

Saccharomyces cerevisiae deletion mutant의 세라마이드 생합성

김세경 · 노용호 · 윤현식*

인하대학교 생물공학과

Biosynthesis of ceramide by deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*

Se Kyung Kim, Yong Ho Noh, and Hyun Shik Yun*

Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yonghyundong Namku, Incheon 402-751, Korea

Abstract Ceramide is important not only for the maintenance of the barrier function of the skin but also for the water-binding capacity of the stratum corneum. Though the effectiveness of ceramide is not understood fully, ceramide has become a widely used ingredient in cosmetic and pharmaceutical industries. However, ceramide production from *Saccharomyces cerevisiae* has not been widely studied and the quantity are very low. Gene deletion in the cell is used frequently to investigate the function of gene and verification research of drug target. Specially, deletion mutant library is useful for a large amount functional analysis of gene. In this study, deletion mutants of genes on the metabolic pathway of ceramide synthesis in *S. cerevisiae* were grown in a batch culture and the cellular content of ceramide was measured. The ceramide content was highest in $\Delta ydc1$ mutant and 6 mg ceramide/g cell was obtained.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, deletion mutant, ceramide

서 론

인간 계놈의 염기서열 해독이 완성됨에 따라 생명공학자들은 분자생물학, 세포생물학, 유전학과 질병 관계를 연구하는데 보다 많은 관심을 가지게 되었다. 생물체는 유전자, 전사물질, 단백질, 생화학반응등이 복잡한 네트워크로 연결되어 대사작용을 통해 유지해 나가는 시스템으로 볼 수 있다. 따라서 생명체의 특성을 종합적으로 이해하기 위해서는 이 복잡한 네트워크의 구성원들에 대한 정보를 확보하고, 이를 효과적으로 연계하여 상호작용과 같은 특성을 분석하는 절차가 필수적으로 요구된다(1).

유전자의 생물학적 기능 분석을 위해서는 동물 모델이 가장 이상적이지만 동물모델의 제조 가능성, 시간, 비용 등 여러 측면에서 쉽지 않다. 따라서, *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces pombe, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* 등의 모델 세포 또는 모델 생물체를 활용한 미지의 유전자나 또는 목적 유전자의 생물학적 기능분석, pathway 규명, 질병기전과정의 연구가 가능하다(2, 3). 특히 *S. cerevisiae*와 *S. pombe*는 저렴한 비용으로 배양 가능하고 유전적 조작이 용이하며 생화학적, 생리적 기능의 분석 시스템이 잘 확립되어 있으며, 특정 유전자의 변이나 대량 발현, 또는 약물 처리에 의해 특이한 표현형을 나타내므로 빠른 시간에 유전자의 생물학적 기능 분석에 활용될 수 있는 장점이 있다(2, 3).

Sphingolipid에 대한 연구는 1874년 Johann Thudichum이 뇌추출물에서 미지의 지질로서 cerebroside, sphingomyelin을 발견한 때부터 시작된다(4). 처음에는 뇌, 중추신경계를 중심으로 조직에서의 구조해석과 sphingolipidosis라는 소위 지질축적증의 병태해명을 연구의 두 개의 축으로 하여 연구되어 왔다. 그 이후 약 100년간에 걸친 연구결과 생체 막의 구성성분으로서 세포를 구조적으로 유지하는 것과 생체 내에서의 영양소로서의 역할이 지질의 중요한 기능

*Corresponding author

Tel: +82-32-860-7517, Fax: +82-32-876-8751
e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

으로 생각되어 왔다. 이후 1986년에 sphingosine이 *in vitro*에서 protein kinase C (PKC)의 강력한 저해제임이 보고되었고(5), 이후 sphingolipid에 대한 인식이 단순히 세포막의 구성성분에서 생체기능을 조절하는 생체내 활성분자로 새롭게 바뀌었다. 지금은 ceramide와 sphingosine으로 대표되는 apoptosis 유도 및 세포사멸의 신호전달물질로서의 sphingolipid에 대한 연구와 sphingosine 1-phosphate와 sphingosylphosphorylcholine으로 대표되는 세포막 수용체를 가지는 세포간 신호전달물질에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다(6, 7).

