

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780193

研究課題名（和文） 魚類における環境ストレスに伴う新規アポトーシスの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of environmental stress-induced apoptosis in fish

研究代表者

藪 健史（YABU TAKESHI）

日本大学・生物資源科学部・ポストドクトラルフェロー

研究者番号：00551756

研究成果の概要（和文）：中性スフィンゴミエリナーゼ1は、環境ストレスに伴うアポトーシスに関与する。その細胞内シグナル伝達機構を調べるため、ストレス応答性MAPK(SAPK/JNK)システムへの関与について調べた。熱ストレスを曝露すると、本プロテインキナーゼは、細胞死へと誘導するシグナル伝達経路を始動した。リコンビナントJNK1タンパク質を使ったin vitroキナーゼアッセイの結果、nSMase1のセリン残基（S-270）にリン酸化が生じた。熱ストレス条件下は、内因性のJNKキナーゼ活性の上昇に伴って、nSMase1活性が急速に増大した。一方、変異型JNK1ドミナントネガティブを過剰発現させた細胞では、熱ストレスによるリン酸化が抑制された。

以上の結果から、熱ストレス誘導性のアポトーシスは、JNKによってnSMase1へのリン酸化が引き金となって、nSMase1が活性化する機構が推定される。

研究成果の概要（英文）：The neutral sphingomyelinase 1 (nSMase1) is involved in environmental stress-induced apoptosis in fish. To reveal the molecular mechanism, we examined the involvement of the stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) system. Upon heat shock treatment, the protein kinase initiated a signal transduction pathway leading to cell death (apoptosis). Using recombinant JNK1 protein, we found that phosphorylation of nSMase1 occurred at serine-270. Treatment with heat shock rapidly enhanced the nSMase1-directed kinase activity of endogenous JNK. On the other hand, the mutant of JNK1 dominant negative was much less sensitive to heat shock. Our results strongly suggest that phosphorylation of nSMase1 in heat-shock-induced apoptosis is executed by JNK.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

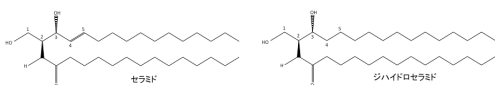
研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：脂質生化学，酵素，ストレス，アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

熱，紫外線， $\gamma$ 線などの環境ストレスを伴う細胞死（アポトーシス）研究は，哺乳類の培養細胞をモデルとして行われてきた。環境ストレスによって誘発されるアポトーシスは，スフィンゴ脂質セラミド(図 1)が細胞内で一過的に生成され，それがセカンドメッセンジャーとして作用して生じる。



**(図 1)セラミドとそのアナログであるジ  
ハイドロセラミドの化学構造**

このセラミドによって誘発されるアポトーシスの分子機構は，真核生物において保存されており，環境ストレスに伴うアポトーシスの主要な経路である。申請者は，ゼブラフィッシュの培養細胞を用い，世界で初めて環境ストレスによって誘発されるアポトーシスに關与するマグネシウム依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ 1 (nSMase1) 遺伝子が環境ストレスによって誘発されるアポトーシスに關与することを証明した。本遺伝子が，環境ストレスによって誘発されるアポトーシスにおいて主要な分子であることから，環境ストレスに伴うアポトーシスの新しい分子機構を明らかにすることが可能である。nSMase1 は，熱ストレス誘導条件下においては遺伝子の転写・翻訳調節により制御されておらず，一過的に酵素の活性が増加する。すなわち，遺伝子の翻訳後の化学修飾が nSMase1 の活性化に關わることが推定される。予備試験として，本酵素の活性化時の化学修飾を調べた結果，リン酸化が生じていた。これらの結果から，新規なキナーゼによりリン酸化修飾が本酵素で生じ，本酵素の立体構造

が変化して nSMase1 が活性化すると考えられる。

この仮説を証明するため，本研究では，リン酸化 nSMase1 の酵素学的性質の解明および nSMase1 に対して特異的なキナーゼの存在を明らかにし，**環境ストレスによる nSMase1 の活性化に伴う新規分子機構を解明する。**

## 2. 研究の目的

中性型スフィンゴミエリナーゼ 1 (nSMase1) は，膜脂質スフィンゴミエリンを加水分解し，セラミドを生成するフォスホリパーゼ C である。これまでの申請者の研究から，熱，紫外線， $\gamma$ 線などの環境ストレスによって nSMase1 が活性化し，細胞内でセラミドを生成させて細胞死（アポトーシス）が生じることを明らかにした。しかしながら，ストレス条件下で本酵素が活性化するメカニズムは不明である。本研究では，「環境ストレスに伴う nSMase1 の活性化機構」を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) nSMase1 に対して特異的なキナーゼの同定

