The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by a pro-apoptotic BH3-only protein Bim
Author(s)	杉山, 智康
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43981
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

【47】

氏　　名	杉山智康（すぎやま ともやす）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17617　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by a pro-apoptotic BH3-only protein Bim （BH3-only 蛋白質 Bim による voltage-dependent anion channel の活性化）
論文審査委員	（主査） 教　授　辻本　賀英 （副査） 教　授　長田　重一　　教　授　米田　悦啓

論文内容の要旨

［目的］

アポトーシスは厳格に調節された細胞の自殺機構であり、個体の発生や恒常性の維持に必須である。アポトーシス誘導刺激は多くの場合ミトコンドリアに集約され、その膜透過性を亢進させる。その結果、チトクロム c や Smac/DIABLO などの apoptogenic な因子が細胞質に漏出し、その結果 Caspase が活性化されアポトーシスが誘導される。このミトコンドリアの膜透過性を制御しているのが Bcl-2 ファミリー蛋白質である。我々はこれまでに Bax/Bak がミトコンドリア外膜上の VDAC（voltage-dependent anion channel）を介してチトクロム c の漏出を引き起こし、一方 BH3-only 蛋白質 Bid/Bik は VDAC とは独立に機能する事を報告してきた。しかしながら、BH3-only 蛋白質の標的分子については不明であった。そこで本研究では BH3-only 蛋白質である Bim に着目し、その機能解析および標的分子の同定を行った。

［方法ならびに成績］

ラット肝臓より単離したミトコンドリアに対する Bim の効果を調べたところ、Bim は膜電位の低下とチトクロム c の漏出を誘導し、一方 tBid はチトクロム c の漏出のみを誘導した。これら Bim の効果はサイクロスポリン A などの PT（permeability transition）阻害剤および抗 VDAC 阻害抗体により抑制された。さらに抗 VDAC 阻害抗体の細胞へのマイクロインジェクションは、Bim による細胞死を有意に抑制したが、tBid による細胞死には効果を示さなかった。また、tBid によるチトクロム c の漏出に Bak が必要であることが報告されているが、*bak* ノックアウトマウス肝臓より単離したミトコンドリアを用いた系で、Bim は Bak 依存的および非依存的機構でチトクロム c の漏出を誘導した。また Bim は Bcl-2 ファミリーの存在しない出芽酵母ミトコンドリアからもチトクロム c の漏出を引き起こした。さらに出芽酵母変異株を用いた実験から、酵母ミトコンドリアにおける Bim によるチトクロム c の漏出は、出芽酵母 VDAC に依存していることが明らかになった。これらの結果から、VDAC が Bim の標的分子である可能性が示唆された。そこで、Bim と VDAC の結合を調べたところ、pull-down assay で Bim は BH3 ドメイン依存的に VDAC に直接結合する事が明らかとなった。また細胞内での Bim-VDAC の結合を免疫沈降で調べたところ、細胞死の刺激

に応じてBimとVDACの結合は顕著に増強された。次にBimによるVDAC活性への影響を再構成リポソームの系で調べたところ、BimはVDAC活性を上昇させた。また赤血球膜表面にはVDACが存在するが、Bimはこの膜上のVDACを介して溶血を引き起こした。一方tBidを用いた実験においては、酵母ミトコンドリアにおけるチトクロムcの漏出、VDACとの結合、VDAC活性の上昇、溶血のいずれも観察されなかった。

［総括］

本研究によって、BH3-only蛋白質BimはVDACと直接結合し、その活性を上昇させる事、出芽酵母ミトコンドリアにおいて、BimはVDAC依存的にミトコンドリアの変化を誘導することが明らかとなった。また、抗VDAC阻害抗体はBimによるミトコンドリアの変化、細胞死、溶血を抑制することを明らかにした。これらの結果から、Bimによるミトコンドリア膜透過性亢進および細胞死にはVDACが必須である事が示された。またBH3-only蛋白質にはVDAC依存的（Bim）、非依存的（Bid/Bik）に機能する２つのサブグループが存在することが考えられた。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスは不要な細胞を除去する機構であり、多くの場合アポトーシス誘導刺激はミトコンドリアに集約される。このミトコンドリアにおけるアポトーシスシグナル伝達に重要な役割を果たしているのがBcl-2ファミリーである。しかしながら、Bcl-2ファミリーの分子機構は明らかにされていなかった。本研究では、Bcl-2ファミリーの１つのサブグループ、BH3-only proteinに分類されるBimに注目し、その機能解析および標的分子の同定を行った。

その結果、１）単離ミトコンドリにおけるBimによる膜電位の低下、チトクロムcの漏出、およびBimによる細胞死はVDAC（Voltage-dependent anion channel）阻害抗体により抑制される、２）BimはVDAC依存的に出芽酵母ミトコンドリアよりチトクロムcの漏出を誘導する、３）BimはVDACと直接結合し、その活性を上昇させる、４）BimはVDACを介して赤血球の溶血を引き起こすことを明らかにした。以上の結果より、BimはVDAC活性を上昇させる事によりミトコンドリア外膜の膜透過性を亢進させ、その結果チトクロムcの漏出を引き起こし細胞死を誘導しているものと考えられる。

本研究の成果は、BH3-only proteinの標的分子の解析を通して、アポトーシスシグナル伝達機構の解析に重要な貢献をしたものであり、学位の授与に値すると考えられる。