。しかし、表皮極長鎖脂肪酸の主要な産生経路は不明である。表皮には極長鎖脂肪酸を含有するセラミドが豊富に存在し、セラミダーゼによる分解が極長鎖脂肪酸を供給している可能性がある。

哺乳類では5種のセラミダーゼが存在するが、これまで表皮においてどのセラミダーゼが主に働いているかは不明である。そこで本研究では、セラミダーゼ欠損ケラチノサイトを作製することによって表皮における主要なセラミダーゼを明らかにするとともに、表皮の長鎖塩基および遊離脂肪酸産生の分子機構を解明することを目的に研究を行った。

3-2. 結果

3-2-1. *ASAH1* KO ケラチノサイトにおけるセラミド分解の低下

表皮では酸性セラミダーゼ *ASAH1* および塩基性セラミダーゼ *ACER1* が高発現している^{112,113})。そこで、これらの表皮における長鎖塩基および遊離極長鎖脂肪酸産生への関与を調べるために、CRISPR/Cas9 システムによって *ASAH1* または *ACER1* を KO させたヒト不死化ケラチノサイトを作製した。得られたクローン間での表現型の違いによる影響を考慮し、それぞれ異なるフレームシフト変異を持つ2つのクローン (KO1 および KO2) を解析に用いた。また、コントロール細胞として、*ASAH1* KO ケラチノサイト作

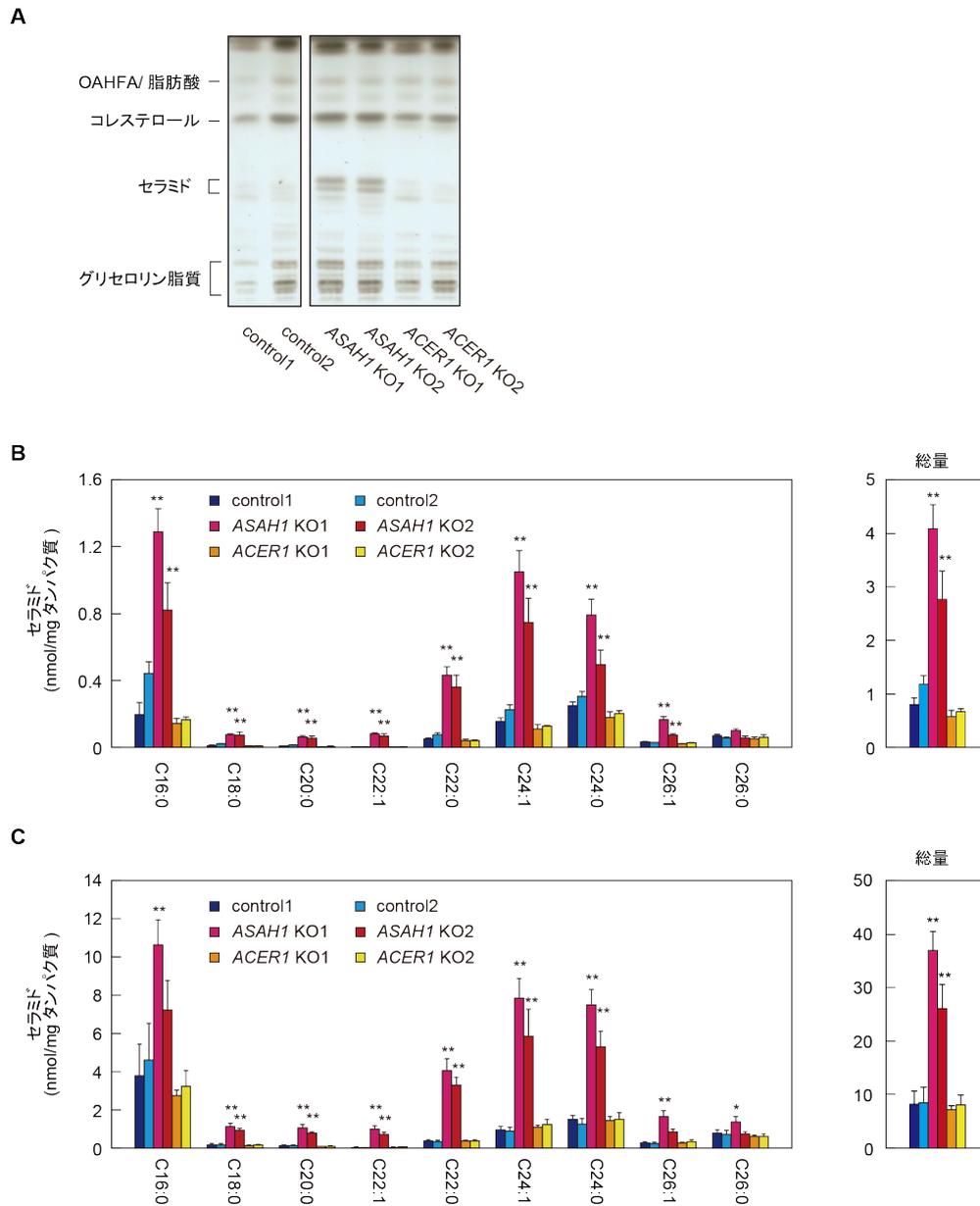


図 16. *ASAH1* KO ケラチノサイトにおけるセラミドの増加

(A) 14 日間分化させたそれぞれ 2 クローン of control, *ASAH1* KO, *ACER1* KO ケラチノサイトから脂質を抽出し, TLC によりセラミドの分離に適した展開系で分離し, 銅リン酸試薬を用いて検出した。(B, C) 未分化 (B) および 7 日間分化 (C) させたそれぞれ 2 クローンの control, *ASAH1* KO, *ACER1* KO ケラチノサイトから脂質を抽出し, セラミドを LC-MS/MS により定量した。左のグラフは鎖長, 不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を示し, 右のグラフは総量を示す。値は平均値+標準偏差を示し, Dunnett's test によって有意差検定を行った ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, vs control 1)。

製時に変異が導入されなかった2クローンの(コントロール1および2)細胞を使用した。

作製したコントロールおよびセラミダーゼ KO ケラチノサイトを14日間分化させたのち、脂質を抽出し、TLCにより分離後、銅リン酸試薬によって呈色した。その結果、コントロールと *ACERI* KO ケラチノサイトの間では明らかな脂質組成の変化は見られなかったが、*ASAHI* KO ケラチノサイトではコントロールと比較してセラミド量が増加していた(図16A)。

次に、脂質組成の変化を詳細に調べるために未分化および7日間分化させたケラチノサイトから脂質を回収し、LC-MS/MSによる定量解析を行った。セラミドを測定した結果、未分化、分化いずれにおいても *ACERI* KO ケラチノサイトではコントロールとの間に変化は見られなかった(図16B, C)。一方、*ASAHI* KO ケラチノサイトではコントロールと比較して全ての分子種でセラミド量が増加しており、総量ではおよそ4倍に増加していた。これらの結果から、ケラチノサイトにおけるセラミド分解において *ASAHI* が主要に働くことが明らかとなった。また、セラミダーゼの欠損によってセラミド量が大きく増加したことから、未分化、分化いずれにおいてもケラチノサイトではセラミド分解が活発に行われていることが明らかとなった。

3-2-2. *ASAHI* KO ケラチノサイトにおける SPH の減少

長鎖塩基産生におけるセラミド分解経路の寄与を明らかとするため、各セラミダーゼ KO ケラチノサイト中での長鎖塩基量を LC-MS/MS により調べた。哺乳類で主要な長鎖塩基である SPH を定量した結果、未分化ケラチノサイトでは SPH は微量ではあるが検出され、*ACERI* KO ケラチノサイトではコントロールと比較して SPH 量に変化がなかった。一方、*ASAHI* KO ケラチノサイトでコントロールに比べて減少傾向がみられた。(図17)。また、分化ケラチノサイトにおいて、どのクローンにおいても SPH 量は未分化ケラチノサイトに比べて増加した(図17)。分化ケラチノサイトにおいて、*ACERI* KO ケラチノサイトではコントロールと比較して SPH 量に差がなかった一方、*ASAHI* KO ケラチノサイトでは SPH 量がコントロールのおよそ25%に減少していた(図17)。これらの結果から、遊離 SPH はケラチノサイトの分化に伴って増加すること、セラミド分解経路は SPH の産生に大きく寄与していること、その産生には *ASAHI* が関与していることが明らかとなった。