リン酸化 nSMase1 を免疫沈降法により粗精製することができることから，リン酸化 nSMase1 と新規キナーゼが会合した化学形態（複合体）で，共沈する可能性がある。それらの共沈殿物を SDS-PAGE で分離後，質量分析やウエスタンブロット解析によって JNK キナーゼを特定した。また，nSMase1 のリン酸化には，JNK キナーゼが關わることが推定されることから，シグナル伝達経路が予測できた。

### (2) リン酸化に伴う nSMase1 の活性化

#### ① in vitro における nSMase1 の活性化

nSMase1 の活性化を調べるため、特定したリン酸化部位を変異させたリコンビナントを作製し、JNK 1 キナーゼと野生型リコンビナントあるいは変異型リコンビナントを用いて、リン酸化反応試験を行った。その結果、試験において、JNK キナーゼが野生型リコンビナントだけを基質した。また、nSMase1 活性は、野生型リコンビナント試験区においてのみ増加した。

#### ② *in vivo*における nSMase1 の活性化

細胞における nSMase1 の活性化を調べるため、リン酸化部位を変異させた発現ベクターを作製し、発現ベクターを ZE 細胞へ導入し変異型 nSMase1 を過剰発現させた。熱ストレスによって応答するリン酸化部位であった。野生型と変異型を比較して、ウエスタンブロット解析によって確認し、これらの過剰発現株の nSMase 活性を測定した結果、リン酸化と酵素活性が正の相関であった。また、JNK キナーゼのドミナントネガティブ変異体を細胞内に発現された結果、ドミナントネガティブ変異体の発現に依存して nSMase1 の活性が抑制された。

#### (3) リン酸化 nSMase1 に対する抗体作製

JNK による nSMase1 のリン酸化部位をアミノ酸配列から推定した結果、ゼブラフィッシュ、ヒトおよびマウス由来の酵素に共通するセリン残基 (S-270) であることが予想された。そこで、リン酸化 nSMase1 を特異的に認識する抗体を作製した。

抗体の有用性を明らかにするため、ZE 細胞に熱を暴露した後、ウエスタンブロット解析によってリン酸化 nSMase1 を調べた。

#### 4. 研究成果

ストレス誘導性アポトーシスには、中性スフィンゴミエリナーゼ 1 (nSMase1) が関与している。熱ストレス条件下で nSMase1 が活性

化するメカニズムとして、ストレス誘導性リン酸化シグナルである JNK キナーゼによる nSMase1 のリン酸化を見いだした。

nSMase1 活性は、ストレス条件下で一過的に増大することから、細胞内シグナル伝達機構を調べるため、ゼブラフィッシュ培養細胞へ JNK 阻害剤 SP600125 を投与したのち、熱ストレスを曝露すると抑制された。*in vitro* JNK アッセイの結果、JNK 活性に依存して nSMase1 のリン酸化が生じ、nSMase1 活性が増大した。JNK の二量体形成に関わるリジン残基 (K-55) をアルギニンに置換したドミナントネガティブ変異型を過剰発現させた細胞では、酵素活性およびセラミド含量は正常細胞と比べて低かった。JNK による nSMase1 のリン酸化部位をアミノ酸配列から推定した結果、ゼブラフィッシュ、ヒトおよびマウス由来の酵素に共通するセリン残基 (S-270) であることが予想された。そこで、nSMase1 のリン酸化ポリペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。本抗体は、JNK によるリン酸化 nSMase1 をウエスタンブロットおよび免疫沈降法によって検出することが可能であった。ストレス下における nSMase1 のリン酸化と酵素活性化との関係を調べた結果、熱ストレスに伴ってリン酸化酵素が増加し、酵素活性およびセラミド量が増大した。一方、リン酸化部位を欠失した変異型 nSMase1 を過剰発現させた細胞では、熱ストレスによるリン酸化が抑制され、酵素活性およびセラミド量が低下し、ドミナントネガティブ作用を示した。

以上の結果から、ストレス誘導性のセラミド生成およびアポトーシスには、JNK の活性化によって nSMase1 へリン酸化が引き金となつて、nSMase1 が活性化する機構が明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計14件)

