

魚類細胞および胚におけるストレス誘導性アポトーシスの分子メカニズム： 中性スフィンゴミエリナーゼ-セラミド経路の活性化

藪 健史*・山下倫明*

The Molecular Mechanism of Stress-Induced Apoptosis in Fish Cells and Embryos : Activation of Neutral Sphingomyelinase-Ceramide Pathway

Takeshi YABU* and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Mechanism of stress-induced apoptosis in fish cultured cells and embryos has been characterized to be regulated by Mg^{2+} -dependent neutral sphingomyelinase 1. The enzyme hydrolyzes sphingomyelin as a substrate and produces ceramide by its activation through various environmental stimuli, such as heat shock, UV irradiation, gamma-ray irradiation, and C_2 -ceramide treatment. Such ceramide signaling activates a pro-apoptotic caspase cascade and apoptosis characterized by DNA fragmentation, and resulted in abnormal morphogenesis in fish embryogenesis. Therefore, ceramide signaling functions as the important pro-apoptotic signal in fish development and apoptosis.

Key words : apoptosis, heat shock, UV irradiation, gamma-ray irradiation, ceramide, neutral sphingomyelinase, caspase-3, zebrafish, embryo, Japanese flounder.

魚類の個体発生初期に起こる大量死は、天然海域における資源変動の要因として重要である。また、このような大量死は、種苗生産技術における大きな制約となっている。この初期減耗の主な要因として、環境条件、被捕食、疾病および飢餓の4つが考えられ、とくに受精卵期および仔魚期における生残には水温、日長などの環境要因が強く影響することが推定されている (Houde, 1987)。魚類の発生過程において、温度ストレスは、発生、成長、組織の分化および器官形成に障害をもたらすだけでなく、不妊化、性転換などの生殖生理の機能にも影響することが知られている (Strussmann et al., 1998; Ito et al., 2003)。

ゼブラフィッシュの原腸胚を 37℃ で高温処理した時、体節数が減少するとともに、体節が萎縮した (Roy et al., 1999)。このように、環境ストレスによる生物影響として、形態および組織観察、核酸比、消化酵素

活性および代謝酵素活性が測定されている。その結果、天然資源の初期生活史の解析、生理状態の把握および種苗生産における健苗判定に対して、生化学的手法は、現在では重要な研究手段として認識されるようになった。

本研究では、環境ストレスによる生物影響を評価する手法を確立するため、受精卵および仔魚に対してもたらされる環境ストレスによる障害とその度合いを解析する上で必要となる細胞死 (アポトーシス) の分子メカニズムに着目した。そこで、この総説では、魚類のアポトーシスの発現および環境ストレスによるその誘導メカニズムを解説する。

アポトーシス

プログラム細胞死は、発生過程における形態形成

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

* 中央水産研究所 236-8648 横浜市金沢区福浦 2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan) .
National Research Institute of Fisheries Science

* Tel: 81-45-788-7665. Fax: 81-45-788-5001. E-mail: mic@affrc.go.jp

に伴って生じる細胞死をいう。アポトーシス研究は、Kerr らの細胞・組織の形態観察から始まり、その特徴的な細胞死はアポトーシスと呼ばれるようになった (Kerr *et al.*, 1972)。アポトーシスはその作用メカニズムが明らかにされることにより、現在ではプログラム細胞死とほぼ同義で用いられる。

魚類細胞でのアポトーシスシグナル伝達経路は、主に三つの経路に大別される。第1の経路は熱、紫外線、 γ 線や低酸素などのストレス誘導性の経路、第2は、Fas リガンド、骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) などのシグナル分子の刺激によって誘導される膜レセプターを介する経路、変態に伴う甲状腺ホルモンによって誘導される経路が知られている。第3は、ベジクルの形成を伴う成長と飢餓に関わる経路である。これらの3経路のアポトーシスの分子メカニズムがゼブラフィッシュ、ヒラメ、ブリなどの培養細胞を使って解析された。ゼブラフィッシュ胚を熱ショック、紫外線または γ 線で処理すると、染色体 DNA の断片化が生じるので、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を用いるホルマウント染色によってアポトーシスが生じた細胞の分布を観察した。その結果、多数の細胞が原腸胚

