The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bax Interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria
Author(s)	成田, 匡志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41760
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	成　田　匡　志（なり た まさ し）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15304　号
学位授与年月日	平成12年3月24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	Bax Interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. （ミトコンドリアにおける Bax の permeability transition pore への結合による permeability transition およびシトクロムc放出の誘導能。）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　暉 （副査） 教　授　辻本　賀英　　教　授　長田　重一

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

アポトーシスの共通経路において重要な役割を果たすミトコンドリアでは、アポトーシスにおいて2つの変化がおきる。1つはシトクロムcがミトコンドリアより放出され、他の因子と共同でカスペース3を活性化しアポトーシスを引き起こす。2つめは、ミトコンドリア内膜の透過性が非特異的に亢進する permeability transition（PT）という現象で、その詳細なメカニズムや生理的意義は不明である。PT はカルシウム依存的に誘導され、膜電位の低下を伴う。また、サイクロスポリンAによって抑制される。PT はPT pore という蛋白複合体からなるチャネルが開くことにより誘導されるとされ、その構成要素として外膜側に VDAC（voltage-dependent anion channel）、内膜側に ANT（adenin nucleotide translocator）などが想定されている。

一方、アポトーシス調節蛋白である Bcl-2 ファミリーの中でアポトーシス促進性の Bax は、細胞にアポトーシスの刺激を加えると細胞質からミトコンドリアへ移動する。また、細胞に Bax を過剰発現させると他の刺激がなくともアポトーシスが誘導される。

従来、ミトコンドリアより下流におけるアポトーシスシグナル伝達は比較的よく研究されているのに対し、ミトコンドリア上流に関しては不明な点が多い。本研究ではミトコンドリアにアポトーシスのシグナルを伝達する因子として Bax に着目し、Bax のミトコンドリアにおける作用を検討した。

【方法】

1．ラット肝より単離したミトコンドリアにリコンビナント Bax（rBax）とその類似蛋白 Bak（rBak）、アポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリーの Bcl-x_L（rBclx_L）および種々の因子を加え培養し、PT の指標としてミトコンドリアの膜電位（$\Delta\Psi$）や腫脹の程度を測定した。また、培養上清中に放出されたシトクロムcの量を Western blot 法にて評価した。

2．Bax および Bax と VDAC との結合を免疫沈降法を用いて検討した。

【成績】

1．Bax、Bak のミトコンドリアに対する影響

rBax あるいは rBak を単離ミトコンドリアに加えると膜電位の低下やミトコンドリア腫脹を惹起した。これらの現象はサイクロスポリンAやカルシウムキレーターによって抑制された。即ち、rBax、rBak は単離ミトコンドリア

においてPTを誘導することが判明した。

また、rBaxあるいはrBakは単離ミトコンドリアにおいてシトクロムc放出を誘導した。

2．Bax、Bakのミトコンドリアに対する機能ドメイン

アポトーシス促進性Bcl-2ファミリーのアポトーシス誘導能に重要なドメインとして知られるBH（Bcl-2 homology）3ドメインを欠いたrBaxはPTおよびシトクロムc放出誘導能が減弱していた。逆に、Bax、Bak由来のBH3ペプチドは単離ミトコンドリアにおいてPTおよびシトクロムcの放出を誘導した。

3．Bax、BakによるPTおよびシトクロムc放出誘導に対するBcx$_L$、Bcl-2の影響

rBcl-x$_L$をrBaxあるいはrBakに共存させると単離ミトコンドリアにおけるPTおよびシトクロムc放出が抑制された。また、肝臓にBcl-2を高発現したtransgenic mouseの肝から単離したミトコンドリアにrBax、rBakを加えるとnon-transgenic mouse由来のミトコンドリアに比べ、PTおよびシトクロムc放出が抑制された。

4．Bax、Bakに誘導されるPTとシトクロムc放出の関係

単離ミトコンドリアにおいてrBax、rBakによるシトクロムc放出はPT阻害剤存在下で抑制された。

5．Bax、BakとPT poreの結合

PT pore構成要素のVDACはBax、Bakと共沈した。

【総括】

1．Bax、Bakは直接ミトコンドリアに作用することによってPTおよびシトクロムc放出を誘導した。また、これらの作用にBH3ドメインが必須であった。

2．Bcl-x$_L$、Bcl-2は単離ミトコンドリアにおいてBax、BakによるPTおよびシトクロムc放出を抑制した。

3．Bax、Bakによるシトクロムc放出はPTに依存していた。

4．Bax、BakはVDACと結合した。

以上の結果より、Bax、BakはPT poreに直接作用することによりPTを誘導し、それに伴いシトクロムcの放出を引き起こしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスにおいてミトコンドリアは非常に重要な役割を果たしている。アポトーシス調節蛋白質であるBcl-2ファミリーのうちアポトーシス抑制性のBcl-2やBcl-x$_L$がミトコンドリアに存在し、また、アポトーシス促進性のBaxはアポトーシスの刺激が細胞に入ると細胞質からミトコンドリアに移動する。また、ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わると、ミトコンドリアよりシトクロムcが細胞質に放出され、細胞死の実行蛋白質であるカスペースを活性化する。さらに、ミトコンドリアでは内膜の透過性亢進というPermeability transition（PT）という現象が細胞死に先だって惹起される。アポトーシスのシグナル伝達においては、カスペースカスケードを中心にミトコンドリアより下流に関しては比較的よく知られているのに対し、ミトコンドリアを含めその上流に関しては不明な点が多い。

本研究は、ミトコンドリアに細胞死のシグナルを直接伝える因子としてBaxに注目し、ミトコンドリアにおけるBaxの機能をシトクロムc放出やPTを指標として解析したものである。ラットより単離したミトコンドリアにBaxおよびその類似蛋白質であるBakを加えるとPTおよびシトクロムc放出が引き起こされた。これらの現象はBH3ドメインに依存しており、Bcl－2やBcl－x$_L$により抑制された。Bax、Bak誘導性のシトクロムc放出はPT阻害剤によって抑制され、Bax、BakがPT依存的にシトクロムcのミトコンドリアからの放出を引き起こしていると考えられた。そこで、Bax、Bakの作用部位としてPT pore複合体に着目し、ミトコンドリア外膜側の構成タンパク質とされるVDACとBax、Bakとの結合を免疫沈降法で示した。これは、Bax、BakとPT pore複合体の相互作用がミトコンドリアからのシトクロムc放出を引き起こすことを示唆しており、アポトーシスにおけるミトコンドリアからのシトクロムc放出のメカニズム解明に寄与するものであり、学位に値すると考えられる。