

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870705

研究課題名(和文)細胞死制御機構におけるミトコンドリア局在型SMaseの生理的機能に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of physiological role of mitochondrial sphingomyelinase in the regulation of cell death

研究代表者

熊谷 剛 (KUMAGAI, Takeshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30365184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体エネルギーを産生するなど生物にとって重要なオルガネラであるミトコンドリアに局在する新規のスフィンゴミエリナーゼ(mitSMase)が、どのような分子特性および生理作用を持っているのかについて研究を行った。その結果、(1)mitSMaseはミトコンドリア二重膜の外膜に局在する中性SMaseであること、(2)mitSMaseは抗がん剤であるエトポシドによるアポトーシス誘導を抑制すること、(3)mitSMaseは障害を受けたミトコンドリアを、オートファジーにより除去することで細胞死を抑制すること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial sphingomyelinase (mitSMase) is novel SMase that catalyzes hydrolysis of sphingomyelin to ceramide and phosphocholine. Although it was known that the ceramide generation in mitochondria was observed in various cell death processes, it was little known about the physiological role of ceramide and the generating enzymes. In this study, we investigated the possibility that mitSMase was the ceramide producing enzyme in mitochondria and the role of mitSMase in cell death. As a result, we have demonstrated that mitSMase is localized in outer membrane of mitochondria and its C terminal region that contain enzymatic domain is faced to cytoplasm. Furthermore, we have cleared that mitSMase suppresses etoposide-induced apoptosis by depleting injured mitochondria via mitophagy.

研究分野：生化学

キーワード：スフィンゴミエリナーゼ セラミド アポトーシス ミトコンドリア スフィンゴ脂質

1. 研究開始当初の背景

セラミドは、細胞の分化・増殖、細胞死の誘導など様々な生体応答に関わっていることが報告されている重要なスフィンゴ脂質である。セラミドの生成経路は、主に三つの経路が知られているが、この中でもリン脂質であるスフィンゴミエリンの加水分解によってセラミドが生成される経路は、様々な細胞応答でのセラミド生成に関与することが報告されている。このスフィンゴミエリンの加水分解によるセラミドの生成を触媒する酵素が、スフィンゴミエリナーゼ(SMase)である。

一方、ミトコンドリアは、生体が生命を維持するために必要不可欠な生体エネルギーであるATPの生産を司る最も主要なオルガネラである。またその他にも細胞死の形態のひとつであるアポトーシス制御において中心的な役割を果たすなど、様々な生理現象に密接に関わっている。これまで、ミトコンドリアとセラミドとの関わりについてはいくつかの研究が行なわれており、ミトコンドリアにおけるセラミド生成が、細胞死を誘導する制御因子として重要な役割を有することが推測されているが、生成に関わる分子の同定には至っていなかった。

そのような背景のなか、2010年にミトコンドリアに局在するSMase(mitochondria-associated neutral SMase; MA-nSMase)遺伝子が単離された(J.Biol.Chem., 285, 17993-18002, 2010)。同時期に我々のグループもマウスにおいてミトコンドリアに局在するSMase(mitSMase)遺伝子の単離に成功しており、この遺伝子はMA-nSMaseと同一であった。先述したようにミトコンドリアにおけるセラミドの生成は、細胞死制御と密接に関わっていることが予想されていたが、mitSMaseはその生成を担っている分子である可能性のあるにも関わらず、ほとんど解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで解析がされていないmitSMaseについて、ミトコンドリアの機能、特に細胞死の制御機構との関連を明らかにして、mitSMaseが、ミトコンドリアに対してどのような役割を果たしているのかを実証することを研究目的として、

(1) mitSMaseは、どのような酵素的特性を持つのか？

(2) mitSMaseは、ミトコンドリアを介した細胞死誘導において、どのような生理的意義を持つのか？

を明らかにするために、主に培養細胞株を実験材料として、生化学的・分子生物学手法により解析を行った。

3. 研究の方法

実験には、マウス繊維芽細胞由来細胞L929株を用いた。また内在性mitSMaseの酵素的性状解析にはマウス精巣組織を用いた。細胞死に対する影響の解析には、ミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導することが報告されているエトポシド、TNF、ミトコンドリア非特異的に細胞死を誘導することが知られている過酸化水素、ジエチルマレイン酸(DEM)を用いた。