期の被層で、体節の形成期から孵化期の脊髄、膜鱗、心臓および脳で観察された (Yabu *et al.*, 2001a)。また、ヒラメ胚への熱ショックあるいは紫外線処理によっても、心臓および膜鱗で著しいアポトーシスが観察された (Yabu *et al.*, 2003)。合成基質 Acetyl-DEVD-methylcoumarylamide (Ac-DEVD-MCA) を用いるカスパーゼ活性の測定によって、ストレス強度に対して依存的に活性が上昇した。これらのことから、熱、紫外線、 γ 線によって誘発されるアポトーシスはカスパーゼの活性化を介して生じることが推定された。

アポトーシス誘導分子カスパーゼ

魚類におけるアポトーシスの中心的役割を担う分子群として、カスパーゼファミリーが挙げられる。哺乳類ではカスパーゼファミリーは14種類のタイプから構成されるシステイン型プロテアーゼのファミリーである。ゼブラフィッシュには、9種類のカスパーゼが存在する (Fig. 1)。これらのカスパーゼは、通常、細胞内では不活性前駆体として存在する。細胞がアポトーシス誘導の刺激を受け、カスパーゼが活性化すると、その活性により、細胞内の特定の基質タンパク質が加水分解され、アポトーシスが実行される。カスパーゼ

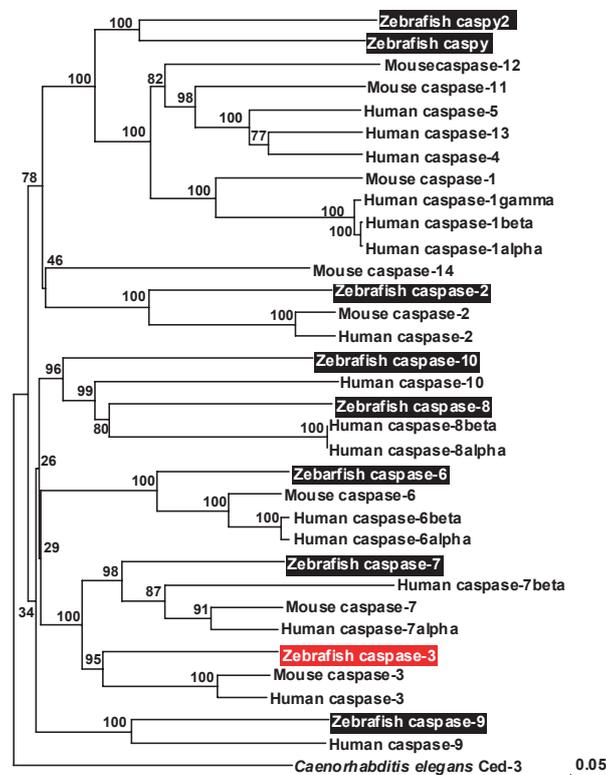


Fig. 1. Molecular phylogenetic tree of the caspase family in vertebrates. Caspy 1 and caspy 2 contain a pyrin domain in the N terminal region.

はその構造と機能からイニシエーター（始動）タイプ（カスパーゼ -8, -9, -10 など）とエフェクター（実行）タイプ（カスパーゼ -3, -6, -7 など）の2つのタイプに大別され、それらによるカスケード反応が誘導される。上流に位置するイニシエーターカスパーゼはアポトーシスシグナルを受け取ると自己活性化し、下流のエフェクターカスパーゼをプロセッシングにより活性化させる。活性化したエフェクターカスパーゼによって各カスパーゼの基質としての切断点をもつ細胞構成成分が加水分解され、アポトーシス小体の形成、核の凝縮、染色体 DNA の断片化、細胞膜の崩壊などのアポトーシス特有の細胞構造の崩壊と細胞形態の変化が引き起こされる。

カスパーゼ -3 は、主要なエフェクターカスパーゼである。魚類細胞や魚類胚でアポトーシスの誘導能をもつカスパーゼ -3 がクローン化された (Yabu *et al.*, 2001b)。ゼブラフィッシュカスパーゼ -3 は 282 残基のアミノ酸からなり、不活性前駆体から活性化する際のプロセッシングを受ける切断点が 2 カ所推定された。大腸菌発現系による組み換えカスパーゼ -3, Ac-YAVD-MCA, Ac-LEHD-MCA, Ac-IETD-MCA を水解することができず、Ac-DEVD-MCA だけを特異的に水解した。また、カスパーゼ -3 を魚類細胞およびゼブラフィッシュ胚へ過剰発現させた結果、アポトーシスが生じ、成熟酵素へのプロセッシングが観察された。このことから、本酵素がアポトーシスを実行する本質的な分子であることが明らかにされた (Yabu *et al.*, 2001b)。

スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質研究は、Thudichum (1884) が脳組織の抽出物中に未知の脂質として、セレブシド、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンが発見したことに始まる。脳・神経系における生体膜脂質の構造解析およびスフィンゴリポドーシス（脂質蓄積症）の病態解明の二つを軸として研究が進展してきた。その後、スフィンゴ脂質は、生体膜の構成成分として細胞の構造を維持することおよび細胞内の栄養源としての役割を担うと考えられてきた。Jones と Michell (1975) は、ホルモンによる刺激によってイノシトールリン脂質が応答して、細胞内カルシウムが増加するという脂質の新たな機能を提起した。以後、生体膜の研究だけでなく、細胞内シグナル伝達物質としての脂質の役割が重要視されている。Okazaki ら (1989) は、セラミドが細胞分化の誘導時にシグナル伝達物質として働くことを見出した。それ以来、セラミドおよびスフィンゴシン-1-リン酸は、細胞内シグナル伝達物質として、分化、アポトーシス、細胞増殖などの細胞機能を制御すると考えられている。

スフィンゴ脂質は、頭は人で胴体は獅子であるスフィンクスに分子構造を例えて、非水溶性の脂肪酸と水溶性のアミノ酸から構成されるスフィンゴ脂質の化学構造に対して名付けられた (Fig. 2)。すなわち、スフィンゴ脂質はセラミドまたはスフィンゴシンを基本骨格とする。セラミドの合成系・代謝系として 4 経路が知られている (Fig. 3)。すなわち、セリンとパルミ

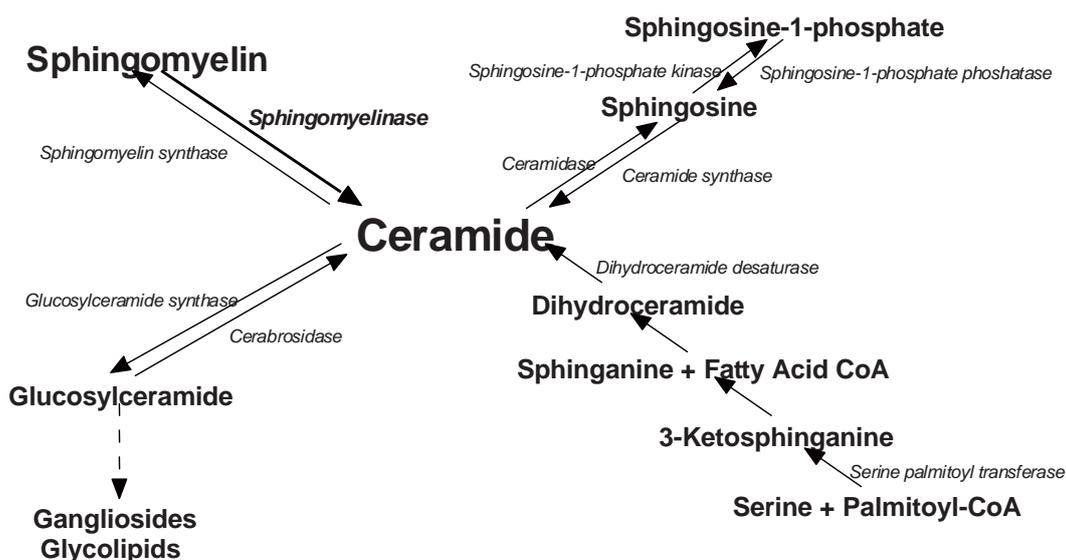


Fig. 2. Chemical structure of sphingolipids.

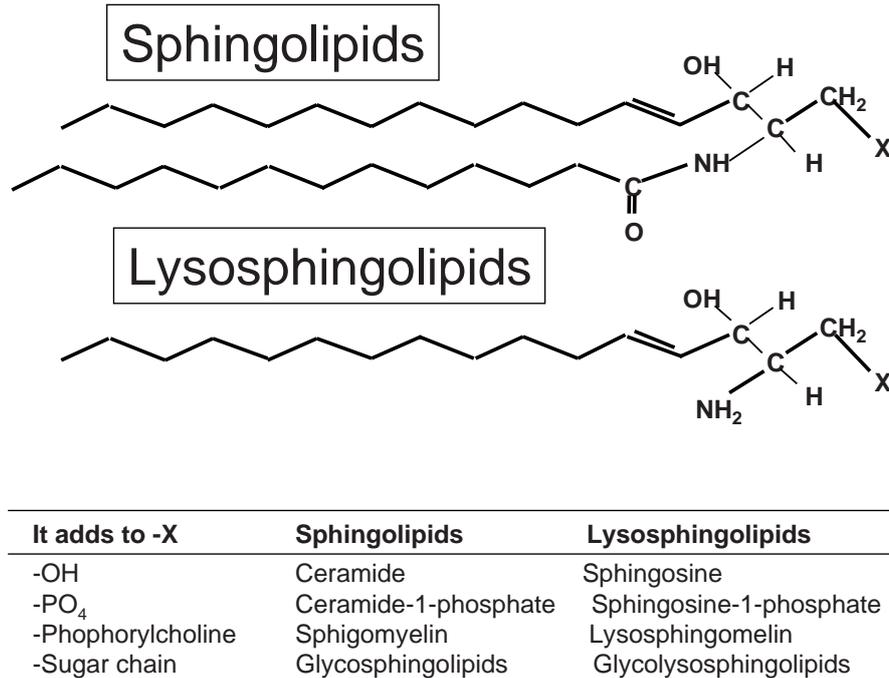


Fig. 3. Pathways of ceramide metabolism

トイル CoA の縮合反応から始まる *de novo* のセラミド合成経路、スフィンゴミエリンまたはスフィンゴ糖脂質の分解によってセラミドが生成される経路およびスフィンゴシン-1-リン酸からスフィンゴシン-1-リン酸ホスファターゼの脱リン酸反応によって始まるセラミドの合成経路である。生体内ではスフィンゴシンは、セラミドを経ることなく *de novo* 合成されることはない。このことから、生物学的にはスフィンゴ脂質の基本骨格はセラミドであると考えられる。また、無脊椎動物では魚類に存在しないセラミド関連のスフィンゴ脂質マンノシルイノシトールセラミドやマンノシジイノシトールセラミド (Becker and Lester, 1980) が存在し、大腸菌内にもセラミドは存在しない。セラミド類似のスフィンゴ脂質の役割については不明な点が多いが、脊椎動物のスフィンゴミエリンと同様に、細胞膜を構成するリン脂質としての役割が考えられる。細胞内のスフィンゴ脂質量は、総リン脂質量の内訳はスフィンゴミエリン 2.7%、セラミド 0.082%、スフィンゴシン 0.017% であり、スフィンゴシン-1-リン酸はさらに微量である (Merrill and Sandhoff, 2002)。また、セリンとパルミトイル CoA によりセラミドまでは小胞体で合成され、スフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質はゴルジ装置で合成される。細胞外膜に多く存在するスフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質はエンドソームによってリソソームへと輸送され酵素によって分解される。

