

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07946

研究課題名(和文)核に局在するセラミドによるアポトーシス誘導メカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of stress induced-ceramide generation and apoptosis in nuclear

研究代表者

藪 健史 (YABU, Takeshi)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：00551756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セラミドは、熱や紫外線、化学物質等のストレス、インターフェロン、Fasリガンドなどの炎症性サイトカインの刺激に反応して生成され、神経系、血管系、免疫系の形成および性の分化におけるアポトーシスに関与する。本研究は、アポトーシス誘導時におけるスフィンゴミエリナーゼ群によるセラミド生成機構を明らかにしてきたが、セラミドが核崩壊や遺伝子転写調節を誘発する機序は依然不明である。そこで、本研究では、スフィンゴミエリナーゼを活性化し、膜脂質スフィンゴミエリンを加水分解して、核崩壊を誘導するスフィンゴミエリナーゼを特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定したスフィンゴミエリン加水分解酵素(nSMase)は、ストレス応答のバイオマーカーとして利用できるだけでなく、魚類における感染、飢餓等の生理的ストレスの影響評価に活用できる。ゼブラフィッシュやほ乳類だけでなく、ブリ、クロマグロ等の養殖魚でもゲノム解析による遺伝子データが利用可能であるので、nSMaseの進化的起源の解析や養殖魚のゲノム育種技術、臨床医学など発展に幅広く寄与する。疫学研究によって、白血病、肺ガン、大腸ガンなどの細胞・組織ではセラミド含量の低下と発症が関与することと知られていることから、がんの予防・治療薬の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Neutral sphingomyelinase (nSMase) activation in response to environmental stress or inflammatory cytokine stimuli generates the second messenger ceramide, which mediates the stress-induced nuclear apoptosis. However, the signaling pathways and activation mechanism underlying this process have yet to be elucidated. In nSMase-overexpressing cells, nSMase colocalized with a nuclear marker in a cytochemical analysis. Activation of the enzyme by UV stress induced ceramide generation, caspase-3 activation, and apoptotic cell death in nuclear. Thus, neutral nSMase participates in an inducible ceramide-mediating, proapoptotic signaling pathway that operates in UV-induced nuclear apoptosis in nuclear.

研究分野：脂質生化学 水産化学

キーワード：セラミド 核 アポトーシス スフィンゴミエリナーゼ 水産化学 脂質生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱ショック, 紫外線, 放射線, 過酸化水素などのストレスや TNF や Fas リガンドなどの炎症性サイトカインによって誘発されるアポトーシスでは, 細胞内でセラミド量が一過的に増加するとともに, セラミドがアポトーシスの誘導シグナル, つまりセカンドメッセンジャーとなり, カスパーゼカスケードを活性化してアポトーシスが実行される (Obeid et al, *Science* 1990, (259), 1769-1771; Verheij et al, *Nature* 1996, (380), 75-79)。

代表者らは, ゼブラフィッシュやヒラメの初期胚を用いて, 世界に先駆けて, ストレス誘導性アポトーシスを観察するバイオアッセイの手法を確立し, 中性スフィンゴミエリナーゼ 1 およびカスパーゼ 3 が活性化して, アポトーシスが誘導される分子機序を *in vivo* で解析した。最近, 環境ストレスによって活性化した JNK キナーゼによって nSMase1 がリン酸化され, 活性化する新規な分子機構を突き止めた。科研費採択課題では, アポトーシス誘導機構におけるセラミドの直接的なターゲット分子は特定した。Fas の刺激やストレス条件下では, ゴルジ体に局在する nSMase1 が JNK キナーゼによって活性化し, ゴルジ体に局在するスフィンゴミエリンを加水分解し細胞質でセラミドが生成される。その結果, 生成されたセラミドとセラミド結合性分子とが会合し複合体を形成して, その複合体がミトコンドリアへ輸送され, ミトコンドリアの外膜に結合することによってミトコンドリア膜の脂質二重層の剛性が微弱となる。ミトコンドリア電位が低下してチトクローム C の遊離を誘発する。遊離されたチトクローム C は, 細胞質でアポトソームを形成しカスパーゼカスケードを活性化してアポトーシスに至る分子機序が推定された。しかしながら, アポトーシス誘導時におけるスフィンゴミエリナーゼ群によるセラミド生成機構を明らかにしてきたが核膜の崩壊におけるセラミドの役割や遺伝子発現転写調節を誘導する機構は依然不明である。

そこで, 本研究では, ストレス状態下で, 細胞内小器官核におけるスフィンゴミエリナーゼを活性化し, 核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核に局在するスフィンゴミエリナーゼを特定する。

2. 研究の目的

セラミドは, 熱や紫外線, 化学物質等のストレス, インターフェロン, Fas リガンドなどの炎症性サイトカインの刺激に应答して生成され, 神経系, 血管系, 免疫系の形成および性の分化におけるアポトーシスに関与する。代表者らは, アポトーシス誘導時におけるスフィンゴミエリナーゼ群によるセラミド生成機構を明らかにしてきたが, セラミドが核崩壊や遺伝子転写調節を誘発する機序は依然不明である。そこで, 本研究では, スフィンゴミエリナーゼを活性化し, 膜脂質スフィンゴミエリンを加水分解して, 核崩壊を誘導するスフィンゴミエリナーゼを特定する。本酵素が, 核膜に構成するスフィンゴミエリンを加水分解することによって, 膜の剛性を弱めて核膜の崩壊を誘導し, 細胞運命を決定することを, バイオアッセイによって解析する。

3. 研究の方法

(1) 核画分におけるセラミド含量の測定

細胞内のセラミド含量は, サイトカイン刺激やストレス条件下で一過的に増大し, アポトーシスを誘導することから, 細胞内セラミド結合タンパク質を調べるため, まず, ゼブラフィッシュ ZE 細胞へ紫外線を照射したのち核のセラミド含量を DGK アッセイにより調べた。

(2) 核に分布するスフィンゴミエリナーゼの特定

核に局在する中性スフィンゴミエリナーゼ(nSMase)を同定するため、抗体の作製方法として実績があるリコンビナントタンパク質を作製した。それを抗原としてウサギに免疫して、抗血清から IgG を精製後、nSMase に対する特異抗体を作製した。nSMase 群は、ゼブラフィッシュゲノム DNA データベースでは、nSMase1, nSMase2, nSMase3, nSMase4 および nSMase5 の 5 種類が存在した。nSMase 群の特定にあたり、至適 pH や基質特異性が共通であるため、酵素活性だけでは判定することは難しい。また、ほ乳類用として開発された nSMase 群に対する標準品抗体は、魚類の nSMase 群と交差反応する抗体は存在しない。そこで、特異抗体により評価や核画分を調整して分画に発現する nSMase を調べる手法が最も有効であると考えられた。そこで、リコンビナントタンパク質を抗原として nSMase5 に対する特異抗体を作製した。作製した抗体を用いて、免疫蛍光染色やウエスタンブロット解析により核に局在する nSMase 5 を特定した。

(3) ユビキチン・プロテアソーム経路の解析

nSMase5 をヒト培養細胞や魚類培養細胞内で発現させると、ウエスタンブロット解析では推定される分子量とほぼ同じサイズとして検出される。しかしながら、プロテアソームインヒビター MG132 で細胞内プロテアソームを阻害すると、発現させた nSMase タンパク質は、陽極側へ移動しラダー状で超高分子ポリペプチドとして検出された(図 1)。このことから、nSMase5 には、すくなくともユビキチン化が生じることが推定された。nSMase5 とユビキチンとを共に細胞内で強制発現させ、ユビキチン化 nSMase の存在を免疫沈降法とウエスタンブロット法によって調べた。

4. 研究成果

スフィンゴ脂質セラミドは、サイトカイン刺激および環境ストレスに伴うアポトーシスのセカンドメッセンジャーとして位置づけられている。しかしながら、細胞内の核に局在するセラミドがアポトーシスを誘導する機序は依然不明である。そこで、本研究では、細胞内の核にセラミドを生成する酵素 nSMase5 に注目し、UV ストレス条件下で活性化する nSMase5 を特定した。リコンビナント nSMase5 タンパク質を使ったエンザイムアッセイの結果、基質スフィンゴミエリンに対して nSMase5 の K_m 値は、5.1nM であった。また、本分子は核に局在し、核膜のセラミド生成に調節し、核膜の崩壊を誘発することを見出した。