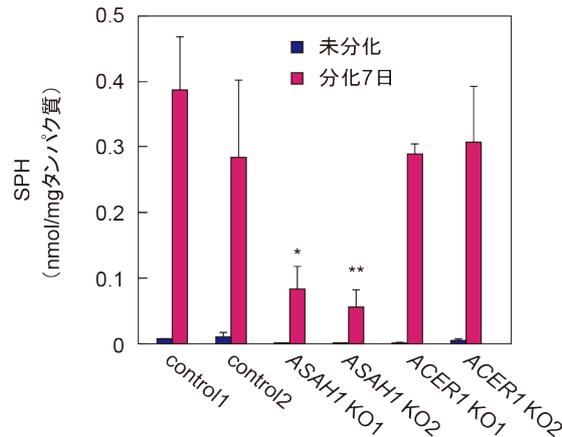


図 17. *ASAH1* KO ケラチノサイトにおける SPH の減少

未分化および7日間分化させたそれぞれ2クローンの control, *ASAH1* KO, *ACER1* KO ケラチノサイトから脂質を抽出し, SPH を LC-MS/MS により定量した。値は平均値+標準偏差を示し, Dunnett's test によって有意差検定を行った (n=3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control1)。

3-2-3. セラミダーゼ KO ケラチノサイトでは脂肪酸量は変化しない

脂肪酸はセラミドの構成成分であることに加え, 遊離脂肪酸は脂質ラメラの主要な構成成分の一つである。表皮におけるセラミド分解経路の極長鎖脂肪酸産生への関与を明らかにするため, 次に各セラミダーゼ KO 細胞中での遊離脂肪酸量を LC-MS/MS によって解析した。未分化ケラチノサイトでは *ACER1* KO2 細胞で脂肪酸量に増加傾向がみられたが, コントロール 1/2, *ACER1* KO1, *ASAH1* KO1/2 細胞間ではいずれの鎖長においても脂肪酸量に有意な差は認められなかった (図 18A)。また, 分化ケラチノサイトでは *ACER1* KO1 細胞で極長鎖脂肪酸量に増加傾向がみられたが, コントロール 1/2, *ACER1* KO1, *ASAH1* KO1/2 細胞間ではいずれ鎖長においても脂肪酸量に有意な差は認められなかった (図 18B)。これらの結果から, ケラチノサイトにおいてセラミド分解経路は極長鎖脂肪酸を含む遊離脂肪酸の主要な産生経路ではないことが示唆された。

3-3. 考察

SLS の病態発症の原因物質の一つである長鎖アルデヒドの前駆体である長鎖塩基の産生に関わるセラミダーゼは不明であった。また, 脂質ラメラの主要構成成分の一つである遊離極長鎖脂肪酸の供給源についても不明な点が多く残されていた。本研究では, 表

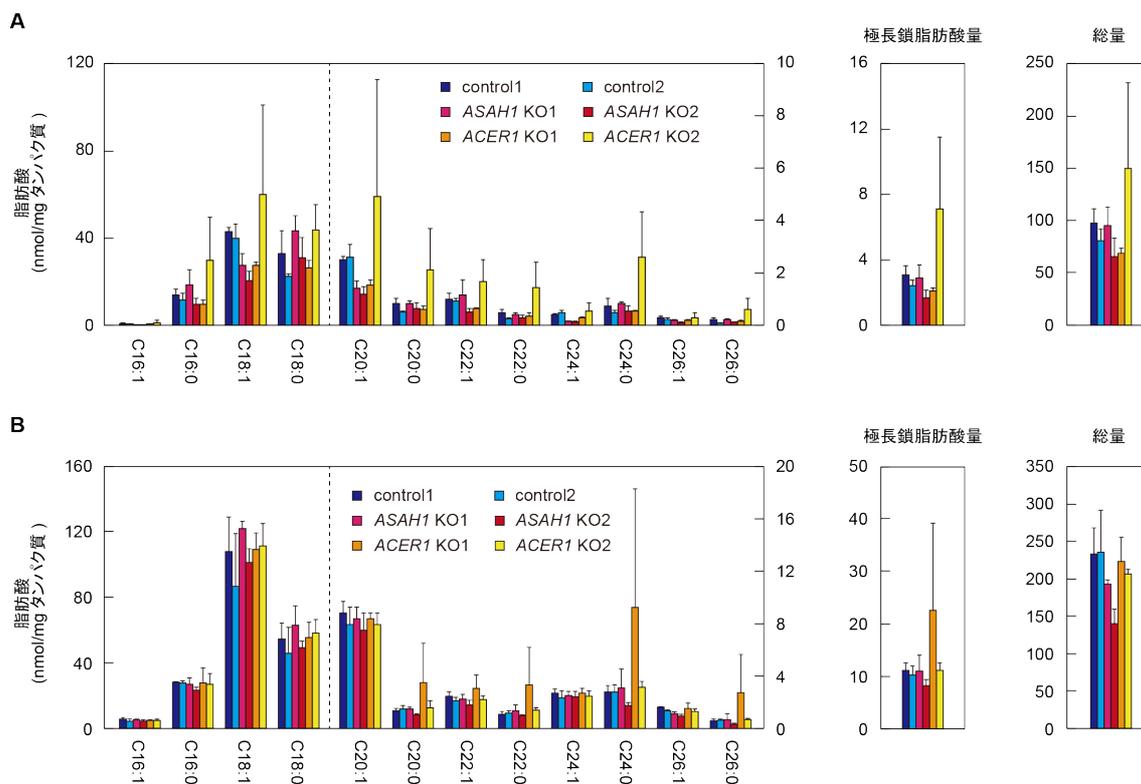


図 18. セラミダーゼ KO ケラチノサイトでは遊離脂肪酸量は減少しない

(A, B) 未分化 (A) および 7 日間分化 (B) させたそれぞれ 2 クローン の control, *ASAH1* KO, *ACER1* KO ケラチノサイトから脂質を抽出し、脂肪酸量を LC-MS/MS によって解析した。左のグラフは鎖長と不飽和度による脂質分子種ごとの定量値を、中央のグラフは極長鎖脂肪酸 (C22 以上) の量を、右のグラフは総量を示す。値は平均値+標準偏差を示す (n=3)。

皮の長鎖塩基産生に關与するセラミダーゼが *ASAH1* であること (図 16), セラミドの分解がケラチノサイトでは活発に行われていることを明らかとした (図 16, 17)。一方, 遊離極長鎖脂肪酸の由来はセラミドではないことが示された (図 18)。これまでに *Asah1* と *Acer1* の KO マウスが作製されている。*Asah1* KO マウスは胎生致死であり, 表皮のセラミド代謝への寄与は不明である。一方, *Acer1* KO マウスは正常に出生し, 毛の減少や毛幹に異常が生じることが報告されている^{83,90}。*Acer1* は表皮において顆粒層や角質層といった分化後期のケラチノサイト, 毛包, 皮脂腺において高発現し, *Acer1* KO マウスでは表皮においてセラミド量が WT マウスの約 1.2 倍とわずかではあるが増

加することが報告されている⁹⁰⁾。しかし、本研究で作製した *ACER1* KO ケラチノサイトではセラミド量に変化はみられなかった。このような違いが見られた要因は、ヒト(本研究)とマウス種間での *ASAHI*/*Asah1* と *ACER1*/*Acer1* の発現量の違いによるものである可能性が考えられる。

分化ケラチノサイトにおいて、*ACER1* KO ケラチノサイトでは長鎖塩基である SPH 量に変化はみられなかったが、*ASAHI* KO ケラチノサイトでは SPH がコントロールの 25%程度に減少していた(図 17)。長鎖塩基のうち DHS は *de novo* 合成経路およびセラミド分解経路によって生じる。*de novo* 合成経路ではセリンとパルミトイル CoA の縮合反応により、3-ケトジヒドロスフィンゴシンがまず産生される¹¹⁴⁾。3-ケトジヒドロスフィンゴシンは還元されて DHS となる¹¹⁵⁾。DHS はセラミド合成酵素 CERS によって脂肪酸とアミド結合を形成しジヒドロセラミドとなったのち、ジヒドロセラミド不飽和化酵素 DEGS1 により不飽和化を受け、SPH を持つセラミドとなる。哺乳類の DEGS1 は DHS を SPH に変換できないため¹¹⁶⁾、SPH はセラミドの分解によってのみ産生される。長鎖塩基はセラミドおよび複合スフィンゴ脂質の代謝中間体であるため、通常細胞内では遊離の長鎖塩基の量は少ない。未分化ケラチノサイトにおいて、*ASAHI* KO ケラチノサイトではセラミド量が増加しているものの分化ケラチノサイトに比べ絶対量は小さく(図 16B)、未分化ケラチノサイトでは SPH はほとんど検出されなかったことから(図 17)、未分化ケラチノサイトではセラミド分解がほとんど行われていないことが推測される。一方、分化ケラチノサイトでは、未分化ケラチノサイトに比べてセラミド量が大きく増加していた(図 16C)。そのため、セラミドの分解過程で生じた SPH 量も大きく増加したと予想される(図 17)。

SPH 量に減少がみられた一方、脂肪酸量には *ACER1* KO および *ASAHI* KO ケラチノサイトのいずれにおいても未分化、分化ともにコントロールとの間に差は認められなかった(図 18A, B)。細胞内において C16 の脂肪酸はサイトゾルに存在する脂肪酸合成酵素によって産生され、極長鎖脂肪酸は小胞体膜上に存在する脂肪酸伸長サイクルによって長鎖脂肪酸が伸長されることで産生される^{117,118)}。*ASAHI* KO ケラチノサイトでは未分化、分化時ともに極長鎖セラミドが増加していたものの(図 16)、遊離の極長鎖脂肪酸は減少していなかった(図 18A, B)。このことから、表皮における遊離の極長鎖脂肪酸の供給源としてセラミド分解経路の寄与は小さく、ほとんどは脂肪酸の合成/伸長経路から直に供給されていることが示唆された。

SLS の皮膚病態発症にはセラミド／長鎖塩基分解経路で生じる長鎖アルデヒド，特にトランス-2-ヘキサデセナールが関与すると考えられる。本研究により，表皮では長鎖アルデヒドの前駆体である長鎖塩基が ASAHI によるセラミド分解経路によって主に產生されていることが明らかとなった。このことから，ASAH1 の阻害によって長鎖塩基を減少させ，長鎖アルデヒドを減少させることが SLS の治療につながる可能性がある。

4. 材料と方法

4-1. マウス

Aldh3a2 KO マウスは当研究室で以前に作製したものを使用した^{91,92)}。*Aldh3b2* KO マウスは CRISPR/Cas9 システムを用いて以下の方法で作製した。ガイド RNA は *Aldh3b2* のエクソン 2 に存在する 24 塩基のプロトスペーサー隣接モチーフ配列 (PAM 配列) を標的とした。オリゴヌクレオチドペア (プライマー *Aldh3b2* KO-1, *Aldh3b2* KO-2; 表 1) をアニーリング後, CRISPR/Cas9 ベクターである pX330 ベクターの *BbsI* サイトにクローニングした。得られたプラスミドを C57BL/6J マウス受精卵にインジェクションした。産まれた仔マウスの尻尾からゲノム DNA を調製し, プライマー *Aldh3b2*-1 および *Aldh3b2*-2 (表 1) を用いて PCR を行い, *Aldh3b2* のエクソン 2 領域を増幅した。得られた DNA 断片のシーケンス解析を行った結果, エクソン 2 に 8 塩基が欠失していたマウスが得られた。このマウスを C57BL/6J マウスと交配させ, *Aldh3b2*^{+/-}マウスを調製した。得られた *Aldh3b2*^{+/-}マウス同士を交配して *Aldh3b2*^{-/-}マウスを作製後, *Aldh3a2*^{+/-}マウスと交配し, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-}マウスを得た。さらに, この *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{+/-}マウス同士の交配により, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{-/-}マウスを得た。*Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{-/-}マウスは *Aldh3b2*^{-/-}マウスとの交配で維持した。DKO マウスは, *Aldh3a2*^{+/-} *Aldh3b2*^{-/-}マウス同士の交配で得た。マウスのジェノタイピングは下記の方法で行った。マウス尻尾から調製したゲノム DNA とプライマーセット (*Aldh3a2*: プライマー *Aldh3a2*-1, *Aldh3a2*-2; *Aldh3b2*: プライマー *Aldh3b2*-1, *Aldh3b2*-2; 表 1) を用いた PCR によって DNA 断片を増幅後, *Aldh3a2* についてはアガロースゲル電気泳動により確認し, *Aldh3b2* については制限酵素 *MwoI* で処理をして判別した。*Aldh3b2* における 8 塩基欠失により, *MwoI* 認識配列が消失するため, *Aldh3b2*^{-/-}マウス由来の PCR 産物では *MwoI* による切断が生じないことを利用している。

マウスは室温 23±1°C, 湿度 50±5%, 明/暗サイクル 12 時間, 自由に通常食を食餌および給水可能な SPF 条件下で飼育した。本研究における動物実験は北海道大学動物実験委員会規定に従って行った。

4-2. 皮膚透過性バリアアッセイ

生後 0 日目のマウスの背中の経皮水分蒸散量を AS-VT100RS 蒸発計 (Asch Japan, Tokyo, Japan) を用いて測定した。トルイジンブルー染色は, マウスを 5 分メタノール

に浸した後、PBS で洗浄し、0.1% トリジンブルー溶液に浸して 40 時間 4 °C でインキュベートした後、PBS で洗浄し、観察した。

4-3. FALDH 活性測定

生後 0 日目のマウスから摘出した皮膚を 5 mg/ml ディスパーゼ溶液に 4 °C、一晩浸した後、表皮と真皮に分離した。得られた表皮を BufferA [50 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% グリセロール, 1 mM ジチオトレイトール, 1×プロテアーゼインヒビターカクテル (Complete, EDTA-free; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル] に懸濁したのち、ホモジェナイザーで破碎し、超音波破碎を行い、遠心 (200 ×g, 4 °C, 3 分) 後の上清をライセートとして回収した。調製したライセート 15 µg に、反応バッファー [50 mM Tris/HCl (pH8.5), 150 mM NaCl, 10% グリセロール, 0.1% TritonX-100, 500 µM NAD⁺] と基質となるアルデヒドを加え、37 °C で 30 分間インキュベートし、生成した NADH の蛍光 (励起光 360 nm, 蛍光 461.5 nm) を分光光度計 (日本分光株式会社 JASCO Corporation, 東京) を用いて検出し、定量を行った。

4-4. HE 染色

生後 0 日目のマウスの背中の皮膚を摘出し、10%ホルムアルデヒド/0.1 M カリウムリン酸バッファー (pH 7.4) に 4 °C で 48 時間浸して固定を行った。固定した皮膚をアルコール脱水したのち、キシレンで洗浄し、Tissue-Tek VIP-6 (Sakura, Torrance, USA) を用いてパラフィンを浸透させた。これを TEC-P-DC (Sakura) を用いてパラフィン包埋し、マイクロトーム REM-710 (Yamato Kohki, Asaka, Japan) を用いて厚さ 4 µm のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製した。Tissue-Tek DRS 2000 (Sakura) を用いて切片からパラフィンを除去したのち、ヘマトキシリンとエオジンによる染色を行った。染色した切片を、Leica DFC295 デジタルカラーカメラ付属光学顕微鏡 Leica DM5000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で観察、撮影した。

4-5. 透過型電子顕微鏡解析

生後 0 日目のマウスの背中の皮膚を摘出し、4%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド/0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に 4 °C で浸した後、1%タンニン酸溶液

[0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4)] に 4 °C で浸して前固定を行った。その後 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 回洗浄して、2%四酸化オスミウム溶液 [0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4)] に 4 °C で浸して後固定を行った。固定したサンプルを 50%, 70%, 90%, 100%エタノールに順次浸して脱水を行った。次に、酸化プロピレンに 1 時間、2 回浸した後に、酸化プロピレン : resin (7 : 3, v/v ; Quetol-812; Nisshin EM, 東京) 混合液に 1 時間浸した。さらに、一晩静置させることで酸化プロピレンを蒸散させ、新しい 100% resin に置換して 60 °C で 48 時間重合させた。ウルトラマイクロトーム (Ultracut UCT; Leica, Vienna, Austria) を用いて 80 nm の超薄切片を作製して、銅製のグリッドにのせ、2%酢酸ウラニル染色を室温で 15 分間行った。蒸留水で洗浄し、鉛染色溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) による二次染色を室温で 3 分間行った。調製したサンプルを透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL, 東京) を用いて観察し (加速電力 80 kV) , 撮影した。

4-6. 走査型電子顕微鏡解析

生後 0 日目のマウスの背中の皮膚を摘出し、エタノールによる脱水まで透過型電子顕微鏡解析と同様の操作で行った。脱水後、サンプルをエタノール : *tert*-ブチルアルコール (1:1, v/v) 混合液に室温で 2 時間浸したのち、100% *tert*-ブチルアルコールに室温で 1 時間、3 回浸して 4 °C で凍結し、減圧乾燥させた。オムミウム・プラズマコーター (NL-OPC80A; Nippon Laser & Electronics Laboratory, Nagoya, Japan) を用いてサンプルを 50 nm のオスミウム薄膜で覆い、走査型電子顕微鏡 (JSM-6340F; JEOL, 東京) を用いて観察し (加速電力 5.0 kV) , 撮影した。

4-7. マウス表皮の脂質抽出

生後 0 日目のマウスから摘出した皮膚を 5 mg/ml ディスパーゼ溶液に 4 °C, 一晩浸した後、表皮と真皮に分離した。表皮およそ 10 mg をジルコニアビーズ入りチューブに移し、450 μ L のクロロホルム:メタノール (1 : 2, v/v) を加え、Micro Smash MS-100R cell disrupter を用いて破碎した (4,500 rpm, 4 °C, 1 分)。遠心 (9,100 \times g, 4 °C, 1 分) 後、上清を回収し、150 μ L のクロロホルムと 300 μ L の水を順次加え、攪拌した。遠心 (9,100 \times g, 4 °C, 1 分) 後下層を回収し、溶媒を乾燥させた。乾燥させた脂質サンプルはクロロホルム/メタノール (1 : 2, v/v) で再溶解し、TLC 及び LC-MS/MS によって解析した。

4-8. テープストリッピング

生後 0 日目のマウスの背中にマスキングテープ 465#40（寺岡製作所，東京）を押し付け，角質層サンプルを回収した。新しいテープを用いてテープストリッピングを計 3 回，繰り返した。3 回のテープのうち，皮膚表面にあるほこりや汚れを同時に採取した可能性がある 1 回目のテープ以外のテープサンプルを実験に使用した。

4-9. テープからの脂質抽出

角質層を採取したテープを 5×10 mm のサイズで 2 枚切り取り，ガラスチューブおよびガラスチップを用い，テープに 800 μ L のメタノールを加えた。LC-MS/MS 解析の際の内部標準として，9 つの重水素 (d_9) 標識した各種セラミド [*N*-palmitoyl(d_9)-D-erythro-sphingosine (d_9 -C16:0 NS)，*N*-(2'-(*R*)-hydroxypalmitoyl(d_9)-D-erythro-sphingosine (d_9 -C16:0 AS)，*N*-(26-oleoyloxy(d_9) hexacosanoyl) D-erythro-sphingosine (d_9 -C26:0-18:1 EOS) ; Avanti Polar lipids, Alabaster, USA] を用い， d_9 -C16:0 NS を 10 pmol， d_9 -C16:0 AS を 4 pmol， d_9 -C26:0-18:1 EOS を 40 pmol 加えた。超音波破碎（室温，5 分）後，テープを除き，遠心（2600×g，室温，5 分）後，上清を回収し，乾燥させ，脂質サンプルを回収した。この際，チューブに残ったペレットは結合型セラミドの回収に用いた。ペレットに 800 μ L のメタノールを加えて懸濁し，半量ずつガラス試験管（結合型セラミド回収用）とプラスチックチューブ（タンパク質定量用）に分注した。ガラス試験管を遠心（2600×g，室温，3 分）し，上清を除き，再度メタノールを加えて洗浄した。この洗浄操作を計 3 回行ったのち，800 μ L の 95%メタノールを加え，60 °C で 2 時間インキュベートした。遠心（2600×g，室温，3 分）後，上清を除き，同様の操作を繰り返し，再度洗浄した。その後，結合型セラミドの内部標準として d_9 -C16:0 AS を 10 pmol 加えた 800 μ L の 95%メタノールを加え，60 °C で 2 時間インキュベートした。800 μ L の 1 M 酢酸水溶液を加え，二層分配したのち，下層を回収し，乾燥させ，脂質サンプルとした。

4-10. TLC による解析

表皮湿重量 2 mg 分の脂質サンプルを TLC に用い，以下の 3 種の展開溶媒を用いて分離した。

1. クロロホルム／メタノール／水（40 : 10 : 1, v/v）で底から 2 cm 上げた後乾燥し，再度底から 5 cm まで展開

2. クロロホルム／メタノール／酢酸 (47 : 2 : 0.5, v/v) でトップから 1.5 cm まで展開
 3. ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸 (65 : 35 : 1, v/v) でトップまで展開
- 展開した脂質は銅リン酸試薬 [3%硫酸銅 (w/v) 含有 8%リン酸 (v/v)] 試薬を噴霧した後、180 °C で 3 分間熱することで検出した。

4-11. LC-MS/MS による解析

抽出した脂質を LC 連結タンデム質量分析機 (Xevo TQ-S, Xevo TQ-S; Waters, Milford, USA) に表皮 5 µg 分インジェクションし、解析を行なった。脂肪酸および OAHFA は AMP+ MaxSpec Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) を用いて添付のプロトコルに従い、AMPP 誘導体化をして解析を行った。LC での分離には、逆相カラム (ACQUITY UPLC CSH C18 column; 粒子径 1.7 µm; 内径 2.1 mm; 長さ 100 mm; Waters) を使い、カラム温度を 55°C に設定した。分離に用いた移動相は A 液 [アセトニトリル／水 (3 : 2, v/v) 10 mM ギ酸アンモニウム] と B 液 [アセトニトリル／2-プロパノール (9 : 1, v/v) 10 mM ギ酸アンモニウム] を表 2 と 3 に示した比率で混合させた溶媒を用いた (流速 0.3 mL/min) 。LC で分離した脂質をエレクトロスプレーイオン化法によってイオン化させ、多重反応モニタリングによって検出した。イオン化および検出はポジティブイオンモードで行ない、表 4 から表 9 に記した設定値を用いて各脂質分子種を検出した。データの解析には MassLynx ソフトウェア (Waters) を使用した。マウスの表皮の脂質の定量は、外部標準を用いて検量線を作成することで行ない、NS の標準品として *N*-palmitoyl(*d*₉)-*D*-erythro-sphingosine (Avanti Polar lipids) , OS の標準品として *N*-ω-hydroxytriacontanoyl-*D*-erythro-sphingosine (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) , EOS の標準品として *N*-(30-Linoleoyloxy-triacontanoyl)-sphingosine (Cayman Chemical) , TG の標準品として 1,3-dipentadecanoyl-2-oleoyl(*d*₇)-glycerol (Avanti Polar Lipids) を使用した。角質層セラミドの定量は、NS および EOS はそれぞれ内部標準物質として添加した *d*₉-C16:0 NS および *d*₉-C26:0-18:1 EOS とのピーク面積比から算出した。ただし、OS の重水素標識体は市販されていないため、内部標準物質として添加した *d*₉-C16:0 AS を用いて OS を定量した。ケラチノサイトの脂質の定量は、セラミドと遊離脂肪酸は内部標準物質として添加した *d*₉-C16:0 NS (Avanti Polar Lipids) , *d*₃₁-Palmitic acid (Cayman Chemical) を用いて行い、SPH は外部標準を用いて検量線を作成することで行った。

4-12. 定量的リアルタイム RT-PCR

生後0日目のマウスから摘出した皮膚を600 μ LのPBS中で55 $^{\circ}$ C, 5分間インキュベートし, 表皮と真皮を分離した。マウス表皮総RNAはNucleoSpin RNA II Kit (Marchery-Nagal, Dueren, Germany) を用い, プロトコルに従い, 抽出した。定量的リアルタイム RT-PCRはOne-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara Bio, 滋賀) を用いて行った。表1に示すフォワード (-F) とリバース (-R) のプライマーを用いた。サーマルサイクラーはCFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) を用い, 50 $^{\circ}$ Cで30分, 94 $^{\circ}$ Cで2分のインキュベートののち, 94 $^{\circ}$ Cで30秒, 60 $^{\circ}$ Cで30秒, 72 $^{\circ}$ Cで1分を35サイクル行った。それぞれのmRNA量は*Gapdh* もしくは*Hprt1* との相対量として求めた。

4-13. ケラチノサイトの初代培養

生後0日目の新生マウスから回収した皮膚を, ケラチノサイトの増殖培地であるCnT-Prime, Epithelial Culture Medium (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland) に溶解した5 mg/mL ディスパーゼ溶液に浸し, 4 $^{\circ}$ Cで24時間処理したのち, 表皮と真皮に分離した。表皮を増殖培地で洗浄したのち, 500 μ LのTrypLE SelectTM (Thermo Fisher Scientific, Bern, Switzerland) によって室温で15分間処理した。トリプシン処理をした表皮の基底層側を培養ディッシュに擦り付けてケラチノサイトを分散させ, 増殖培地に回収したのち, 細胞懸濁液を遠心(400 \times g, 室温, 1分)して上清を除いた。ペレットを増殖培地で懸濁し, コラーゲンコートディッシュに播種した。培地交換は3日ごとに行った。ケラチノサイトの分化誘導はフルコンフルエントの直前まで増殖培地で培養したのち, 培地を分化培地であるCnT-Prime, 3D Barrier Culture Medium (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG) に置換することで行った。

4-14. [³H]DHS トレーサー解析

WT, *Aldh3a2* KO, *Aldh3b2* KO, DKO マウスから調製した未分化および分化誘導後の初代培養ケラチノサイトを35 mm ディッシュで培養後, 培地を新しい増殖培地1 mLに置換し, 37 $^{\circ}$ Cで1時間プレインキュベートした。その後, 0.1 μ Ciの[³H]DHS (American Radiolabeled Chemical, St. Louis, MO) を加えて, 37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。インキュベート後, 培地を除いてPBSで洗浄し, 200 μ L PBSを加え, スクレーパーを用いて細胞を回収した。細胞懸濁液に750 μ L クロロホルム/メタノール/塩酸(100:200:

1, v/v/v) , 250 μ L クロロホルム, 250 μ L 1% KCl を順に加えて二層分配し, 有機層を回収した。各サンプルを 2 つに分け, 一方をアルカリ処理した。アルカリ処理は, 0.5 M NaOH を含んだメタノール溶液 135 μ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートして行った。アルカリ処理後, 1 M 塩酸を含んだメタノール溶液 67.5 μ L を加えて中和した。アルカリ処理なしのサンプルでは, 0.5 M NaOH の代わりに水, 1 M 塩酸の代わりに 1 M NaCl を用いた。135 μ L メタノール, 210 μ L 1% KCl を順に加えて二層分配し, 有機層を回収, バキュームコンセンレーターで溶媒を留去した。乾燥させたサンプルを 20 μ L クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に懸濁し, HPTLC プレートにスポットした後, 1-ブタノール/酢酸/水 (3:1:1, v/v/v) で展開した。展開した HPTLC プレートに 2.8 mg/mL 2,5-ジフェニルオキサゾンのトルエン溶液を噴霧し, オートラジオグラフィーによって検出した。

4-15. プラスミドの作製

セラミダーゼ KO ケラチノサイトは, CRISPR/Cas9 システムを用いて以下の方法で作製した。CRISPR/Cas9 ベクターとして D10A 変異を持つ Nickase 改変型ベクター GeneArt CRISPR Nuclease Vector-OFP (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Nickase 改変型ベクターは一本鎖切断活性を持つため, ガイド RNA は *ASAH1*, *ACER1* の共にエキソン 3 内の近接した 2 箇所が存在する 2 つの PAM 配列をそれぞれ標的とし, 表 1 に示すプライマーセットを用い, 4-1 に記載の方法でプラスミドを作製した。

4-16. ヒト不死化ケラチノサイトの培養およびトランスフェクション

ヒト不死化ケラチノサイト NHEK/SVTERT3-5 (Evercyte, Vienna, Austraria) の培養, 分化誘導は 4-13 に記載の方法で行った。ケラチノサイトへのトランスフェクションは Keratinocyte Growth Medium-2 (Lonza, MO, USA) 培地中で Viafect Transfection Reagent (Promega) を用い, 添付のマニュアルに従って行った。

6. 表一覧

表 1. 本研究において使用したプライマー

Oligo DNA/primer	Sequence
Aldh3b2 KO-1	5'-CACCGAGCCTGGGTCGCTTCTTGC-3'
Aldh3b2 KO-2	5'-TTTGGCAAGAAGCGACCCAGGCTC-3'
Aldh3b2-1	5'-CGGACTCGGCCTACTGAGTTTCGGA-3'
Aldh3b2-2	5'-CAGTCTGTGCATAGAGCAAGGG-3'
Aldh3a1-F	5'-CGGTGATGCCATTGTGTGTGTTTCG-3'
Aldh3a1-R	5'-TTCTTCATTCCGCAGAGACCTCACC-3'
Aldh3a2-F	5'-TTCTCGTAACAATAAGCTCATCAAACG-3'
Aldh3a2-R	5'-CAGCATCCCCAGCCTTCCTTTGTTG-3'
Aldh3b1-F	5'-GCTGTATGCCTTCTCCAAGAGAAGC-3'
Aldh3b1-R	5'-GCAGCTGCAGCACCTCTCCTCCATGG-3'
Aldh3b2-F	5'-TGAGTTCATCAACCGGCGGGAGAAGC-3'
Aldh3b2-R	5'-GTTGTTGGTTCCAGGGACCATAAGG-3'
Aldh3b3-F	5'-CTTTATGCCTATTCCAACAACGCAG-3'
Aldh3b3-R	5'-GGGTGCAGCTCTCAGAGCCGATAGC-3'
Gapdh-F	5'-GAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCC-3'
Gapdh-R	5'-TGTCATAACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'
Cypf439-F	5'-AGCATCTACGGGACCCACCACAACC-3'
Cypf439-R	5'-TGAGGGTAGAGGCTCTACATTGAGC-3'
Fatp4-F	5'-AATGGCCTCAGCCATCTGTGAG-3'
Fatp4-R	5'-AGAGGGTCCAGGTGTTCTGTGC-3'
Cers3-F	5'-CTGGCTTCCTCCAACAATAAAGTGG-3'
Cers3-R	5'-TCAAGTTACACTTCTTTGCCAGTCC-3'
Pnpla1-F	5'-CCCCACAAGCCTCTGCTGGTGGAGG-3'
Pnpla1-R	5'-TGGCCACTCACTCCCTCGGGGTAGC-3'
Abhd5-F	5'-ATCACACCTTAAAGAAGCTGAAGAG-3'
Abhd5-R	5'-AATGGATTCCACAAACTGATTCTCC-3'
Krt1-F	5'-TGAGCTGAAGAACATGCAAGA-3'
Krt1-R	5'-CATGTAAGCTGAATCCACATCC-3'
Krt5-F	5'-CAGAGCTGAGGAACATGCAG-3'

Krt5-F	5'-CATTCTCAGCCGTGGTACG-3'
Lor-F	5'-GGTTGCAACGGAGACAACA-3'
Lor-R	5'-CATGAGAAAGTTAAGCCCATCG-3'
Ivl-F	5'-ACACACTGCCAGTGACTGTTCCAGC-3'
Ivl-R	5'-CTTCTCCAGATGCAGTTCCTGTTCC-3'
Hprt-F	5'-GCTGACCTGCTGGATTACATTAAG-3'
Hprt-R	5'-CTTAACCATTTTGGGGCTGACTGC-3'
ASAH1 KO-F1	5'-GGGTGGTAAGTCAAGATTTAGTTTT-3'
ASAH1 KO-F2	5'-GCATGAATTGATGCTTGACAGTTTT-3'
ASAH1 KO-R1	5'-TAAATCTTGACTTACCACCCCGGTG-3'
ASAH1 KO-R2	5'-TGTCAAGCATCAATTCATGCCGGTG-3'
ACER1 KO-F1	5'-TGCATCAGGAGCATCATCAGGTTTT-3'
ACER1 KO-F2	5'-CCGCTACATTTACGTTGTCTGTTTT-3'
ACER1 KO-R1	5'-CTGATGATGCTCCTGATGCACGGTG-3'
ACER1 KO-R2	5'-AGACAACGTAAATGTAGCGCGGTG-3'

表 2. LC-MS/MS 測定において使用したグラジエントシステムによる移動相の混合比の設定（セラミド，AMPP 誘導体化 OAHFA）

時間（分）	流速（mL/分）	移動相 A （%）	移動相 B （%）	グラジエント タイプ
Initial	0.3	60	40	
18.00	0.3	0	100	linear
23.00	0.3	0	100	linear
25.00	0.3	60	40	step

表 3. LC-MS/MS 測定において使用したグラジエントシステムによる移動相の混合比の設定（脂肪酸）

時間（分）	流速（mL/分）	移動相 A （%）	移動相 B （%）	グラジエント タイプ
Initial	0.3	90	10	
6.00	0.3	60	40	linear
15.00	0.3	30	70	linear
18.00	0.3	0	100	linear
23.00	0.3	0	100	linear
25.00	0.3	40	60	step

表 4. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (NS セラミド)

セラミド 分子種	プリカーサー イオン (Q1)		プロダクト イオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$		
d18:1/C16:0	520.5	538.6	264.3	20
d18:1/C18:0	548.6	566.6	264.3	20
d18:1/C20:0	576.6	594.6	264.3	20
d18:1/C22:0	604.6	622.6	264.3	25
d18:1/C24:1	630.6	648.6	264.3	30
d18:1/C24:0	632.6	650.6	264.3	30
d18:1/C26:1	658.7	676.7	264.3	30
d18:1/C26:0	660.7	678.7	264.3	30
d18:1/C28:1	686.7	704.7	264.3	30
d18:1/C28:0	688.7	706.7	264.3	30
d18:1/C30:1	714.7	732.7	264.3	35
d18:1/C30:0	716.7	734.7	264.3	35
d18:1/C32:1	742.8	760.8	264.3	35
d18:1/C32:0	744.8	762.8	264.3	40
d18:1/C34:1	770.8	788.8	264.3	40
d18:1/C34:0	772.8	790.8	264.3	40
d18:1/C36:1	798.8	816.8	264.3	40
d18:1/C36:0	800.8	818.8	264.3	40

表 5. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (OS セラミド)

セラミド 分子種	プリカーサー イオン (Q1)		プロダクト イオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$		
d18:1/ ω -OH C30:1	730.7	748.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C30:0	732.7	750.7	264.3	35

d18:1/ ω -OH C32:1	758.7	776.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C32:0	760.7	778.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C34:1	786.7	804.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C34:0	788.7	806.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C36:1	814.7	832.7	264.3	35
d18:1/ ω -OH C36:0	816.7	834.7	264.3	35

表 6. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (EOS アシルセラミド)

セラミド 分子種	プリカーサー イオン (Q1)		プロダクト イオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$		
d18:1/C30:1/C18:2	992.8	1010.8	264.3	40
d18:1/C30:0/C18:2	994.8	1012.8	264.3	40
d18:1/C32:1/C18:2	1020.8	1038.8	264.3	40
d18:1/C32:0/C18:2	1022.8	1040.8	264.3	40
d18:1/C34:1/C18:2	1048.8	1066.8	264.3	40
d18:1/C34:0/C18:2	1050.8	1068.8	264.3	40
d18:1/C36:1/C18:2	1076.8	1094.8	264.3	45
d18:1/C36:0/C18:2	1078.8	1096.8	264.3	45

表 7. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (TG)

TG 分子種	プリカーサー イオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
	$[M+NH_4]^+$		
C18:2-C32:1	846.7	549.5	20
C18:2-C32:0	848.7	551.5	20

C18:2-C34:3	870.7	573.5	20
C18:2-C34:2	872.7	575.5	20
C18:2-C34:1	874.7	577.5	20
C18:2-C34:0	876.7	579.5	20
C18:2-C36:4	896.7	599.5	20
C18:2-C36:3	898.7	601.5	20
C18:2-C36:2	900.7	603.5	20
C18:2-C36:1	902.7	605.5	20
C18:2-C36:0	904.7	607.5	20
C18:1-C34:0	878.7	579.5	20
C18:1-C36:1	904.7	605.5	20
C18:1-C36:0	906.7	607.5	20
C15:0-d ₇ -C18:1- C15:0	829.7	523.5	20

表 8. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (AMPP 誘導体化脂肪酸)

脂肪酸分子種	プリカーサーイ オン (Q1) [M+H] ⁺	プロダクトイオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
C16:1	421.6	239.0	48
C16:0	423.6	239.0	50
C18:2	447.6	239.0	44
C18:1	449.6	239.0	48
C18:0	451.6	239.0	50
C20:1	477.6	239.0	48
C20:0	479.6	239.0	50
C22:1	505.6	239.0	48
C22:0	507.6	239.0	50
C24:1	533.7	239.0	48
C24:0	535.7	239.0	50
C26:1	561.7	239.0	48
C26:0	563.7	239.0	50

C28:1	589.7	239.0	48
C28:0	591.7	239.0	50
C30:1	617.7	239.0	48
C30:0	619.7	239.0	50
C32:1	645.8	239.0	48
C32:0	647.8	239.0	50
C34:1	673.8	239.0	48
C34:0	675.8	239.0	50
C36:1	701.8	239.0	48
C36:0	703.8	239.0	50

表 9. MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比 (AMPP 誘導体化 OAHFA)

OAHA 分子種	プリカーサー イオン (Q1) [M+H] ⁺	プロダクト イオン (Q3)	コリジョン エネルギー (eV)
ω -OH C28:0/C18:2	869.7	589.2	60
ω -OH C28:1/C18:2	867.7	587.2	60
ω -OH C30:0/C18:2	897.7	617.2	60
ω -OH C30:1/C18:2	895.7	615.2	60
ω -OH C32:0/C18:2	925.7	645.3	60
ω -OH C32:1/C18:2	923.7	643.2	60
ω -OH C34:0/C18:2	953.8	673.3	60
ω -OH C34:1/C18:2	951.8	671.3	60
ω -OH C36:0/C18:2	981.8	701.3	60
ω -OH C36:1/C18:2	979.8	699.3	60

7. 参考文献

- 1) Brown S. J. and McLean W. H. (2012) One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol*, **132**, 751-762.
- 2) Candi E., Schmidt R., and Melino G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 328-340.
- 3) Bouwstra J. A. and Ponc M. (2006) The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 2080-2095.
- 4) Hirabayashi T., Murakami M., and Kihara A. (2019) The role of PNPLA1 in ω -O-acylceramide synthesis and skin barrier function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1864**, 869-879.
- 5) Feingold K. R. and Elias P. M. (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 280-294.
- 6) Kihara A. (2016) Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog Lipid Res*, **63**, 50-69.
- 7) Bouwstra J. A. and Honeywell-Nguyen P. L. (2002) Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*, **54 Suppl 1**, S41-55.
- 8) Lundborg M., Narangifard A., Wennberg C. L., Lindahl E., Daneshmandi B., *et al.* (2018) Human skin barrier structure and function analyzed by cryo-EM and molecular dynamics simulation. *J Struct Biol*, **203**, 149-161.
- 9) Maier H., Meixner M., Hartmann D., Sandhoff R., Wang-Eckhardt L., *et al.* (2011) Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *J Biol Chem*, **286**, 25922-25934.
- 10) Kawana M., Miyamoto M., Ohno Y., and Kihara A. (2020) Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J Lipid Res*, **61**, 884-895.
- 11) Oji V., Tadini G., Akiyama M., Blanchet Bardon C., Bodemer C., *et al.* (2010) Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J Am Acad Dermatol*, **63**, 607-641.
- 12) Aldahmesh M. A., Mohamed J. Y., Alkuraya H. S., Verma I. C., Puri R. D., *et al.* (2011) Recessive mutations in *ELOVL4* cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am J Hum Genet*, **89**, 745-750.

- 13) Klar J., Schweiger M., Zimmerman R., Zechner R., Li H., *et al.* (2009) Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. *Am J Hum Genet*, **85**, 248-253.
- 14) Kutkowska-Kazmierczak A., Rydzanicz M., Chlebowski A., Klosowska-Kosicka K., Mika A., *et al.* (2018) Dominant *ELOVL1* mutation causes neurological disorder with ichthyotic keratoderma, spasticity, hypomyelination and dysmorphic features. *J Med Genet*, **55**, 408-414.
- 15) Lefevre C., Jobard F., Caux F., Bouadjar B., Karaduman A., *et al.* (2001) Mutations in *CGI-58*, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet*, **69**, 1002-1012.
- 16) Miyamoto M., Itoh N., Sawai M., Sassa T., and Kihara A. (2020) Severe skin permeability barrier dysfunction in knockout mice deficient in a fatty acid ω -hydroxylase crucial to acylceramide production. *J Invest Dermatol*, **140**, 319-326 e314.
- 17) Li W., Sandhoff R., Kono M., Zerfas P., Hoffmann V., *et al.* (2007) Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in *ELOVL4* deficient mice. *Int J Biol Sci*, **3**, 120-128.
- 18) Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., *et al.* (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18439-18444.
- 19) Sassa T., Ohno Y., Suzuki S., Nomura T., Nishioka C., *et al.* (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovll*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol*, **33**, 2787-2796.
- 20) Ohno Y., Nakamichi S., Ohkuni A., Kamiyama N., Naoe A., *et al.* (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 7707-7712.
- 21) Mizutani Y., Mitsutake S., Tsuji K., Kihara A., and Igarashi Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, **91**, 784-790.
- 22) Yamamoto H., Hattori M., Chamulitrat W., Ohno Y., and Kihara A. (2020) Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene *FATP4* through formation of the barrier lipid ω -O-acylceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **117**, 2914-2922.
- 23) Hirabayashi T., Anjo T., Kaneko A., Senoo Y., Shibata A., *et al.* (2017) PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun*, **8**, 14609.