ストレスによって生成されるセラミド

熱ショック、紫外線、放射線、過酸化水素などのストレス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と Verheij ら (1996) は報告した。Obeid ら (1993) は、外因性 N-acetyl-sphingosine (C2-セラミド) をヒト白血病細胞 HL-60 細胞へ投与すると、ストレスを介さずに、カスパーゼカスケードが活性化されアポトーシスが生じると報告した。これらのことから、セラミドはアポトーシスを制御する脂質セカンドメッセンジャーとして位置づけられるようになった。

従来のアポトーシス研究では哺乳類の培養細胞系を実験材料として、培養液へのシグナル物質や阻害剤を添加することによって、その細胞でのアポトーシスに関与する酵素群を同定する手法が取られてきた。動物個体を用いる実験系では環境ストレスなどの外部刺激によるアポトーシスの誘導を観察するのが難しく、特定の細胞・組織でのアポトーシスの組織学的観察が主であった。また、セラミドはストレスによるアポトーシスの誘導物質であるが、*in vivo* での投与では血液中のリポタンパク質に吸着されるため、細胞内の生理的なセラミドの濃度領域でアポトーシスの誘導効果を調べることができなかった。しかし、魚類胚は培地中で

培養できる利点があり、セラミドや環境ストレスの効果を容易に観察することが可能となった (Yabu *et al.*, 2001a; Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005)。実際、ヒラメ胚やゼブラフィッシュ胚へ外因性の 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-dihydrospingosine (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、魚類胚では紫外線によって誘発されるアポトーシスと外因性の C2-セラミド投与によって生じるアポトーシスが、ほぼ同じ部位で誘導されることから、紫外線ストレスと C2-セラミドの投与とが魚類胚に対してほぼ類似した効果がある (Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005)。

ストレスによって活性化される中性型スフィンゴミエリナーゼ

熱、紫外線などのストレスによって誘発されるアポトーシスは、細胞内のセラミドシグナルを介して、カスパーゼカスケードを活性化して実行される。最近の研究で、ストレス下でセラミド量を調節する分子として、ゼブラフィッシュ ZE 細胞から中性型スフィンゴミエリナーゼが同定された (Yabu *et al.*, 2005)。まず、ゼブラフィッシュ胚由来の培養細胞、ZE 細胞を使って、熱ストレス下でのセラミド含量の変化を調べたところ、熱ストレス処理後 2 時間でセラミド量が、コントロール区に比べて一過的に約 2 倍量まで増加した。この一過的に生成されたセラミド量の増加の後に、カスパーゼ活性が上昇し、アポトーシスが生じた。熱ストレスによって増加するセラミド生成には、*de novo* 合成経路のセラミド合成酵素やセリンパルミトイル転移酵素、スフィンゴミエリン合成酵素、酸性型スフィンゴミエリナーゼ、 Mg^{2+} -非依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ、 Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ、セラミダーゼ、グリコシルセラミドトランスフェラーゼなどの酵素群が関わるのが推定されるが、それらの酵素活性の測定、セラミド合成酵素阻害剤フモニシン B1 の試験、細胞内のスフィンゴミエリン含量の測定の結果から、 Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが熱ストレス下で活性化することが明らかとなった。そこで、ZE 細胞から cDNA ライブラリーを作製して、合成基質 C6-nitro-benzoxadiazolyl-スフィンゴミエリンを用いる酵素活性を介した発現クローニング法により Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ活性を持つ cDNA クローンを単離した (Yabu *et al.*, 2005)。さらに、本酵素の性状とアポトーシス誘導能を調べた。ゼブラフィッシュ

Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼは、420 残基からなり、C 末端側の 2 カ所に膜貫通領域を有した。組み換え型のスフィンゴミエリナーゼは、 $[^{14}C]$ -フォスファジルコリンを水解せず、 $[^{14}C]$ -スフィンゴミエリンを特異的に加水分解した。至適 pH は、7.5 で、 Mg^{2+} イオンを必要とした。ZE 細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドによるタンパク質翻訳阻害試験では、熱ストレスによって誘導されるセラミド生成が阻害され、アポトーシスも抑制された (Yabu *et al.*, submitted)。これらのことから、熱ストレスによって誘発されるアポトーシスは、 Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが活性化し、セラミドが一過的に生成された結果、カスパーゼカスケードが活性化される反応経路が重要であることが明らかとなった。

セラミドシグナルが介するアポトーシスの分子機構

紫外線を照射したゼブラフィッシュ胚ではセラミドが生成され、アポトーシスが発現するが、外因性のセラミドを投与したヒラメ胚やゼブラフィッシュ胚でも、アポトーシスが生じ、組織が崩壊した (Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005)。しかしながら、紫外線およびセラミドで胚を処理する際にカスパーゼ阻害剤 Benzyloxycarbonyl-DEVD-fluoromethylketone (Z-DEVD-fmk) やセラミドの生合成経路上にあるスフィンゴシン-1-リン酸を培養液中に添加することによって、アポトーシスが抑制された (Yabu *et al.*, 2005)。このことから、ストレスによって生成されたセラミドがカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。魚類胚だけでなく、脊椎動物に共通するアポトーシスに誘導経路に関する新しいモデルを提案した (Fig. 4)。

以上のように、TUNEL 染色、カスパーゼ活性、 Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ活性、セラミド含量およびスフィンゴミエリン含量の測定によって、受精卵・仔魚へのストレスの影響を把握することが可能になった。魚類の初期発育過程における環境ストレスは胚における各組織、とくに膜鱗および脊髄でアポトーシスを生じさせ、形態形成異常をもたらした。このアポトーシスは、ストレスによって活性化した Mg^{2+} -依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが膜脂質スフィンゴミエリンを水解し、生成されたセラミドがシグナル物質として作用して、カスパーゼを活性化する反応経路が関与するものと推定される (Fig. 4)。この成果は、生態系における環境ストレス条件下での受精卵・仔魚の生残機構の解明と種苗生産技術における新しい飼育管理手法の開発に寄与するものである。