(1) mitSMaseの酵素的特性の解析

mitSMaseを組み込んだ発現ベクターをL929細胞に導入して細胞内での局在を免疫染色法により解析した。ミトコンドリアにおけるmitSMaseの局在様式の解析および酵素的解析には、mitSMaseの発現が顕著に高いマウス精巣から単離したミトコンドリア画分を用いた。

(2) mitSMaseの細胞死に対する影響の解析

細胞死に対する解析には、mitSMase発現ベクターをL929細胞に安定的に導入したmitSMase過剰発現細胞株および、マウスmitSMase mRNAを標的とするshRNAを発現するベクターをL929細胞に導入して作成したmitSMaseノックダウン細胞株を構築して解析に用いた。細胞死の評価は、MTTアッセイ、DNAの断片化の観察、カスパーゼ3および9の活性化の検出、シトクロームcのミトコンドリアからの放出により評価した。オートファジーの検出には抗LC3抗体を用いた免疫染色およびイムノプロット法により検討した。

4. 研究成果

(1) mitSMaseの酵素的特性の解析

mitSMaseは細胞内においてミトコンドリアおよび小胞体-ミトコンドリア会合部(MAM)に局在していることが知られているが、組織における発現や酵素的特性、ミトコンドリア内におけるさらに詳細な局在については不明であった。そこで最初にマウス各組織におけるmitSMaseの発現量を確認した。その結果、mitSMaseは精巣において顕著に高く発現していた(図1A)。次にmitSMaseの最適pHを検討するため、mitSMaseの発現が高いマウス精巣より単離したミトコンドリアを用いて、種々のpHの反応液中におけるSMase活性を測定した。なお、マウス精巣ではmitSMaseが主要なSMaseであることを確認している。その結果、pH7.0において最も活性が高くなったためmitSMaseは中性領域に最適pHを持つ中性SMaseであることが明らかとなった(図1B)。

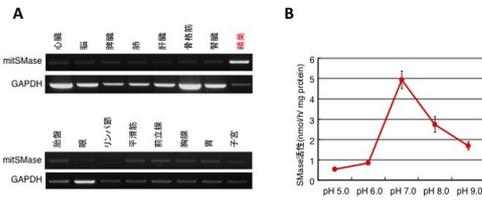


図1 mitSMaseの組織における発現および各pHにおける酵素活性

次にmitSMaseのミトコンドリアにおける詳細な局在について解析を行った。mitSMaseはN末端側に一回膜貫通領域、C末端側に酵素活性ドメインを有する。mitSMaseは図2Aに示すようにミトコンドリア二重膜外膜に局在する(A)(B)と、二重膜内膜に局在する(C)(D)の可能性が考えられる。そこでプロテアーゼKとスウェリングバッファー、TritonX-100を用いたアッセイを行い、mitSMaseがどのパターンで存在しているのかを検討した。このアッセイでは、プロテアーゼK処理のみではミトコンドリア二重膜外膜に局在しているタンパク質のみが消化され、スウェリングバッファーを加えることで外膜および膜間スペースのタンパク質が、さらにTritonX-100処理でマトリックス中のタンパク質が消化されることを利用する方法である。マウス精巣から単離したミトコンドリアを用いて解析した結果、mitSMaseのバンドはプロテアーゼK処理のみで消失した(図2B)。これは外膜に局在していることが報告されているVDACと同じ挙動であったことから、mitSMaseはミトコンドリア二重膜の外膜に局在していることが明らかとなった[図2Aの(A)(B)いずれかのパターン]。

次に、さらに(A)(B)のいずれのパターンかを決定するため、mitSMaseのC末端にV5タグを融合させた発現ベクター(図2C)を構築しL929細胞に導入して発現させ、同様のアッセイを行った。その結果、抗V5抗体を用いたウエスタンブロットにおいてプロテアーゼK処理のみでバンドの消失が認められたことから、mitSMaseはN末端を膜間スペースに、C末端を細胞質側に配置した(A)の形でミトコンドリアに局在していることが明らかとなった(図2D)。

