

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450291

研究課題名(和文) アポトーシス誘導におけるセラミドの役割

研究課題名(英文) Role of ceramide during apoptosis induction

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：セラミドは、サイトカイン刺激や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、細胞内に局在するセラミドのターゲット分子は不明である。本研究では、セラミド固相化カラムを使ったクロマトグラフィーによりBimを同定した。リコンビナントBimを使ったセラミド結合試験の結果、BimのKd値は、21.71 nMであった。また、本分子のC末端側の疎水性領域を欠如した変異体では、野生型と比べて最大結合数は低下し、アポトーシス誘導能が低下した。以上から、セラミドの役割は、Bimタンパク質と相互作用し、ミトコンドリア崩壊を伴うアポトーシスを誘導する機構が推定された。

研究成果の概要(英文)：As a biochemical approach to identify direct targets of ceramide, a sphingolipid that plays an important role in cell signaling as a second messenger, we performed an affinity chromatography. Western blot analysis of the eluted proteins using a variety of antibodies against both pro- and anti-apoptotic molecules, we successfully identified the B-cell lymphoma interacting mediator (Bim) as a novel ceramide-binding molecule. Using the purified recombinant Bim protein and its truncated form expressed, we carried out a series of in vitro binding experiments. Our results indicated that ceramide specifically binds to Bim protein through a hydrophobic domain located at its C-terminal end; the dissociation constant was 21.71 nM. Our present study revealed that specific binding of ceramide to the C-terminal hydrophobic domain of Bim is a critical step for signaling the cells to apoptosis through the destruction of mitochondria in response to either cytokine stimulations or stress conditions.

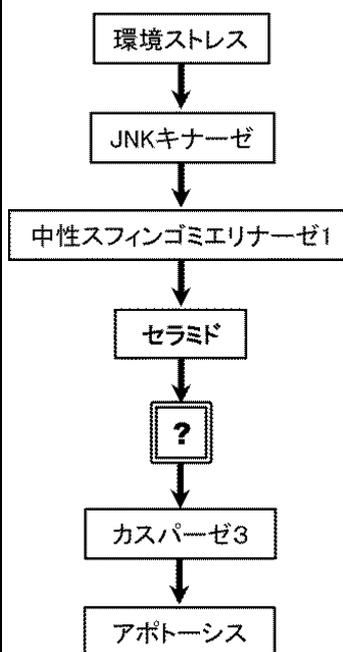
研究分野：水産化学 脂質生化学

キーワード：セラミド アポトーシス セラミド結合性タンパク質 解離定数

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 α 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).

申請者らは、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手法を確立し、中性スフィンゴミエリナーゼ 1 (nSMase1, Yabu et al, *J. Biol. Chem.* 283 (44), 29971-29982, 2008) およびカスパーゼ 3 (Yabu et al, *Biochem. J.* 2001 (360), 39-47) 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 (Yabu et al, *Fish. Sci.* 2001 (67), 333-340; Yabu et al, *Fish. Sci.* 2003, (69), 218-223; Yabu et al, *Blood* 2005 (106), 125-134). ヒラメ胚やゼブラフィッシュ胚へ外因性の N-acetyl-sphingosine (C2-セラミド) を投与するとアポトーシスが誘導されるが、C2-セラミドのアナログである N-acetyl-dihydrosphingosine (C2-ジヒドロセラミド) には、生理活性が見られずアポトーシスは生じない。また、魚類胚への紫外線照射は、C2-セラミドの投与はほぼ類似した効果を示したが、カスパーゼ阻害剤 (Z-DEVD-fmk) を投与すると、アポトーシスは抑制された。これらのことから、ストレスによって生成されたセラミドや投与した C2-セラミドはカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導するセカンドメッセンジャーとして細胞生理学的に作用する。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序を突き止めた (2013年9月13日、日本生化学会発表)。



しかしながら、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未同定であり、セラミドとアポトーシス誘導分子との相互作用は不明である (図1)。

そこで、本研究では、アポトーシスを誘導するセラミド結合性タ

図1) 提案された新しい分子機序 ンパク質の単離・同定を目指す。予備的試験として、細胞質でセラミド含量が一過的に上昇する現象を見いだしたことから、細胞質で誘発されるアポトーシス誘導経路には、ミトコンドリアから放出されるチトクローム C と Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) とが結合し、Apaf-1の多量体化を促しカスパーゼを活性化することが知られているアポトソームが関与することが考えられた。

このような知見から、本研究では、アポトーシスに伴って生成されたセラミドは、アポトソーム形成に関与するチトクローム C, Apaf-1, カスパーゼ 9 などのアポトーシス誘導分子が複合体を形成して、カスパーゼカスケードを活性化し、核崩壊に至る分子機序を推定した。

この仮説を証明するため、本研究では、アポトーシス誘導下におけるセラミドの細胞内局在・分布の変化を解析するとともに、セラミドが特異的に会合する分子を同定し、アポトーシス誘導活性を培養細胞および魚類胚を用いるバイオアッセイによって測定する。

こうして、本研究は、ストレス誘導性アポトーシスにおける新しい分子機序を提案する。

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、TNF α 、インターフェロン γ 、Fas リガンドなどの炎症性サイトカインの刺激に応答して生成され、神経系、血管系形成、免疫系および性分化におけるアポトーシスに関与する。これまでの研究では、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、セラミドを輸送し、カスパーゼ前駆体を活性化して、アポトーシスを誘導する未知分子を単離する。この分子が、セラミドの細胞内分布・局在性を決定し、セラミドのセカンドメッセンジャーとしての作用を促進することを、バイオアッセイによって解析する。

3. 研究の方法

(1) アポトソームの分離・精製

アポトソームは、ミトコンドリア崩壊により放出されたチトクロームCと細胞質に局在するApaf-1とが会合して形成される多量体(分子量680K以上)である。アポトソームは、前駆カスパーゼ9をリクルートして、カスパーゼ9が活性化し、カスパーゼ3などの下流のカスパーゼを活性化し、アポトーシスが誘導されると考えられている。

アポトソームの分離は、紫外線処理およびFas刺激したヒトJurkat T細胞を破碎して除核後、超遠心法によって細胞質画分を調整し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し、カスパーゼ9活性やチトクロームCやカスパーゼ9のタンパク質発現をウエスタンブロットやカスパーゼ9活性を調べて確認した。アポトソームの分離・精製できる試験条件を決定した。

(2) アポトソーム画分におけるセラミド含量の測定

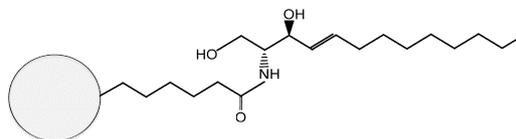
アポトーシス誘導条件下では、セラミド含量

は、細胞質画分でもっとも変化することがこれまでの予備的試験によって明らかとなった。その変動量は、通常状態下の細胞質には、とくに、セラミド含量が上昇し始める時間帯では、アポトソームの誘導が生じる時間帯と相関すると考えられる。セラミドの測定は、通常の10倍量のスケールでDGKアッセイによりセラミド含量を測定した。

(3) セラミド結合カラムを用いたアポトーシス誘導分子の同定

これまでに発見されているセラミド結合タンパク質は、セラミドアフィニティークロマトグラフィーによりカテプシンDが同定されている(Heinrich et al., *EMBO J.* 1999, (18), 5252-5263)。

カテプシンDは、リソソームに局在するプロテアーゼで、細胞質に局在しないため、本研究の対象外となる。しかしながら、セラミドと親和性を持つ酵素として同定され、セラミド結合カラムにより精製された。この方法論を活用して、セラミド結合分子の特定に使用できるものと考えられる。セラミドアフィニティークロマトグラフィーには、セラミドの骨格のアミノ酸セリン残基を有する特徴を利用して、官能基アミノ基と反応性が高い、CH-Sepharose 4Bを使ってセラミドカラムを作製した(図2)。



(図2) セラミド固定化セファロース

セラミド結合性タンパク質の精製は、ストレス処理したヒト培養細胞から、細胞質画分を調整して1mM C16-セラミドによって溶出し、セラミド結合性タンパク質を得た。セラミド結合分子の同定は、SDS-PAGEゲルで分離後、ウエスタンブロット解析によって、アポトーシス誘導分子を同定した。