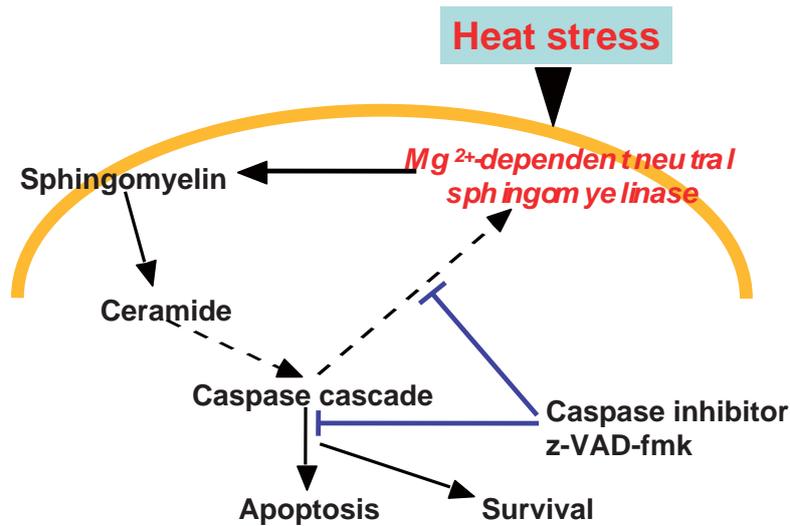


Fig. 4 Signaling pathway in stress inducible apoptosis

環境ストレスに伴うスフィンゴミエリナーゼの活性化機構

本研究で提案したモデルのなかで、Mg²⁺-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼの活性化機構とセラミドによって活性化されるカスパーゼ機構が依然不明である。まず、スフィンゴミエリンは、細胞膜の外膜上に存在するが、スフィンゴミエリナーゼは、分子構造データから細胞膜の細胞質側にスフィンゴミエリンを水解する活性中心が存在する。このことから、細胞が正常に生育する条件ではスフィンゴミエリナーゼは、スフィンゴミエリンには作用しないが、ストレス条件下では、細胞外膜側に存在するスフィンゴミエリンが細胞膜を横切り内膜側へ転移し、スフィンゴミエリナーゼが作用してセラミドが生成されると推定される。このような膜の転移の機構に関する仮説として、1) スフィンゴミエリンを内膜へ特異的に取り込むトランスポータータンパク質による、2) フリップ・フロップによる外膜から内膜へのリン脂質の転移、3) アポトーシスの際に生じる膜脂質の混合 (scrambling) による、4) スクランブルアーゼの作用による、などの分子機構が考えられた。また、熱ストレスによるアポトーシスには、セラミドが細胞内シグナルとしてカスパーゼ-3を介するアポトーシスを誘導するが、セラミドそのものはカスパーゼ-3を活性化する作用を示さない。したがって、カスパーゼ-3の活性化を誘導する機構にセラミドが関与すると予想される。例えば、カスパーゼ-3の上流に位置するミトコンドリア経路は、チトクロムCとApaf-1の複合体の形成(アポソーム)がカスパーゼ-3の活性化する。この複合体の形成過程にセラミドが関与しているかもしれない。今後、ス

トレス誘導性アポトーシスの分子機構を解明するうえで、これらは重要な研究テーマとして位置づけられる。

文 献

- Becker G. W., Lester R.L., 1980: Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**, 747-754.
- Houde E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.* **2**, 17-19.
- Ito L. S., Yamashita M., Strussmann C. A., 2003: Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* **297**, 169-179.
- Jones L. M., Michell R. H., 1975: The relationship of calcium to receptor-controlled stimulation of phosphatidylinositol turnover. Effects of acetylcholine, adrenaline, calcium ions, cinchocaine and a bivalent cation ionophore on rat parotid-gland fragments. *Biochem. J.* **48**, 479-485.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-257.
- Merrill A. H., Sandhoff K., 2002: Biochemistry of lipids, lipoprotein and membranes, 4th edition (Vance D.E,

- Vance J.E., eds), Chapter 14, Elsevier, Amsterdam.
- Obeid L. M., Lincardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A., 1993: Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.
- Okazaki T., Bell R. M., Hannun Y. A., 1989: Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **264**, 19076-19080.
- Roy M. N., Prince V. E., Ho R. K., 1999.: Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* **85**, 27-34.
- Strussmann C. A., Saito T., Takashima F., 1998: Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **119**, 637-644.
- Thudichum J. L. W., 1884: A treatise on the chemical constitution of brain. Bailliere, Tindall, and Cox, London.
- Yabu T., Todoriki S., Yamashita M., 2001a: Stress-induced apoptosis in zebrafish embryo by heat shock and UV and gamma-ray irradiation detected by increased caspase activity and whole mount TUNEL staining. *Fish. Sci.* **67**, 333-340.
- Yabu T., Kishi S., Okazaki T., Yamashita M., 2001b: Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish FHM cells and zebrafish embryo. *Biochem. J.* **360**, 39-47.
- Yabu T., Ishibashi Y., Yamashita M., 2003: Stress-induced apoptosis in larval embryo of Japanese flounder. *Fish. Sci.* **69**, 1218-1223.
- Yabu T., Tomimoto H., Taguchi Y., Yamaoka S., Igarashi Y., Okazaki T., 2005: Thalidomide-induced anti-angiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood* **106**, 125-134.
- Yabu T., Imamura S., Yamashita M., Okazaki T., (submitted) : Identification of Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*
- Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Jarvis W. D., Grant S., Birrer M. J., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. N., 1996: Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, **380**, 75-79.