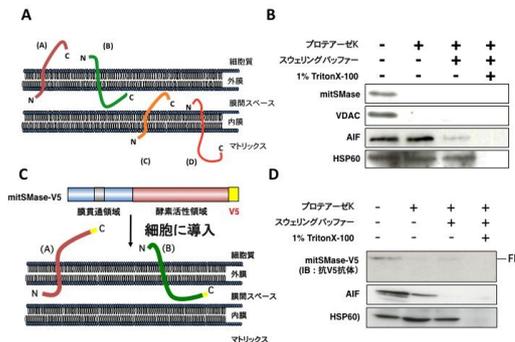


図2 mitSMaseのミトコンドリアにおける局在の解析

(2) mitSMaseの細胞死に対する影響の解析

mitSMaseが細胞死に対してどのような影響を有しているのかを明らかにするため、これまでにミトコンドリアを介して細胞死を誘導することが知られているエトポシド処理による細胞死に対する影響を検討した。mitSMase過剰発現細胞株およびshRNA発現ベクターを用いたノックダウン細胞株を構築しMTTアッセイにより解析を行ったところ、エトポシドによる濃度依存的な細胞死誘導はmitSMase過剰発現細胞で抑制され、逆にmitSMaseノックダウン細胞で亢進した(図3A)。さらにアポトーシスの指標であるDNAの断片化についても同様の結果となったことからmitSMaseはエトポシド処理によるアポトーシス誘導を抑制していることが示唆された(図3B,C)。これはこれまでのSMaseが細胞死誘導に関わるという知見とは異なる発見である。

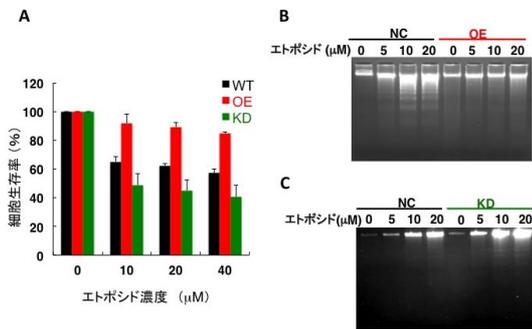


図3 エトポシドによる細胞死誘導におけるmitSMaseの影響

mitSMaseによる細胞死抑制が、エトポシド処理による細胞死に特異的なのかを検討するため、その他の細胞死誘導刺激に対する影響を検討した。非ミトコンドリア経路で細胞死を誘導することが報告されている過酸化水素およびDEMによる細胞死は、mitSMase過剰発現細胞では抑制されなかった(図4A,B)。一方、エトポシド同様にミトコンドリア経路で細胞死を誘導するTNF-による細胞死はmitSMase過剰発現により抑制された。このことからmitSMaseは、ミトコンドリアを介した細胞死誘導を特異的に抑制していることが示された。

さらに、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導経路においてミトコンドリアより下流で認められるシトクロムcの放出およびカスパーゼ3,9の活性化について検討したところ、ともにmitSMase過剰発現細胞において抑制された(図5)。一方、ミトコンドリアより上流に位置するp53の活性化およびBaxの発現量には影響を与えなかった。このことより、mitSMaseは確かにミトコンドリアにおいてアポトーシス抑制の機能を果た