세포 내에서의 유전자 deletion은 유전자 기능 및 drug target 검증 연구의 필수적인 접근 방법이다. 특히 deletion mutant library는 유전자의 대량 기능 분석, drug target 확인 및 검증 연구에 매우 유용하고 세포를 하나의 통합된 시스템으로 분석할 수 있는 좋은 수단이 될 수 있다(1). 본 연구에서는 sphingolipid를 생산하는 균주인 BY4742와 deletion mutant 9종류의 배양에서 각각의 균주에 따라 세라마이드의 생산에 미치는 영향을 알아보는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

효모 균주 및 배양 조건

Ceramide 생산에 사용된 균주는 sphingolipid의 deletion mutant로 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* 9 종류와 모균주인 BY4742이며 각각의 deletion된 gene은 *ydc1*, *ypc1*, *scs7*, *sur1*, *csg2*, *ipt1*, *lcb4*, *lcb5*, *dpl1*이다(Open Biosystems, U.S.A.).

Saccharomyces cerevisiae 배양을 위한 배지로는 YPD를 사용하였으며 배지의 조성은 glucose (Samchun pure chemical Co., Korea) 20 g/l, bacto pepton (BD, U.S.A.) 20 g/l, bacto yeast extract (BD, U.S.A.) 10 g/l 이다. 배양은 2 L 삼각 플라스크에 500 ml YPD 배지를 분주한 후 shaking incubator (Vision Co., Korea)를 이용하여 180 rpm, 30°C에서 배양하였다.

Lipids의 추출

배양이 끝난 균주는 원심분리기 Centrifuge 5403 (Eppendorf Co., Germany)을 사용하여 균체만 회수한 후 동결건조 (Bondiro Ilshin Lab. Co., Korea)하였다. 동결건조 된 균주 1 g에 용매 I (클로로포름 : 메탄올 = 1:2, v/v)과 glass bead 2 g을 넣고 강하게 vortexing 하여 균주를 파쇄하였다.

파쇄된 균주는 용매 II (클로로포름 : 메탄올 = 2:1, v/v) 100 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응한 용액은 filtering 하여 60°C에서 evaporation 시켰다. 이와 같은

과정을 4회 더 반복하였다(8). 이 과정은 샘플내에 있는 polar components와 non-lipid contaminants를 제거하기 위한 과정이다.

Ceramide의 분리 및 정제

추출된 total lipid에서 sphingolipid 부분을 얻기 위해 mild alkaline hydrolysis를 수행하였다(8). 클로로포름을 첨가한 샘플에 methanol carbon tetrachloride (5:1, v/v) 30 ml와 0.2 M methanolic NaOH 60 ml를 첨가한 후 한 시간동안 반응시켰다. 반응 후 중류수를 첨가하고 1 M acetic acid로 중화시켰다. 중화된 샘플은 4°C에서 12시간 동안 방치하여 충분리를 한 후 클로로포름충만 분리하였다.

HPLC를 이용한 세라마이드의 분석

분리된 ceramide는 클로로포름 : 메탄올 (2:1, v/v)로 10 ml를 맞춘 후 0.2 μm RC filter (Satorius, Germany)로 필터링하여 분석에 사용하였다. 사용된 HPLC는 Acme 9000 HPLC system (Younghlin Instrument, Korea)이며 data system은 Autochro 3000 (Younghlin Instrument, Korea), detection system은 ELSD Sedex 75 (Sedere, France)이다. ELSD 조건은 drift temperature 55°C, 분사 가스는 질소 3.5 bar이었다. 분석에 사용된 column은 Spherisorb® 5 mm Silica (Waters, U.S.A.)으로 그 규격은 4.6 x 250 mm이고 이동상은 1.0 ml/min의 클로로포름 : 메탄올 (96:4, v/v)이었다(9, 10).

Glucose 분석

배양액은 0.2 μm cellulose acetate filter (Satorius Co., Germany)로 filtering 하여 RI detector LC-10AD (Shimadzu, Japan)을 장착한 HPLC 10A system (Shimadzu, Japan)으로 분석하였다. Glucose 분석에 사용된 column은 Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)이며 0.5 M 황산을 0.5 ml/min의 유속으로 흘려주었다.