- 24) Kien B., Grond S., Haemmerle G., Lass A., Eichmann T. O., *et al.* (2018) ABHD5 stimulates PNPLA1-mediated ω -O-acylceramide biosynthesis essential for a functional skin permeability barrier. *J Lipid Res*, **59**, 2360-2367.
- 25) Ohno Y., Kamiyama N., Nakamichi S., and Kihara A. (2017) PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide. *Nat Commun*, **8**, 14610.
- 26) Ohno Y., Nara A., Nakamichi S., and Kihara A. (2018) Molecular mechanism of the ichthyosis pathology of Chanarin-Dorfman syndrome: Stimulation of PNPLA1-catalyzed ω -O-acylceramide production by ABHD5. *J Dermatol Sci*, **92**, 245-253.
- 27) Jennemann R., Rabionet M., Gorgas K., Epstein S., Dalpke A., *et al.* (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*, **21**, 586-608.
- 28) D'Angelo G., Polishchuk E., Di Tullio G., Santoro M., Di Campli A., *et al.* (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature*, **449**, 62-67.
- 29) Futerman A. H. and Pagano R. E. (1991) Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J*, **280 (Pt 2)**, 295-302.
- 30) Akiyama M. (2014) The roles of ABCA12 in epidermal lipid barrier formation and keratinocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 435-440.
- 31) Breiden B. and Sandhoff K. (2014) The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 441-452.
- 32) Uchida Y. and Holleran W. M. (2008) ω -O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J Dermatol Sci*, **51**, 77-87.
- 33) Zheng Y., Yin H., Boeglin W. E., Elias P. M., Crumrine D., *et al.* (2011) Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing ω -hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem*, **286**, 24046-24056.
- 34) Nemes Z., Marekov L. N., Fesus L., and Steinert P. M. (1999) A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain ω -hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8402-8407.
- 35) Takeichi T., Hirabayashi T., Miyasaka Y., Kawamoto A., Okuno Y., *et al.* (2020) SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J Clin Invest*, **130**, 890-903.
- 36) Akiyama M. (2011) Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses. *Nagoya J Med Sci*, **73**, 79-90.

- 37) Shigehara Y., Okuda S., Nemer G., Chedraoui A., Hayashi R., *et al.* (2016) Mutations in *SDR9C7* gene encoding an enzyme for vitamin A metabolism underlie autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mol Genet*, **25**, 4484-4493.
- 38) Sniegorska D., Kowalewski C., and Wertheim-Tysarowska K. (2016) [Epidermal barrier - molecular structure and disorders in selected ichthyoses]. *Postepy Biochem*, **62**, 36-45.
- 39) Cho K. H., Shim S. H., and Kim M. (2018) Clinical, biochemical, and genetic aspects of Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Genet*, **93**, 721-730.
- 40) Rizzo W. B. (2007) Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab*, **90**, 1-9.
- 41) Rizzo W. B. and Carney G. (2005) Sjögren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (*ALDH3A2*). *Hum Mutat*, **26**, 1-10.
- 42) Rizzo W. B. (2014) Fatty aldehyde and fatty alcohol metabolism: review and importance for epidermal structure and function. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 377-389.
- 43) Rizzo W. B. (2011) The role of fatty aldehyde dehydrogenase in epidermal structure and function. *Dermatoendocrinol*, **3**, 91-99.
- 44) Ito M., Oguro K., and Sato Y. (1991) Ultrastructural study of the skin in Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res*, **283**, 141-148.
- 45) Rizzo W. B., S'Aulis D., Jennings M. A., Crumrine D. A., Williams M. L., *et al.* (2010) Ichthyosis in Sjögren-Larsson syndrome reflects defective barrier function due to abnormal lamellar body structure and secretion. *Arch Dermatol Res*, **302**, 443-451.
- 46) Haug S. and Braun-Falco M. (2006) Restoration of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in Sjögren-Larsson syndrome. *Gene Ther*, **13**, 1021-1026.
- 47) Jagell S. and Liden S. (1982) Ichthyosis in the Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Genet*, **21**, 243-252.
- 48) Nakajima K., Sano S., Uchida Y., Akiyama M., Morita Y., *et al.* (2011) Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci*, **63**, 64-66.
- 49) Willemsen M. A., Van Der Graaf M., Van Der Knaap M. S., Heerschap A., Van Domburg P. H., *et al.* (2004) MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol*, **25**, 649-657.
- 50) Jackson B., Brocker C., Thompson D. C., Black W., Vasiliou K., *et al.* (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (*ALDH*) superfamily. *Hum Genomics*, **5**, 283-303.
- 51) Marchitti S. A., Brocker C., Stagos D., and Vasiliou V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **4**, 697-720.

- 52) Kitamura T., Takagi S., Naganuma T., and Kihara A. (2015) Mouse aldehyde dehydrogenase ALDH3B2 is localized to lipid droplets via two C-terminal tryptophan residues and lipid modification. *Biochem J*, **465**, 79-87.
- 53) Estey T., Piatigorsky J., Lassen N., and Vasiliou V. (2007) ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp Eye Res*, **84**, 3-12.
- 54) Pappa A., Estey T., Manzer R., Brown D., and Vasiliou V. (2003) Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J*, **376**, 615-623.
- 55) Lassen N., Bateman J. B., Estey T., Kuszak J. R., Nees D. W., *et al.* (2007) Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-)/Aldh1a1(-)* knock-out mice. *J Biol Chem*, **282**, 25668-25676.
- 56) Nees D. W., Wawrousek E. F., Robison W. G., Jr., and Piatigorsky J. (2002) Structurally normal corneas in aldehyde dehydrogenase 3a1-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **22**, 849-855.
- 57) Kelson T. L., Secor McVoy J. R., and Rizzo W. B. (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta*, **1335**, 99-110.
- 58) Keller M. A., Zander U., Fuchs J. E., Kreutz C., Watschinger K., *et al.* (2014) A gatekeeper helix determines the substrate specificity of Sjögren-Larsson Syndrome enzyme fatty aldehyde dehydrogenase. *Nat Commun*, **5**, 4439.
- 59) Nakahara K., Ohkuni A., Kitamura T., Abe K., Naganuma T., *et al.* (2012) The Sjögren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell*, **46**, 461-471.
- 60) Rizzo W. B., Heinz E., Simon M., and Craft D. A. (2000) Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta*, **1535**, 1-9.
- 61) van den Brink D. M., van Miert J. N., Dacremont G., Rontani J. F., Jansen G. A., *et al.* (2004) Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid. *Mol Genet Metab*, **82**, 33-37.
- 62) Verhoeven N. M., Jakobs C., Carney G., Somers M. P., Wanders R. J., *et al.* (1998) Involvement of microsomal fatty aldehyde dehydrogenase in the α -oxidation of phytanic acid. *FEBS Lett*, **429**, 225-228.
- 63) Willemsen M. A., Rotteveel J. J., de Jong J. G., Wanders R. J., L I. J., *et al.* (2001) Defective metabolism of leukotriene B4 in the Sjögren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci*, **183**, 61-67.

- 64) Ashibe B., Hirai T., Higashi K., Sekimizu K., and Motojima K. (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *J Biol Chem*, **282**, 20763-20773.
- 65) Marchitti S. A., Brocker C., Orlicky D. J., and Vasiliou V. (2010) Molecular characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **49**, 1432-1443.
- 66) Marchitti S. A., Orlicky D. J., Brocker C., and Vasiliou V. (2010) Aldehyde dehydrogenase 3B1 (ALDH3B1): immunohistochemical tissue distribution and cellular-specific localization in normal and cancerous human tissues. *J Histochem Cytochem*, **58**, 765-783.
- 67) Marchitti S. A., Orlicky D. J., and Vasiliou V. (2007) Expression and initial characterization of human ALDH3B1. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**, 792-798.
- 68) Kitamura T., Naganuma T., Abe K., Nakahara K., Ohno Y., *et al.* (2013) Substrate specificity, plasma membrane localization, and lipid modification of the aldehyde dehydrogenase ALDH3B1. *Biochim Biophys Acta*, **1831**, 1395-1401.
- 69) Kariya Y., Kihara A., Ikeda M., Kikuchi F., Nakamura S., *et al.* (2005) Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes Cells*, **10**, 605-615.
- 70) Kihara A., Anada Y., and Igarashi Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem*, **281**, 4532-4539.
- 71) Kihara A., Mitsutake S., Mizutani Y., and Igarashi Y. (2007) Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res*, **46**, 126-144.
- 72) Olivera A., Kohama T., Tu Z., Milstien S., and Spiegel S. (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **273**, 12576-12583.
- 73) Catala A. (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*, **157**, 1-11.
- 74) Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E. R., *et al.* (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2696-2701.

