OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bcl-2/E1B 19 kDa - interacting Protein 3 - like Protein (Bnip3L) Interacts with Bcl-2/Bcl-xL and Induces Apoptosis by Altering Mitochondrial Membrane Permeability
Author(s)	今津, 哲央
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41724
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	今津哲央（いまづてつお）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 14529 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Bcl－2／E1B 19 kDa－interacting Protein 3－like Protein (Bnip3L) Interacts with Bcl－2／Bcl－x_L and Induces Apoptosis by Altering Mitochondrial Membrane Permeability （Bnip3（Bcl－2／E1B 19 kDa結合蛋白3）類似蛋白Bnip3LはBcl－2／Bcl－x_Lに結合しミトコンドリアの膜透過性を亢進してアポトーシスを誘導する）
論文審査委員	（主査） 教授 奥山 明彦 （副査） 教授 辻本 賀英　教授 岡野 栄之

論文内容の要旨

【目的】

Bnip3は，adenovirus E1B 19kDa蛋白に結合する蛋白としてクローニングされ，アポトーシス抑制蛋白であるBcl－2にも結合することが報告されている。我々は，Bnip3蛋白と56％のアミノ酸が一致するBnip3L蛋白をコードするヒト遺伝子のクローニングと，このBnip3Lを発現させた癌細胞が，増殖抑制されることを以前報告しており，今回，Bnip3Lの詳細な機能解析を目的として，研究を行った。

【方法ならびに成績】

Bnip3L蛋白は，そのアミノ酸配列から，BH3ドメインとC末端に疎水性アミノ酸からなる膜結合領域を有していた。BH3ドメインは，アポトーシスを制御するBcl－2ファミリー内でよく保存された領域で，特にアポトーシス促進蛋白においては，細胞死誘導活性とアポトーシス抑制蛋白（Bcl－2やBcl－x_Lなど）とのヘテロダイマー形成に必須であることが示されている。

COS－7細胞に，N末端にHA－tagを付加したBnip3L蛋白（HA－Bnip3L）とBcl－2・Bcl－x_L各々の蛋白を発現させて，それぞれの特異抗体を用いて免疫沈降したところ，Bnip3L蛋白は，Bcl－2とBcl－x_L各々に対する結合能を持っていることが明らかになった。この結合能は，BH3ドメインを欠失させたミュータント（Bnip3L－ΔBH3）では低下し，膜結合領域を欠失させたミュータント（Bnip3L－ΔC）では，完全に消失していた。

次に，Rat－1細胞にHA－Bnip3Lを発現させて細胞内局在を検討した。抗HA抗体を用いて免疫蛍光染色により検鏡したところ，Bnip3Lは，ミトコンドリア膜蛋白であるF_0F_1－ATPaseと完全に一致する染色パターンを呈し，ミトコンドリアに局在することが示唆された。Bnip3L－ΔBH3ではその局在に変化は認められなかったが，Bnip3L－ΔCでは，その局在が細胞質へ移行した。

続いてBnip3Lの機能を解析するために，Bnip3L蛋白を一過性に強制発現させたところ，Rat－1細胞やHaLa細胞でアポトーシスが誘導された。この細胞死誘導活性はBnip3L－ΔCでは消失したが，Bnip3L－ΔBH3では低下するものの完全に消失するには至らなかった。

さらに，BH3ドメインを有するアポトーシス誘導蛋白が，直接ミトコンドリアを標的として働くことが，近年，我々を含む複数のグループから報告されているため，単離ミトコンドリアを用いた実験系を利用して，Bnip3Lのリコン

ビナント蛋白がミトコンドリアに与える影響を検討したところ，Bnip3Lのリコンビナント蛋白は，単離ミトコンドリアの膜電位を低下させ，チトクロムCを放出させた。

【総括】

Bnip3L蛋白はBnip3蛋白のホモログで，BH3ドメインと疎水性アミノ酸からなる膜結合領域を有していた。Bnip3L蛋白は他のBH3ドメインを有するアポトーシス促進蛋白と同様に，アポトーシス抑制蛋白（Bcl－2やBcl－x_L）との結合能と，細胞死誘導活性を有しており，ミトコンドリアに局在していた。

Bnip3L蛋白のBH3ドメインと膜結合領域の機能を明らかにするため，それぞれのミュータントを作成して検討した結果，膜結合領域がその機能発現に必須であることが判明し，同時にBH3ドメインも機能に関わることが明らかにされた。

さらにBnip3Lのリコンビナント蛋白は，単離ミトコンドリアの膜電位を低下させ，チトクロムCを放出させたことから，Bnip3LはBH3ドメインを有する細胞死誘導蛋白の一員であり，ミトコンドリアを標的として，細胞死を誘導することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，Bcl－2／アデノウイルス19kDa蛋白に結合するBnip3蛋白のホモログであるBnip3L蛋白分子の特徴について，解析，報告している。

Bnip3L蛋白が，BH3ドメインと膜結合領域を有し，他のBH3ドメインを有するアポトーシス促進蛋白と同様に，アポトーシス抑制蛋白であるBcl－2とBcl－x_Lに結合すること，ならびに，ミトコンドリアに局在し，細胞死誘導活性を有することを示し，さらに，Bnip3L蛋白が，ミトコンドリアの膜電位を低下させ，チトクロムCを放出させることから，Bnip3LがBH3ドメインを有する細胞死誘導蛋白の一員であり，ミトコンドリアを標的として，細胞死を誘導することを明らかにしている。

近年解明されつつあるアポトーシスの分子機構において，ミトコンドリアの介在が重要視されているが，本研究は，分子生物学的手法を駆使してBnip3L蛋白を解析し，Bnip3L蛋白がミトコンドリアを標的として働く細胞死誘導蛋白であることを見出すことにより，アポトーシスの分子機構解明に，大きく貢献した。

このことから，本研究は，学位の授与に値すると考えられる。