결과 및 고찰

지질은 세포내 신호전달체계로서의 기능을 하는 것으로 알려져 왔다. 세라마이드나 sphingosine-1-phosphate로 분류되는 sphingolipid는 칼슘 동원, 세포 성장, 세포자살 등을 조절하는 강력한 전달체이다. Sphingolipid의 전체 pathway는 Fig. 1(11)과 같다. 본 연구에서 사용된 균주는 각각 *ydc1*, *ypc1*, *scs7*, *sur1*, *csg2*, *ipt1*, *lcb4*, *lcb5*, *dpl1*이 deletion된 균주이며 control로는 BY4742를 사용하였다. 세라마이드 분석은 ceramide standard (Avanti U.S.A.)를 기준물질로 하여 ELSD를 장착한 HPLC로 측정하였

다(Fig. 2). 9종류의 deletion mutant의 세포내 세라마이드 양을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타난 것처럼 본 연구에 사용된 deletion mutant의 mother strain으로서 control 균주로 사용한 BY4742의 세라마이드 생산량은 3.81 mg ceramide/g cell로 이전 연구에서 사용했던 균주인 *S. cerevisiae* KCCM 50515보다는 많은 양을 나타내었다(12). 이는 세포내 세라마이드의 양이 *S. cerevisiae* 균주에 따라 차이가 있음을 나타낸다.

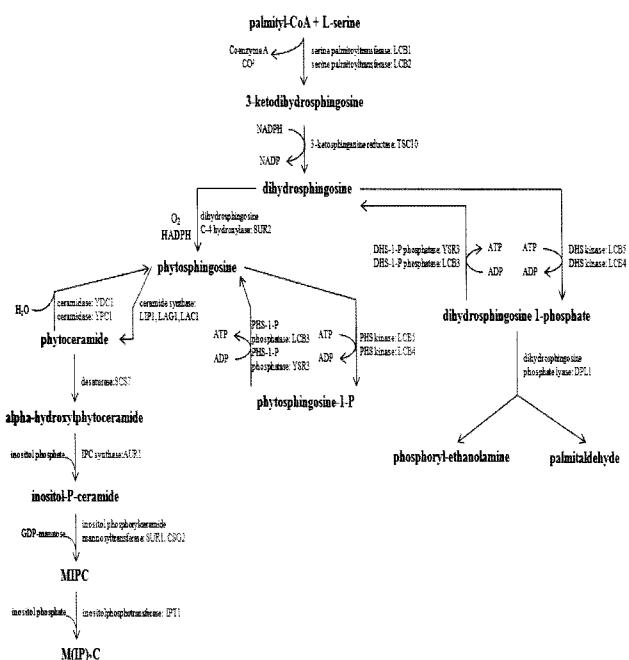


Fig. 1. Pathway of sphingolipid in *S. cerevisiae*(11).

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 *ydc1*과 *ypc1* gene은 phytoceramide에서 phytosphingosine으로 가는 생합성반응에 관련된 ceramidase의 유전자이다. 이 두 유전자가 deletion된 mutant는 정상적인 조건에서는 세포성장이나 증식에 영향을 미치지 않는다. *ydc1* gene의 deletion은 세포를 heat stress에 민감하게 하여, 세포내에서 YDC1p과 YPC1p이 각각 dihydroceramide와 phytoceramide를 기질로서 사용하게 된다. $\Delta ydc1$ mutant 균주의 세라마이드 생산량은 6 mg ceramide/g cell로 BY4742 보다 1.57배 많은 생산량을 나타내었으며, $\Delta ypc1$ mutant 균주의 세라마이드 생산량은 BY4742 보다 오히려 낮은 1.93 mg ceramide/g cell을 나타내었다. 이는 phytoceramide에서 phytosphingosine으로 가는 대사회로에서 *ydc1* gene이 *ypc1* gene 보다 더 많은 영향을 미친다는 다른 연구 결과들과 경향성이 일치한다(13, 14).

Inositol-P-ceramide에서 MIPC로 가는 생합성 반응에 작용하는 gene은 *sur1*과 *csg2*이다. 이 두 gene은 inositol phosphorylceramide mannosyltransferase를 생산하며 결손시 MIPC의 부족과 IPC가 축적되는 현상이 나타난다.

Stock 등(15)의 연구결과에서는 *sur1*과 *csg2* gene이 제거된 균주에서도 M(IP)₂C가 생산됨을 볼 수 있다고 하였는데 이는 M(IP)₂C 생산에서 이 두 gene의 과다한 기능 또는 M(IP)₂C 합성에 다른 경로가 존재가능성에 기인한다. $\Delta sur1$ mutant 균주의 세라마이드 생산량은 4.11 mg ceramide/g cell로 BY4742 균주보다 1.08배 많은 생산량을 나타내었고, $\Delta csg2$ mutant 균주의 세라마이드 생산량은 $\Delta ypc1$ mutant 균주의 경우와 비슷하게 BY4742의 세라마이드 양 보다 오히려 낮은 값을 나타내었다. 이 결과 역시 *sur1* gene이 *csg2* gene 보다 세라마이드 생합성 대사에서 더 중요한 역할을 하기 때문이라고 사료된다(16).

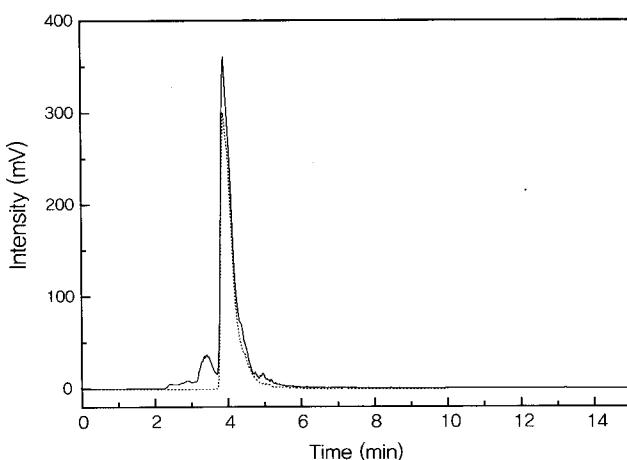


Fig. 2. HPLC chromatogram of ceramide.
(--- Ceramide standard, - Cell extract)

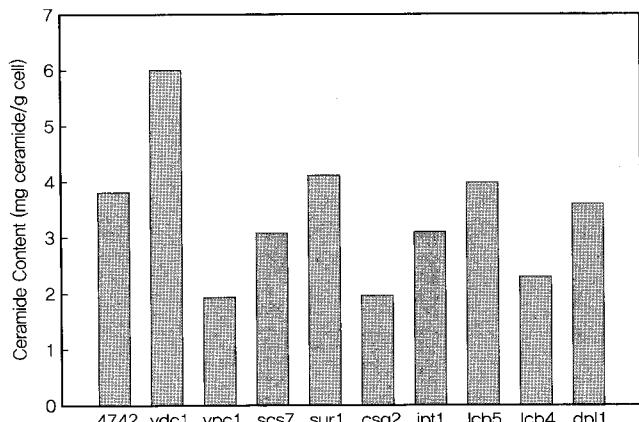


Fig. 3. Cellular ceramide content produced from deletion mutant.

Gene *lcb4*와 *lcb5*의 경우를 보면 phytosphingosine에서 phytosphingosine-1-P으로 가는 생화학반응과 dihydrosphingosine에서 dihydrosphingosine 1-phosphate로 가는 생화학반응에 관련되어 있는데 이 두 gene은 PHS kinase와 DHS kinase를 생산함으로써 결손시 PHS-1-P와 DHS-1-P의 감소를 보이게 된다. Nagiec 등(17)의 결과에 따르면 *lcb4* deletion mutant는 PHS-1-P와 DHS-1-P

의 생산량에 큰 영향을 미치지만 *lcb5* mutant는 그렇지 않다. 본 연구의 결과는 $\Delta lcb5$ mutant가 $\Delta lcb4$ mutant보다 1.76배 많은 세라마이드 생산량을 나타냄으로서 다른 연구들과는 다른 경향성을 보였다(17, 18).

Fig. 1에 나타난 바와 같이 *S. cerevisiae*의 세라마이드 생합성 과정은 복잡하다. Deletion mutant 만으로 세라마이드 생합성에 관련된 유전자의 영향을 보기는 한계가 있다. 세라마이드 생합성에 미치는 영향을 더 구체적으로 확인하기 위하여 deletion mutant를 숙주세포로 세라마이드 생합성에 관련된 대사회로 상의 유전자를 클로닝한 균주를 이용한 세라마이드 생합성에 대한 연구가 진행되고 있다.

요약

*Saccharomyces cerevisiae*의 deletion mutant를 이용하여 *ydc1*, *ypc1*, *scs7*, *sur1*, *csg2*, *ipt1*, *lcb4*, *lcb5*, *dpl1*의 deletion이 세라마이드의 생산에 미치는 영향을 고찰하였다. 세라마이드는 ELSD가 연결된 HPLC를 통하여 분석하였으며 $\Delta ydc1$ mutant의 세라마이드 생산량이 6 mg ceramide/g cell로 최대량을 나타내었으며 $\Delta sur1$ mutant, $\Delta lcb5$ mutant, $\Delta dpl1$ mutant의 경우 control로 사용한 BY4742와 비슷한 세라마이드 생산량을 나타내었고, 그 외 $\Delta ypc1$ mutant, $\Delta scs7$ mutant, $\Delta csg2$ mutant, $\Delta ipt1$ mutant, $\Delta lcb4$ mutant는 BY4742보다 낮은 세라마이드 생산량을 나타내었다.

