

Title	Apoptotic Cytosol Facilitates Bax Translocation to Mitochondria That Involves Cytosolic Factor Regulated by Bcl-2
Author(s)	野村, 昌哉
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42900">https://hdl.handle.net/11094/42900</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	野 村 昌 哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 0 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 12 月 11 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Apoptotic Cytosol Facilitates Bax Translocation to Mitochondria That Involves Cytosolic Factor Regulated by Bcl-2 (アポトーシス時に誘導される Bax のミトコンドリアへの移動に対する Bcl-2 の調節機構に関する研究。)
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〕

アポトーシスのシグナル伝達にミトコンドリアは重要な役割を果たしている。細胞死のシグナルがミトコンドリアに入ると、ミトコンドリア膜透過性が亢進し、シトクロム c が細胞質中に放出され、その結果細胞死の実行蛋白であるカスベースが活性化される。アポトーシス調節蛋白である Bcl-2 ファミリーの内、Bcl-2 はミトコンドリアに存在して、主にミトコンドリア膜透過性の保護を介してアポトーシスを抑制している。一方、Bax は通常細胞質に存在して、刺激が入るとミトコンドリアに移動し、直接ミトコンドリアの膜透過性を亢進させアポトーシスを誘導する。

本研究では、Bcl-2 がミトコンドリアに対する直接的な保護作用のみならず、その上流でも機能している可能性を考慮し、アポトーシス時にみられる Bax のミトコンドリアへの移動に対する影響を検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

#### 1) Bcl-2 過剰発現細胞における Bax のミトコンドリアへの移動の抑制

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞にヒト Bcl-2 を恒常的に高発現させた細胞 (HeLa-Bcl-2) と、対照細胞 (HeLa-V) を作成した。これらの細胞に抗癌剤エトポシドを添加した後、Bax の細胞内局在の変化を検討した。その結果、HeLa-V ではエトポシド投与 6 時間後より Bax が細胞質分画からミトコンドリア分画へ移動したのに対し、HeLa-Bcl-2 ではこの変化は認められなかった。一方、エトポシドを添加した HeLa-V で認められる Bax の移動は、カスベース阻害剤 (zVAD-fmk) により抑制されなかった。これらの結果より、Bcl-2 は Bax のミトコンドリアへの移動を抑制する機能を有していることが明らかとなった。

Bcl-2 が Bax の移動を抑制する機構として次の可能性が考えられた。即ち、(1) ミトコンドリアの Bcl-2 が Bax の移動を直接妨げている。(2) Bcl-2 が何らかの細胞質因子を介して Bax の移動を妨げている。これらを明らかにするために、単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* の実験系を用いて検討した。

#### 2) ミトコンドリア膜上での Bcl-2 の直接抑制の検討

Bcl-2 トランスジェニックマウスまたは対照マウスの肝より単離したミトコンドリアとリコンビナント Bax 蛋白を 15 分間反応させ、ミトコンドリアに結合する Bax の量を immunoblot 法で検討したところ、両者間に有意な差は認められなかった。

#### 3) 細胞質因子を介した Bcl-2 の間接的抑制の検討

HeLa-V および HeLa-Bcl-2 を無処理またはエトポシド処理し、それぞれの細胞質を調製した。まず、調製した細

胞質に Bcl-2 蛋白が含まれているか否かを immunoblot 法により検討したところ、すべて検出感度以下であった。次に、各細胞質をラットの肝より単離したミトコンドリアと3分間反応させ、ミトコンドリアに結合する細胞質中の内因性 Bax の量をデンストメトリーで測定した。その結果、無処理の HeLa-V 細胞質中の Bax の9%がミトコンドリアに移動したのに対し、エトポシド処理した HeLa-V 細胞質では37%の Bax がミトコンドリアに移動した。一方、エトポシド処理した HeLa-Bcl-2 細胞質では11%の Bax がミトコンドリアに移動したのみであった。外因性のリコンビナント Bax 蛋白を用いた場合も同様の結果であった。これらの結果は、Bcl-2 が細胞質因子を介して Bax の移動を抑制していることを示している。

#### 4) 単離ミトコンドリアからのシトクロム c の漏出における Bcl-2 の関与

最後に、Bcl-2 による Bax の移動の抑制がアポトーシスに関与しているか否かを検討した。エトポシド処理後の HeLa-V および HeLa-Bcl-2 由来の細胞質から内因性 Bax を抗 Bax 抗体を用いた免疫沈降により除去し、ラット肝ミトコンドリアと30分間反応させ、ミトコンドリアから放出されるシトクロム c の量を測定した。Bax 除去後の HeLa-V 細胞質では除去前に比し放出されるシトクロム c は有意に減少していた。HeLa-Bcl-2 細胞質ではこの現象は観察されなかった。従って、Bcl-2 による Bax の移動の抑制は、Bcl-2 によるアポトーシス抑制機構のひとつと考えられた。

#### 〔総括〕

- 1) アポトーシス時に誘導される Bax のミトコンドリアへの移動に対する Bcl-2 の影響について、培養細胞と単離ミトコンドリアを用いて検討した。
- 2) 培養細胞において、エトポシドによるアポトーシスの初期にみられる Bax の細胞質からミトコンドリアへの移動は、Bcl-2 の過剰発現により抑制された。
- 3) 単離ミトコンドリアを用いた実験より、Bcl-2 はミトコンドリア上で Bax とミトコンドリアとの結合を直接抑制しているのではなく、細胞質因子を介して Bax の移動を抑制していると考えられた。
- 4) 以上より、Bcl-2 はアポトーシス初期の Bax のミトコンドリアへの移動を細胞質因子を介して抑制していることが明らかとなり、ミトコンドリアの上流でも抗アポトーシス機能を発揮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重要な役割を果たしている。アポトーシスのシグナルがミトコンドリアに入ると、ミトコンドリアよりシトクロム c が細胞質に放出され、アポトーシス実行蛋白質であるカスプースが活性化され、アポトーシスが誘導される。アポトーシス調節蛋白質である Bcl-2 ファミリーのうち、Bcl-2 はミトコンドリアに存在し、主にミトコンドリアの膜透過性を保護することによりアポトーシスを抑制することが知られている。一方、アポトーシス促進性の Bax は通常細胞質に存在し、刺激に応じて細胞質からミトコンドリアに移動しミトコンドリア障害を引き起こすとされている。アポトーシスのシグナル伝達の機構については、ミトコンドリアおよびその下流に関して比較的知られているのに対し、ミトコンドリアの上流に関して不明な点が多い。

本研究は、Bcl-2 がミトコンドリアに対する直接的な保護作用のみならず、その上流でも機能しているか否かを、アポトーシス初期にみられる Bax のミトコンドリアへの移動に注目し解析したものである。細胞レベルにおいて、アポトーシス時の Bax の細胞質からミトコンドリアへの移動は Bcl-2 の高発現により抑制された。この現象のメカニズムを明らかにするため、単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* の系で、Bax のミトコンドリアへの結合は、Bcl-2 トランスジェニックマウスの肝ミトコンドリアでは抑制されなかったが、Bcl-2 高発現細胞由来の細胞質分画により抑制された。これらの結果は、ミトコンドリア上の Bcl-2 がアポトーシス初期の Bax のミトコンドリアへの移動を細胞質因子を介して間接的に抑制し、ミトコンドリアの上流でも抗アポトーシス機能を発揮していることを示唆した。以上より、本研究は Bcl-2 によるアポトーシス抑制機構の解明に寄与するものであり、十分学位に値すると思われる。