

セラミドによるストレス誘導性アポトーシスの分子メカニズム 山下倫明

アポトーシス（プログラム細胞死）は、発生や再生過程で生じた不要となった細胞やストレスによって損傷を受けた細胞や癌細胞、ウイルスに感染した細胞などの排除に関与している¹⁾。セラミドは、リン脂質の一種であるが、アポトーシスが生じる際に細胞内で生成され、アポトーシス誘導のためのシグナル分子として作用することが知られている（図1）²⁾。魚類胚はセラミドの作用やアポトーシスの誘導を調べる上で重要なモデルとして用いられる（図2）。

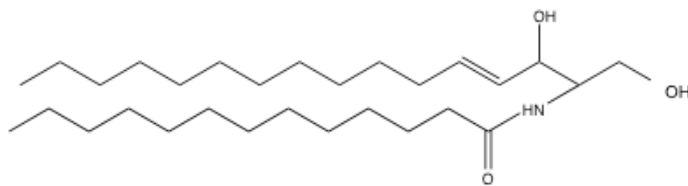


図1 セラミドの化学構造

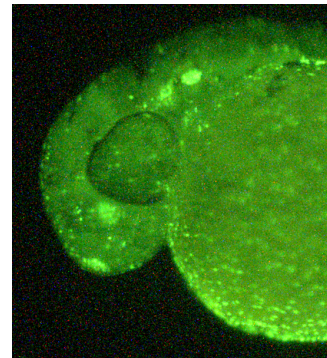


図2 ゼブラフィッシュ胚のセラミド処理（40 nM C2-ceramide, 24 h）によって誘導されたアポトーシス細胞のTUNEL蛍光染色。耳や鼻の細胞はセラミドに対して感受性が高かった。

ストレス誘導性アポトーシスでは、熱ストレス、紫外線・ガンマ線照射、酸化ストレスなどのストレス条件によって、中性スフィンゴミエリナーゼ（SMase 1）が、c-jun N-terminal kinase（JNK、JNキナーゼ）によるリン酸化によって生じ活性化し、細胞膜のリン脂質スフィンゴミエリンからセラミドが生成される。セラミドの作用によってカスパーゼ群が活性化したのち、DNA・ヌクレオソームが分解し、細胞核が崩壊してアポトーシスに至る分子機構が明らかとなった（図3）³⁾。

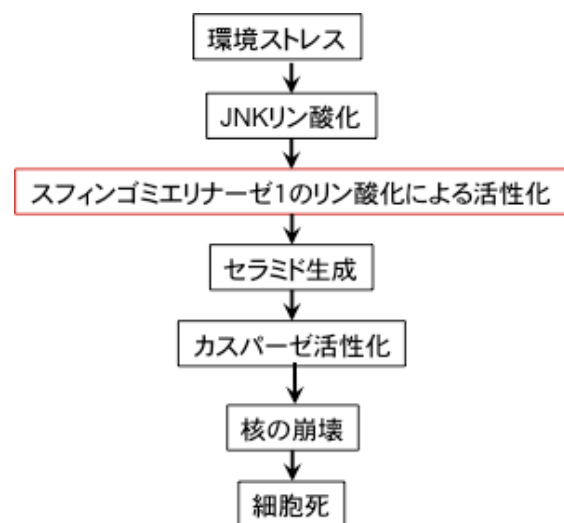


図3 ストレス誘導性アポトーシスの経路

SMase 1 の活性化は、Ser-270 (270番目のセリン残基) の特異的なリン酸化によって生じた。270位セリン残基を特異的に認識する抗体を作製し、ストレスリン酸化シグナルによるSMase 1 の特異的なリン酸化を検出した (図4)。

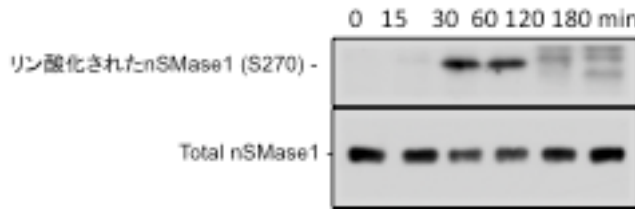


図4 ヒト白血球Jurkat T細胞の熱ショック処理によるリン酸化応答

JNKによるSMase 1 のリン酸化が、ストレス誘導性アポトーシスの発現に必須であることを確認するために、SMase 1 組換え酵素タンパク質とリン酸化部位の変異体分子を作製した。SMase1に対して、JNKを作用すると、SMase 1 はインビトロでのリン酸化されて、酵素活性は増大した^{3,4)}。SMase 1 のリン酸化部位の270位セリン残基をアラニンに置換した変異体分子はJNキナーゼによって、リン酸化されなかった。また、270位セリン残基をアスパラギン酸またはグルタミン酸に置換した変異分子は野生型よりも活性が高かった。このことから、270位セリン残基のリン酸化は酵素の活性化に必須の役割を果たしていることが推定された (図5, 6)。