(4) セラミド結合性タンパク質の機能解析

セラミドとセラミド結合性タンパク質との相互作用を調べるため、本分子のリコンビナントタンパク質について大腸菌発現系を使って、精製し、

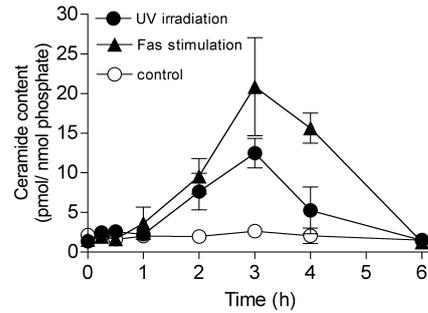
N-Palmitoyl-9, 10-³H-D-erythro-sphingosine (C16-セラミド) に対する解離定数を調べた。

本分子のアポトーシス誘導能を調べるため、セラミド結合性タンパク質遺伝子をクローン化後、pCMV-FLAG14 ベクターに目的の遺伝子を連結した。その後、ヒト Jurkat T 細胞およびゼブラフィッシュ ZE 細胞へトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後、DAPI 染色によってアポトーシス誘導能を評価した。

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、細胞内セラミドのターゲット分子を同定するため、セラミド固相化カラムを使ったクロマトグラフィーにより B-cell lymphoma 2 interacting mediator (Bim) を特定した。リコンビナント Bim タンパク質を使ったセラミド結合アッセイの結果、Bim の Kd 値は、21.71 nM であった。また、本分子の C 末端側の疎水性領域は、セラミドと強く結合し、アポトーシスを誘導することを見出した。セラミドがアポトーシス誘導時に相互作用する Bim タンパク質を発見した。

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。この現象を確認するために、まず、ヒト Jurkat T 細胞へ抗 Fas 抗体で Fas を刺激、あるいは紫外線を照射したのち、細胞質のセラミド含量を DGK アッセイにより調べた。その結果、細胞へ刺激後、3 時間で細胞質セラミド量がピークに達することが明らかになった (図 3)。



(図 3) 細胞質におけるセラミド含量の変化

Fas 刺激や紫外線処理後、3 時間で細胞質のセラミド量が最大に増加することは、セラミドシグナルがこの時間で最も作用することが予想された。そこで、細胞内セラミド結合タンパク質の同定をするため、細胞質画分を調整して 1mM C16-セラミドによって溶出し、セラミド結合性タンパク質を得た。セラミド結合分子の同定は、SDS-PAGE ゲルで分離後、抗アポトーシス分子およびアポトーシス促進分子に対する一次抗体を使ってウェスタンブロット解析を行った。その結果、B-cell lymphoma 2 interacting mediator (Bim) を検出した。

本分子をセラミドに対する特異性を評価するため、大腸菌の発現系 (pET 系システム) 使って、4 mg のリコンビナント Bim タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

セラミドと本リコンビナントタンパク質との相互作用を調べるため、セラミド結合アッセイを行った。その結果、解離定数 (Kd) は、21.71 nM であった。また、本分子の C 末端側の疎水性領域を欠如した変異体の Kd は、20.38 nM と野生型をほぼ同じ値を示したが、最大結合数が野生型と比べて 1/2 に低下した。これらのことから、セラミドは、Bim の C 末端の疎水性領域に特異的に結合することが推定された。

Bim のアポトーシス誘導能とセラミドの必須性を調べるため、Bim の野生型と疎水性領域を欠如した変異型の発現ベクター DNA を Jurkat T 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生じた。一方、疎水性領域を欠如した変異型では、アポトーシス誘導能が野生型と比べて低下した。

以上の結果から、セラミドの役割は、Bim タンパク質と相互作用し、ミトコンドリア崩壊を伴うアポトーシスを誘導する機構が推定された。

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8件)

① Y. Shibasaki, C. Hatanaka, Y. Matsuura, R. Miyazawa, T. Yabu, T. Moritomo, N. Nakanishi. Effects of IFN γ administration on allograft rejection in ginbuna crucian carp. (2016) *Dev. Comp. Immunol.*, 62, 108-115. 査読有 DOI: 10.1016/j.dci.2016.04.021