核のセラミド含量は、サイトカイン刺激やストレス条件下で一過的に増大し、アポトーシスを誘導することから、核のセラミド量を調べるため、ZE 細胞へ紫外線を照射したのち、核のセラミド含量を DGK アッセイにより調べた。その結果、細胞へ刺激後、3 時間で核のセラミド量がピークに達することが明らかになった(図 2)。

nSMase5 のアポトーシス誘導能を調べるため、nSMase5 の野生型と活性中心を欠如した変異型の発現ベクター DNA を ZE 細胞へ導入しアポトーシス誘導能を調べた結果、野生型は、アポトーシスを著しく誘導した。一方、活性中心を欠如した変異型は、アポトーシス誘導が抑制された。

以上の結果から、nSMase5 の役割は、核膜で一過的にセラミド生成が生じ、核崩壊を伴うアポトーシスを誘導する機構が推定された。

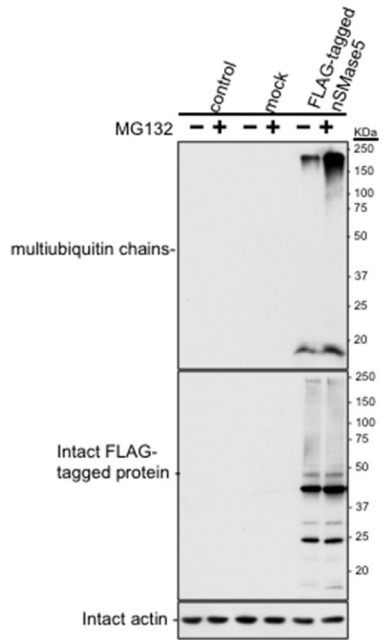


Figure 1 Accumulation of nSMase 5 protein with multiubiquitin chains by treatment of proteasome inhibitor, MG132.

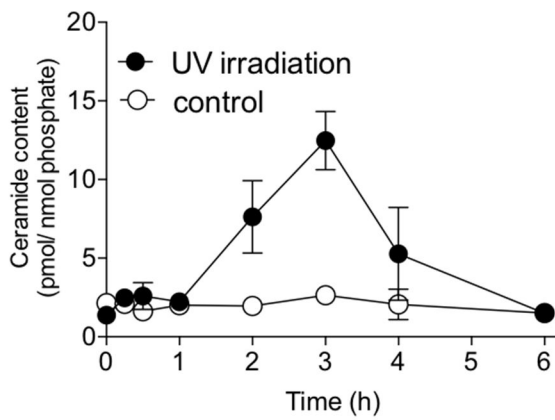


Figure 2 Ceramide contents in nuclear of ZE cells.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryuichiro Miyazawa, Norifumi Murata, Yuta Matsuura, Yasuhiro Shibasaki, Takeshi Yabu, and Teruyuki Nakanishi	4. 巻 9
2. 論文標題 Peculiar Expression of CD3-Epsilon in Kidney of Ginbuna Crucian Carp	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1321-1335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧澤真次、藪 健史、舩廣善和、司馬 肇
2. 発表標題 雌蚕の成熟過程におけるBmIGFの役割 -脂肪体と生殖原基への影響-
3. 学会等名 日本蚕糸学会第88回大会（日本蚕糸学会主催）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓮池 一心、藪 健史、司馬 肇
2. 発表標題 カイコ幼虫組織における老化に関する研究
3. 学会等名 第4回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 日本蚕糸学会（関東地区）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓮池 一心、藪 健史、舩廣善和、司馬 肇
2. 発表標題 カイコ幼虫組織における老化に関する研究
3. 学会等名 日本蚕糸学会第89回大会 日本蚕糸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤真次, 藪健史, 舩廣善和, 司馬肇
2. 発表標題 カイコ変態過程におけるBmIGFの役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀧澤真次, 藪健史, 舩廣善和, 司馬肇
2. 発表標題 雌蚕の成熟過程におけるBmIGFの役割 -脂肪体と生殖原基への影響-
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 倫明 (YAMASHITA Michiaki) (80344323)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授 (82708)	
研究分担者	今村 伸太郎 (IMAMURA Shintaro) (80510007)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主任研究員 (82708)	
研究分担者	司馬 肇 (張培淦) (SHIBA Hajime) (90256834)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	