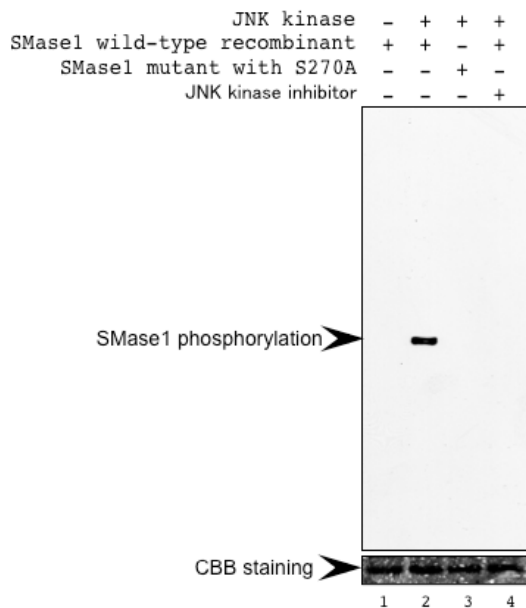


図5 ゼブラフィッシュSMase 1のJNキナーゼによるリン酸化抗フォスホセリン (Ser-270) 抗体を用いるウェスタンブロットによって、SMase 1 組換えタンパク質がJNキナーゼによってリン酸化されることを確認した。Ser-270をアラニンに置換した変異体分子には反応しない。また、JNキナーゼ阻害剤によってリン酸化は阻害された。

```

MAPQQPGKLRVFSLNCWGI RFLSKLCAQRYEMIGELLGREQHDI
ALLQE VVWSE RDFLFLKRKLS CSHPYTHYFKSGVIGSGLAVFSKH
RIQDALLYQYSLNGYPYMLSHGDWFGGKAAGLVIVEVFG LKAHV
YVTHLHAEYSRAQDGYLPHRIVQSWELQQFVRHTSHGADLVILG
GDLNMHPSDLGNRLRLRSHTGLRGYETETDKFDGCE DGHTLIANN
HFTTKQDLIPFEKGIRIDYILMKGSQRVSVKCESLSTTKGSVSD
KPPFYSDHEALMADLNLLSSQDCTDAPPASDRMDVVSEARAVV
KEGLGKTEALRDRSLHLMFAGLLLLLLLVLCSSSFFSFAAGFLG
AVCVFILLSGALLYMLETTHIKVLKETEDQMMLHSQNLQTKLTG
CRISGSSSSDASPEIQPSSPFKREE
    
```

```

Zebrafish SMase1  DKPPFYSDHEALMAD
Human SMase1     HSGTPLSDHEALMAT
Mouse SMase1     HSDKPFSDHEALMAT
    
```

図6 SMase 1 のアミノ酸配列

(上図) ゼブラフィッシュSMase 1 のアミノ酸配列 (下図) リン酸化部位周辺のアミノ酸配列の比較
 枠線はリン酸化部位のSer-270を示す。下線は活性中心に位置するHis-272を示す。二重下線は膜通過ドメインを示す。

JNKによるストレスリン酸化応答は、酵母からヒトまで分布する細胞内シグナ

ル伝達機構であることから、スフィンゴミエリンからセラミドが生成し、アポトーシスを誘発する分子機序とその生成物のセラミドは、初期発生など、さまざまな環境応答に関与すると推定される。ストレスによるアポトーシス誘導は、スフィンゴミエリナーゼ1を介するシグナル経路を介しており、活性化したSMase1によって生成されるセラミドがセカンドメッセンジャーとして作用すると考えられる。現在さらに、ストレスリン酸化シグナルによって、細胞内に一過的に生成されたセラミドがカスパーゼ群を活性化するため作用するセラミド結合分子の存在を調べている。

文献

- 1) Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; **380**: 75–79.
- 2) Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 139–150.
- 3) Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):258-73.
<http://www.nature.com/cdd/journal/v22/n2/full/cdd2014128a.html>

3) 特願2012-272595, リン酸化中性スフィンゴミエリナーゼ1, 抗リン酸化中性スフィンゴミエリナーゼ1抗体, 中性スフィンゴミエリナーゼ1変異体, 及びそれらの用途, 独立行政法人水産総合研究センター, 平成24年12月13日出願