していることが明らかとなった。

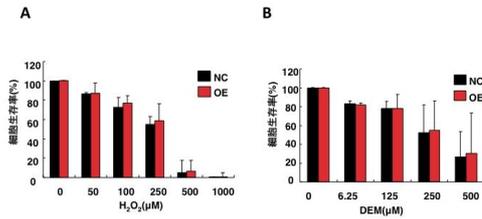


図4 ミトコンドリア非特異的な細胞死誘導に対するmitSMase過剰発現の影響

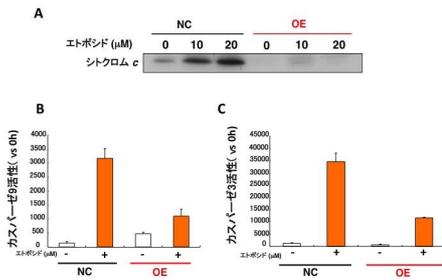


図5 mitSMase過剰発現細胞におけるアポトーシス経路の抑制

そこで、次に mitSMase による細胞死抑制機構の解析を行った。オートファジーは、飢餓時やストレス時に細胞内のオルガネラや細胞質を膜で囲み内部を分解して再利用する自食機構であり、様々な疾病との関連も指摘されている。我々はセラミドがオートファジーを誘導するという知見に注目して、mitSMase によるミトコンドリアにおけるセラミド生成が、障害を受けたミトコンドリアを標的としたオートファジー（マイトファジー）を誘導し、ダメージを軽減して細胞死を抑制するのではないかと仮説をたて検証を行った。オートファジー誘導時には LC3 の 1 型から 2 型への変換および細胞内での LC3 陽性顆粒の形成が亢進する。エトポシドによるオートファジーの誘導に対する mitSMase の影響を検討したところ、mitSMase 過剰発現細胞では LC3 の 2 型への変換および LC3 陽性顆粒の形成が対照細胞と比較して亢進された（図 6）。一方 mitSMase ノックダウン細胞では逆に抑制された（図 7）。この結果より、mitSMase はオートファジー誘導に対して抑制的に機能することが示された。

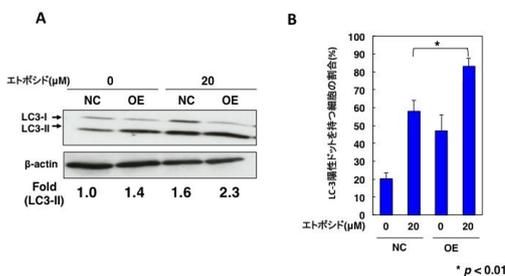


図6 mitSMase過剰発現細胞におけるオートファジー誘導の亢進

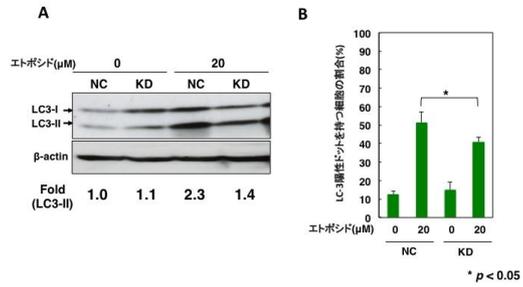


図7 mitSMaseノックダウン細胞におけるオートファジー誘導の減少

次に mitSMase によるオートファジーの制御が、ミトコンドリア障害の除去に関わっているのかについて検討した。エトポシド処理では障害を受けたミトコンドリアを介して活性酸素種(ROS)の生成が亢進することが知られている。まずエトポシド処理による ROS の生成に対するオートファジーの影響をフローサイトメトリーにより解析したところ、オートファジーを誘導するラパマイシン処理により ROS の生成は抑制されたことから、オートファジーは ROS の生成を軽減する作用があることが示された。そこで mitSMase 過剰発現細胞およびノックダウン細胞における ROS の生成を検討した。その結果エトポシド処理による ROS の生成は過剰発現細胞では抑制され、逆にノックダウン細胞では亢進した（図 8）。このことから、mitSMase はミトコンドリアからの ROS の生成を、オートファジーを誘導することで制御していることが明らかとなった。

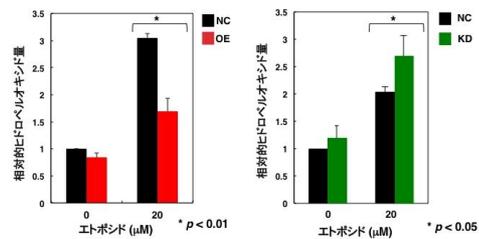


図8 細胞内ヒドロペルオキシド生成に対するmitSMaseの影響

さらに mitSMase が障害を受けたミトコンドリアの除去に機能していることを実証するために、ミトコンドリアにおける酸化修飾タンパク質の蓄積に対する mitSMase の影響を検討した。mitSMase ノックダウン細胞および対照細胞よりミトコンドリアを単離して酸化修飾のひとつであるカルボニル化されたタンパク質の量を解析した。その結果、エトポシド処理によるカルボニル化タンパク質の増加は、ノックダウン細胞において対照細胞と比較して有意に亢進していた（図 9）。このことから、mitSMase は実際に障害を受