- 1) M. Yamashita, Y. Yamashita, T. Suzuki, Y. Kani, N. Mizusawa, S. Imamura, K. Takemoto, T. Hara, Md. A. Hossain, T. Yabu, K. Touhata. Selenoneine, a Novel Selenium-Containing Compound, Mediates Detoxification Mechanisms against Methylmercury Accumulation and Toxicity in Zebrafish Embryo. *Mar. Biotechnol.*, in press 査読有り
- 2) J. Iguchi, Y. Yamashita, K. Touhata, T. Yabu, M. Yamashita. Origin identification method by multiple trace elemental analysis of intermuscular bones in grilled eel products produced in Japan, China, and Taiwan. *Fish. Sci.*, in press 査読有り
- 3) M. Ohkubo, T. Yabu, M. Yamashita, A. Shimizu. Molecular cloning of two gonadotropin receptors in mummichog *Fundulus heteroclitus* and their gene expression during follicular development and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 184 75-86 (2013) 査読有り
- 4) T. Yabu, S. Imamura, N. Mizusawa, K. Touhata, M. Yamashita. Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Mar. Biotechnol.*, 14(4), 491-501(2012) 査読有り
- 5) S. Imamura, T. Yabu, M. Yamashita. Protective Role of Cdc48 against Neurodegeneration via Ubiquitin-Proteasome System Dysfunction during Zebrafish Development. *J. Biol. Chem.*, 287(27), 23047-23056 (2012) 査読有り
- 6) Y. Yamashita, T. Yabu, K. Touhata, M. Yamashita. Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish. Sci.*, 78, 407-413 (2012) 査読有り
- 7) T. Yabu, H. Toda, Y. Shibasaki, M. Yamashita, H. Anzai, N. Mano, Y. Masuhiro, S. Hanazawa, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi. Antiviral protection mechanism mediated by Ginbuna crucian carp interferon gamma isoforms 1 and 2 through

- two distinct interferon-gamma-receptors. *J. Biochem.*, 150(6), 635-648 (2011) 査読有り
- 8) Y. Yamashita, H. Amlund, T. Suzuki, T. Hara, M. A. Hossain, T. Yabu, K. Touhata, M. Yamashita. Selenoneine, total selenium and total mercury content in fish muscle. *Fish. Sci.*, 77(4) 679-689 (2011) 査読有り
  - 9) H. Toda, T. Yabu, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi. Evaluating antigen-specific cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells in fish by granzyme B-like activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141(1-2), 168-172 (2011)
  - 10) T. Yabu, S. Imamura, M. S. Mohammed, K. Touhata, T. Minami, M. Terayama, M. Yamashita. Differential gene expression of HSC70/HSP70 in yellowtail cells in response to chaperone-mediated autophagy. *FEBS J.*, 278(4), 673-685 (2011) 査読有り
  - 11) H. Toda, Y. Saito, T. Koike, F. Takizawa, K. Araki, T. Yabu, T. Somamoto, H. Suetake, Y. Suzuki, M. Ototake, T. Moritomo, T. Nakanishi. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(6), 650-660 (2011) 査読有り
  - 12) T. Yamaguchi, F. Katakura, S. Shitanda, Y. Niida, H. Toda, M. Ohtani, T. Yabu, H. Suetake, T. Moritomo, T. Nakanishi. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells *in vitro*. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(2), 193-202 (2011) 査読有り
  - 13) M. Yamashita, T. Yabu, N. Ojima. Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioSci. Monogr.*, 3(4), 111-141 (2010) 査読有り
  - 14) Discovery of the strong antioxidant selenoneine in tuna and selenium redox metabolism. Y. Yamashita, T. Yabu, M. Yamashita. *World J. Biol. Chem.*, 1(5), 144-150 (2010) 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

- 1) JNK のリン酸化による中性スフィンゴミエリナーゼ1の活性化 Activation of Neutral

Sphingomyelinase 1 by JNK kinase-mediated  
Phosphorylation

藪健史, 司馬肇, 柴崎康宏, 中西照幸, 今村  
伸太朗, 山下倫明

日本生化学会

2012年12月14日～2012年12月16日

マリンメッセ福岡

〔図書〕(計1件)

1) Heat induced apoptotic cell death  
mechanism mediated by sphingomyelinase  
and ceramide signaling in zebrafish  
development. Nova Science Publishers, Inc.  
T. Yabu, S. Imamura, M. Yamashita: Heat  
Stress: Causes, Treatment and Prevention.  
(2011) pp215-234

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: リン酸化中性スフィンゴリエリナーゼ  
1, 抗リン酸化中性スフィンゴリエリナーゼ  
1抗体, 中性スフィンゴリエリナーゼ1変異  
体, 及びそれらの用途。

発明者: 山下倫明, 今村伸太朗, 藪健史, 東  
畑顕, 石原賢司

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-272595

出願年月日: 2012年12月13日出願

国内外の別: 日本国

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藪 健史 (YABU TAKESHI)

日本大学・生物資源科学部・ポストドクトラ  
ルフェロー

研究者番号: 00551756

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: