

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	なり 成 田 まさ し 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 3 0 4 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パー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ン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良好に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 BH 3 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 Bcl-x_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 BH 3 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ベースを活性化する。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、カスベ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 BH 3 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、学位に値すると思われる。