けたミトコンドリアの除去に機能していることが明らかとなった。

以上の結果より、mitSMase はミトコンドリア二重膜の外膜に酵素活性部位を細胞質側に配位して存在している中性 SMase であり、これまでの予想と反してミトコンドリアを介したアポトーシス誘導に対して抑制的な機能を有することが明らかとなった。また、抑制機構については、障害を受けたミトコンドリアをセラミドの生成を介したオートファジー（マイトファジー）を誘導することで除去しストレスを軽減することが示された。SMase の基質となる SM は、ミトコンドリアにおいて外膜の細胞質側に多く分布していることが報告されていることから、mitSMase は、外膜の細胞質側でセラミド生成を行っていることが予想される。また最近、セラミドが LC3 との相互作用を有することが報告されており、mitSMase がセラミドの生成を介してミトコンドリアへの LC3 の結合を促進してマイトファジーを誘導している可能性が考えられる。本研究の成果において我々は、mitSMase が障害を受けたミトコンドリアをマイトファジー誘導により積極的に除去して細胞死を制御している新たな分子であることを明らかにした。今後さらに詳細に解明することにより、ミトコンドリアの障害が関与する神経変性疾患やミトコンドリア病における mitSMase を新たな標的とした創薬の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

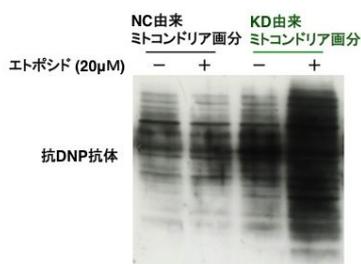


図9 mitSMaseノックダウン細胞におけるミトコンドリアの酸化障害の蓄積

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 7 件)

熊谷剛、西村奈緒恵、安部望美、遠山恵莉、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア障害による細胞死誘導における mitSMase の機能の解析 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.17、京都市、国立京都国際会館

熊谷剛、西村奈緒恵、安部望美、遠山恵莉、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア障害による細胞死誘導における mitSMase の機能の解析 フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー 2014.9.20、つくば市、つくば国際会議場

熊谷剛、西村奈緒恵、秦遥子、遠山恵莉、安部望美、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア型スフィンゴミエリナーゼはミトコンドリア障害による細胞死誘導を抑制する 第 67 回日本酸化ストレス学会 学術集会 2014.9.4、京都市、同志社大学良心館

熊谷剛、貞重卓哉、西村奈緒恵、秦遥子、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア型スフィンゴミエリナーゼによる細胞死抑制機構の解析 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28、熊本市、熊本市総合体育館

熊谷剛、田中咲弥、成松優芙子、橋本望、貞重卓哉、西村奈緒恵、秦遥子、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア型スフィンゴミエリナーゼによる細胞死抑制機構におけるオートファジーの役割 フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー 2013.9.14、福岡市、九州大学医学部 百年講堂

熊谷剛、田中咲弥、成松優芙子、橋本望、貞重卓哉、西村奈緒恵、秦遥子、中川靖一、今井浩孝 ミトコンドリア型スフィンゴミエリナーゼによるオートファジー誘導は酸化ストレスを制御することで細胞死を抑制する 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会 2013.6.13、名古屋市、ウインク愛知

熊谷剛、成松優芙子、田中咲弥、橋本望、中川靖一 mitSMase によるミトコンドリアを介した細胞死の抑制機構の解析 日本薬学会第 133 年会 2013.3.28、横浜市、パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/eisei/eisei/Top_page.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 剛 (KUMAGAI Takeshi)
北里大学・薬学部・講師
研究者番号：30365184