② H. Shiba, T. Yabu, M. Sudayama, N. Mano, N. Arai, T. Nakanishi, K. Hosono. Sequential steps of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are involved in the irreversible process of posterior silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*. (2016) *J. Exp. Biol.*, 219, 1146-1153. 査読有 DOI: 10.1242/jeb.130815

③ Y. Matsuura, T. Yabu, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi. Purification and characterization of a fish granzymeA involved in cell-mediated immunity. (2016) *Dev. Comp. Immunol.*, 60, 33-40. 査読有 DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.011

④ T. Yamaguchi, S. Miyata, F. Katakura, T. Nagasawa, Y. Shibasaki, T. Yabu, U. Fischer, C. Nakayasu, T. Nakanishi, T. Moritomo. Recombinant carp IL-4/13B stimulates *in vitro* proliferation of carp IgM⁺ B cells. (2016) *Fish Shellfish Immunol.* 49, 225-229. 査読有 DOI:10.1016/j.fsi.2015.12.043

⑤ F. Katakura, T. Yabu, T. Yamaguchi, J. Miyamae, Y. Shirinashihama, T. Nakanishi T. Moritomo. (2015), Exploring erythropoiesis of common carp (*Cyprinus carpio*) using an *in vitro* colony assay in the presence of recombinant carp kit ligand A and erythropoietin. *Dev. Comp. Immunol.*, 53, 13-22. 査読有 DOI:

10.1016/j.dci.2015.06.006

⑥ Y. Shibasaki, Y. Matsuura, H. Toda, N. Imabayashi, T. Nishino, K. Uzumaki, C. Hatanaka, T. Yabu, T. Moritomo, N. Nakanishi. (2015), Kinetics of lymphocyte subpopulations in allogeneic grafted scales of ginbuna crucian carp. *Dev. Comp. Immunol.*, 52, 75-80. 査読有 DOI:

10.1016/j.dci.2015.04.013

⑦ T. Yabu, H. Shiba, Y. Shibasaki, T. Nakanishi, S. Imamura, K. Touhata, M. Yamashita. (2015), Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ.*, 22, 258-273. 査読有 DOI: 10.1038/cdd.

⑧ Y. Matsuura, T. Yabu, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi. Identification of a novel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. (2014), *Dev. Comp. Immunol.*, 46, 499-507. 査読有 DOI: org/10.1016/j.dci.2014.06.006

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称: 抗イヌCD20モノクローナル抗体又は抗体フラグメント, キット, 診断方法, 治療用組成物, 治療方法, 核酸, ベクター, キメラ抗原受容体及びT細胞.

発明者： 中西照幸, 亘敏広, 加納壘, 藪健史
権利者： 同上
種類： 特許
番号：特許願 2016-013104 号
取得年月日： 平成 28 年 1 月 28 日
国内外の別： 国内（日本国）

名称： 新規セレン含有化合物.
発明者： 山下由美子, 山下倫明, 藪健史
権利者： 同上
種類： 国際特許
番号：特許願 2009-282034 号
取得年月日： 平成 27 年 6 月 12 日
国内外の別： 国外（米国）

名称： 抗ゼブラフィッシュ CD 4 モノクローナル抗体又は抗体フラグメント、抗ゼブラフィッシュ CD 8 α モノクローナル抗体又は抗体フラグメント及びそれらをコードする核酸.
発明者： 中西照幸, 藪健史, 柴崎康宏, 松浦雄太, 宮澤龍一郎.
権利者： 同上
種類： 特許
番号： 特許願 2015-115621 号
出願年月日： 平成 27 年 6 月 9 日
国内外の別： 国内（日本国）

名称： 抗イヌインターロイキン-6 受容体モノクローナル抗体又は抗体フラグメント及びその利用.
発明者： 中西照幸, 亘敏広, 枝村一弥, 藪健史, 柴崎康宏, 塩澤直子.
権利者： 同上
種類： 特許
番号： 特許願 2015-097271 号
出願年月日： 平成 27 年 5 月 10 日
国内外の別： 国内（日本国）

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・研究員
研究者番号：00551756

(2) 研究分担者

司馬 肇 (SHIBA, Hajime)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：90256834

山下 倫明 (YAMASHITA, Michiaki)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産
大学校・教授
研究者番号：80344323

今村 伸太郎 (IMAMURA, Shintaro)
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
研究者番号：80510007