- 75) Wakashima T., Abe K., and Kihara A. (2014) Dual functions of the *trans*-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J Biol Chem*, **289**, 24736-24748.
- 76) Saba J. D. (2019) Fifty years of lyase and a moment of truth: sphingosine phosphate lyase from discovery to disease. *J Lipid Res*, **60**, 456-463.
- 77) Yu F. P. S., Amintas S., Levade T., and Medin J. A. (2018) Acid ceramidase deficiency: Farber disease and SMA-PME. *Orphanet J Rare Dis*, **13**, 121.
- 78) Mao C. and Obeid L. M. (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 424-434.
- 79) Parveen F., Bender D., Law S. H., Mishra V. K., Chen C. C., *et al.* (2019) Role of Ceramidases in Sphingolipid Metabolism and Human Diseases. *Cells*, **8**
- 80) Li C. M., Park J. H., He X., Levy B., Chen F., *et al.* (1999) The human acid ceramidase gene (*ASAH*): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics*, **62**, 223-231.
- 81) Bar J., Linke T., Ferlinz K., Neumann U., Schuchman E. H., *et al.* (2001) Molecular analysis of acid ceramidase deficiency in patients with Farber disease. *Hum Mutat*, **17**, 199-209.
- 82) Sugita M., Dulaney J. T., and Moser H. W. (1972) Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science*, **178**, 1100-1102.
- 83) Eliyahu E., Park J. H., Shtraizent N., He X., and Schuchman E. H. (2007) Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB J*, **21**, 1403-1409.
- 84) Kono M., Dreier J. L., Ellis J. M., Allende M. L., Kalkofen D. N., *et al.* (2006) Neutral ceramidase encoded by the *Asah2* gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J Biol Chem*, **281**, 7324-7331.
- 85) Sakamoto W., Coant N., Canals D., Obeid L. M., and Hannun Y. A. (2018) Functions of neutral ceramidase in the Golgi apparatus. *J Lipid Res*, **59**, 2116-2125.
- 86) Hu W., Xu R., Sun W., Szulc Z. M., Bielawski J., *et al.* (2010) Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem*, **285**, 7964-7976.
- 87) Mao C., Xu R., Szulc Z. M., Bielawska A., Galadari S. H., *et al.* (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem*, **276**, 26577-26588.
- 88) Sun W., Jin J., Xu R., Hu W., Szulc Z. M., *et al.* (2010) Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J Biol Chem*, **285**, 8995-9007.

- 89) Xu R., Jin J., Hu W., Sun W., Bielawski J., *et al.* (2006) Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J*, **20**, 1813-1825.
- 90) Liakath-Ali K., Vancollie V. E., Lelliott C. J., Speak A. O., Lafont D., *et al.* (2016) Alkaline ceramidase 1 is essential for mammalian skin homeostasis and regulating whole-body energy expenditure. *J Pathol*, **239**, 374-383.
- 91) Naganuma T., Takagi S., Kanetake T., Kitamura T., Hattori S., *et al.* (2016) Disruption of the Sjögren-Larsson syndrome gene *Aldh3a2* in mice increases keratinocyte growth and retards skin barrier recovery. *J Biol Chem*, **291**, 11676-11688.
- 92) Kanetake T., Sassa T., Nojiri K., Sawai M., Hattori S., *et al.* (2019) Neural symptoms in a gene knockout mouse model of Sjögren-Larsson syndrome are associated with a decrease in 2-hydroxygalactosylceramide. *FASEB J*, **33**, 928-941.
- 93) Hoshi M., Williams M., and Kishimoto Y. (1973) Characterization of brain cerebroside at early stages of development in the rat. *J Neurochem*, **21**, 709-712.
- 94) Alderson N. L., Rembiesa B. M., Walla M. D., Bielawska A., Bielawski J., *et al.* (2004) The human *FA2H* gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J Biol Chem*, **279**, 48562-48568.
- 95) Kruer M. C., Paisan-Ruiz C., Boddaert N., Yoon M. Y., Hama H., *et al.* (2010) Defective *FA2H* leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann Neurol*, **68**, 611-618.
- 96) Potter K. A., Kern M. J., Fullbright G., Bielawski J., Scherer S. S., *et al.* (2011) Central nervous system dysfunction in a mouse model of FA2H deficiency. *Glia*, **59**, 1009-1021.
- 97) Alderson N. L., Maldonado E. N., Kern M. J., Bhat N. R., and Hama H. (2006) FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *J Lipid Res*, **47**, 2772-2780.
- 98) Cao L., Huang X. J., Chen C. J., and Chen S. D. (2013) A rare family with Hereditary Spastic Paraplegia Type 35 due to novel *FA2H* mutations: a case report with literature review. *J Neurol Sci*, **329**, 1-5.
- 99) Edvardson S., Hama H., Shaag A., Gomori J. M., Berger I., *et al.* (2008) Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet*, **83**, 643-648.
- 100) Schumacher F., Neuber C., Finke H., Nieschalke K., Baesler J., *et al.* (2017) The sphingosine 1-phosphate breakdown product, (2E)-hexadecenal, forms protein adducts and glutathione conjugates in vitro. *J lipid research*, **58**, 1648-1660.

- 101) Honda Y., Kitamura T., Naganuma T., Abe T., Ohno Y., *et al.* (2018) Decreased skin barrier lipid acylceramide and differentiation-dependent gene expression in ichthyosis gene *Nipal4*-knockout mice. *J Invest Dermatol*, **138**, 741-749.
- 102) Hama H. (2010) Fatty acid 2-hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 405-414.
- 103) Eckhardt M., Yaghootfam A., Fewou S. N., Zoller I., and Gieselmann V. (2005) A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of α -hydroxylated galactosylceramide in myelin. *Biochem J*, **388**, 245-254.
- 104) Zhu G., Koszelak-Rosenblum M., Connelly S. M., Dumont M. E., and Malkowski M. G. (2015) The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *J Biol Chem*, **290**, 29820-29833.
- 105) Lass A., Zimmermann R., Haemmerle G., Riederer M., Schoiswohl G., *et al.* (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*, **3**, 309-319.
- 106) Yang A., Mottillo E. P., Mladenovic-Lucas L., Zhou L., and Granneman J. G. (2019) Dynamic interactions of ABHD5 with PNPLA3 regulate triacylglycerol metabolism in brown adipocytes. *Nat Metab*, **1**, 560-569.
- 107) Takeichi T. and Akiyama M. (2016) Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J Dermatol*, **43**, 242-251.
- 108) Lord C. C., Thomas G., and Brown J. M. (2013) Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1831**, 792-802.
- 109) Brown A. L. and Mark Brown J. (2017) Critical roles for α/β hydrolase domain 5 (ABHD5)/comparative gene identification-58 (CGI-58) at the lipid droplet interface and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1862**, 1233-1241.
- 110) Ikeda M., Kihara A., and Igarashi Y. (2004) Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 338-343.
- 111) Edagawa M., Sawai M., Ohno Y., and Kihara A. (2018) Widespread tissue distribution and synthetic pathway of polyunsaturated C24:2 sphingolipids in mammals. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1863**, 1441-1448.

- 112) Houben E., Holleran W. M., Yaginuma T., Mao C., Obeid L. M., *et al.* (2006) Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis. *J Lipid Res*, **47**, 1063-1070.
- 113) Sun W., Xu R., Hu W., Jin J., Crellin H. A., *et al.* (2008) Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **128**, 389-397.
- 114) Hanada K. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1632**, 16-30.
- 115) Kihara A. and Igarashi Y. (2004) FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **279**, 49243-49250.
- 116) Michel C., van Echten-Deckert G., Rother J., Sandhoff K., Wang E., *et al.* (1997) Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem*, **272**, 22432-22437.
- 117) Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem*, **152**, 387-395.
- 118) Sassa T. and Kihara A. (2014) Metabolism of very long-chain fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)*, **22**, 83-92.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 木原章雄教授に深く御礼申し上げます。木原章雄教授には器具、設備等充実した環境にて研究させて頂いたのみならず、実験手法や研究戦略、論理的思考力、そしてプレゼンテーションや論文執筆法など研究全般にわたり懇切丁寧な御指導を頂戴しましたこと、心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日々、有益な御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 佐々貴之准教授、同研究室 大野祐介助教に深く御礼申し上げます。大野祐介助教には、本論文の審査にも多く携わって頂きましたこと、併せて御礼申し上げます。

本論文を御精読、審査して頂き、有益なご助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 認知症先進予防・解析学（神経科学）講座 鈴木利治特任教授、並びに、同研究室 多留偉功准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、日頃より多くの議論を重ね、多くの有益な知識や示唆を頂きました、生化学研究室の皆様には深く感謝します。

最後に、これまで私を支え、励まし続けてくださいました家族と友人に心より感謝いたします。