감사

본 논문은 한국학술진흥재단의 지원 (KRF-2005-202-D00120)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 1월 6일, 게재승인 : 2009년 2월 23일

REFERENCES

- Lee, J. H. (2004), Systems Biotechnology, *Bioindustry* **38**, 10-15.
- Kim, D. U., M. S. Won, S. J. Choi, S. T. Pail, M. U. Nam, Y. S. Shin, L. L. Kim, Y. H. Hook, H. J. Lee, Y. J. Jang, K. S. Chung, D. S. Kim, K. W. Song, H. M. Park, K. H. Kim, H. B. Kim, H. S. Kang, H. O. Park, H. S. Yoo, and K. L. Loe (2006), Current progress of the genome-wide deletion project in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* and its application: functional genomics and HCS drug target screening, In *Bioscience, Promise for the future*, Y. K. Kwon, J. H. Park, and M. K. Lee Eds; Proc. Korean Society for biochemistry and Molecular biology 2006, Seoul, p173.
- Han, S. J., M. H. Lee, D. U. Kim, H. O. Park, K. L. Hoe, and D. S. Kim (2006), Bioinformatics for comparative genomics study of *S. pombe*, In *Bioscience, Promise for the future*, Y. K. Kwon, J. H. Park, and M. K. Lee Eds; Proc. Korean Society for biochemistry and Molecular biology 2006, Seoul, p173.
- Im, D. S. (2004), Sphingosine, Sphingosine kinase and Apoptosis, *Biochem. Mol. Biol. News* **24**(1), 38-72.
- Hannum, Y. A. and Bell R. M. (1987), Lysosphingolipid inhibit protein kinase C : implications for the sphingolipidoses. *Science* **235**(4789), 670-674.
- Cuvillier, O. (2002), Sphingosine in apoptosis signaling, *Biochim. Biophys. Acta* **1585**(2-3), 153-162.
- Lynch, K. R. and D. S. Im (1999), Life on the edg, *Trends pharmacol. Sci.* **20**(12), 473-475.
- Rupeic, J. and V. Maric (1998), Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast, *Chem. Phys. Lipids* **91**, 153-161.
- Hong, S. P., C. H. Lee, S. K. Kim, H. S. Yun, J. H. Lee, and K. H. Row (2004), Mobile phase compositions for ceramide III by normal phase high performance liquid chromatography, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 47-51.
- Thomas, J. M., E. C. Aida, R. B. Phyllis, and S. F. Anthony (1999), The separation and direction detection of ceramide and sphingoid bases by normal-phase high performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection, *Anal. Biochem.* **276**, 242-250.
- <http://pathway.yeastgenome.org/>.
- Kim, S. K., Y. H. Noh, and H. S. Yun (2008), The ceramide contents of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**(5), 449-451.
- Mao, C., R. Xu, A. Bielawska, and L. M. Obeid (2000), Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biologic. Chem.* **275**(10), 6876-6884.
- Mao, C., R. Xu, A. Bielawska, Z. M. Szulc, and L. M. Obeid (2000), Cloning and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Alkaline Ceramidase with Specificity for Dihydroceramide, *J. Biologic. Chem.* **275**(40), 31369-31378.
- Stock, S. D., H. Hama, J. A. Radding, D. A. Young, and J. Y. Takemoto (2000), Syringomycin E Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* : Requirement of Biosynthesis of Sphingolipids with Very-Long-Chain Fatty Acids and Mannose- and Phosphoinositol-Containing Head Groups, *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1174-1180.

16. Beeler, T. J., D. Fu, J. Rivera, E. Monaghan, K. Bagle, and T. M. Dunn (1997), *SUR1 (CSGI/BCL21)*, a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca²⁺ concentrations at 37°C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide, *Mol. Gen. Genet.* **255**, 570-579.
17. Nagiec, M. M., M. Skrzypek, E. E. Nagiec, R. L. Lester, and R. C. Dickson (1998), The *LCB4 (YOR171c)* and *LCB5 (YLR260w)* genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases, *J. Biol. Chem.* **273**(31), 17437-19442.
18. Funato, K., R. Lombardi, B. Vallee, and H. Riezman (2003), Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **278**(9), 7325-7334.