

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590260

研究課題名(和文)ミトコンドリアにおけるAIFの生理機能および細胞死誘導の分子機構の解析

研究課題名(英文)Induction mechanism of AIF-related cell death

研究代表者

小坂 博昭(Kosaka, Hiroaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60158897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：AIFの細胞死誘導機構に関して細胞死誘導の引き金となる膜からの解離機構について理解するため大腸菌発現系を構築し、大腸菌膜との結合様式について詳しく解析した。その結果、AIFは低イオン強度下では膜に結合しているが、高イオン強度下では膜から解離することからのAIFの膜への結合はイオン結合に依存していることが示唆された。またAIFの表面電荷(正電荷)が消えるアルカリ条件下では膜への結合能が顕著に低下することが示されたことから、AIFは膜貫通タンパク質ではなく自身の塩基性アミノ酸の正電荷と膜表面のリン脂質の負電荷によるイオン結合を介して膜表面に結合する膜表在性タンパク質であることが予想された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate exact membrane-binding manner of AIF, we contracted recombinant *E. coli* strains which overexpressed mouse AIFs, mitochondria-type AIF (delta 1-53) or cleaved-type AIF (delta 1-102). We found that more than 80% of mitochondria-type AIF was associated to the membrane when the ionic strength (I) of preparation buffer was the same as a physiological conditions (I = 150 mM). While, at high conditions (I = 300 mM), most enzyme (95%) was dissociated from the membrane. It is noteworthy that cleaved-type AIF partly associated to the membrane (about 50%) at low I, and was also dissociated by increasing I. These results suggest that the N-terminal region (residues 67-85) of AIF is involved in the membrane-binding but is not absolutely necessary and the binding manner of AIF to the membrane may be an ion bond.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：細胞死 ミトコンドリア カスパーゼ非依存性細胞死 膜結合様式 分子機序 AIF

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死は、基本的な生命現象に重要な役割を果たしているだけでなく、多くの疾患の発症に深く関わっていることが明らかとなってきた。このプログラム細胞死を分子レベルで解明する研究がこの数年間に精力的に進められ、特にカスパーゼ依存的な経路において細胞死を司る分子およびそれらの分子の制御機構が解明されてきた。この一連の研究の中で、ヒト子宮頸癌細胞株の単離核をアポトーシス様へと変化させる活性を持つタンパク質として Apoptosis Inducing Factor (AIF) が発見された (*Nature*, 1999, **397**, 441-446)。AIF は細胞死の際に、カスパーゼを活性化するチトクロム *c* と同じくミトコンドリアから放出され、核に移行して DNA の断片化に関与することが明らかとなっている (*FEBS lett.*, 2000, **476**, 118-123)。しかし、AIF が原因で引き起こされる細胞死は、カスパーゼ阻害剤の添加によって回避できないため、AIF はカスパーゼ非依存的に細胞死を誘導すると考えられている。

AIF に関する研究はその発見の経緯から細胞死に関するものがほとんどであるが、その名称とは異なり AIF の N 末端部分は呼吸鎖電子伝達系で機能する NADH 脱水素酵素 (NDH-2) と非常に相同性が高く、単離された AIF は弱いながらも NAD(P)H 酸化活性を有していることから (*J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 16391-16398) AIF がミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系に直接関与している可能性も示唆されている。しかし、AIF のミトコンドリアにおける機能については未だ不明な点が多く、さらに膜タンパク質である AIF が膜から離れミトコンドリアから放出される際の分子機構については研究開始当初ほとんど明らかとなっていなかった。

AIF はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の活性維持に関与していることが予想されており、また、複合体 I の機能不全による活性

酸素の生成がカスパーゼ非依存的細胞死を誘導することから (*J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 24146-24156)、ミトコンドリアにおける AIF の機能の切り替えが、細胞死の誘導機構に深くかかわっているのではないかと予想し、AIF の生理機能ならびに細胞死誘導機構の研究を始めた。

2. 研究の目的

プログラム細胞死の制御機構はカスパーゼ依存的な経路において集中的に解析されてきたが、ミトコンドリア構成成分である AIF が関与するカスパーゼ非依存的経路の制御機構については未だ不明な点が多い。特に本研究では、ミトコンドリアにおける AIF の生理的な機能を調べるとともに、カスパーゼ非依存的に誘導される細胞死がどのような機序で制御され得るかを明らかにするため、細胞死の引き金となる「AIF がミトコンドリアから放出される機構」を分子レベルで解明することを目的とした。

具体的には、カスパーゼ非依存的細胞死の制御機序の解明を目標とし、ミトコンドリアにおける AIF の本来の機能 (呼吸活性の有無や他の呼吸鎖酵素に対する影響) を AIF が発現しているミトコンドリアを用いて生化学的手法により解析する。さらに、大腸菌発現を用いて AIF のミトコンドリアからの放出の機構を分子レベルで解明する。これらの研究で得られる結果から、細胞死の誘導に AIF がどのような分子機構で関与しているかを考察することを目的とした。

3. 研究の方法

ミトコンドリアにおける AIF の生理的な機能の解析に関しては、哺乳類培養細胞からミトコンドリアを単離し解析に用いることが困難であったため、マウス由来 AIF の酵母発現系を構築し、AIF 欠損酵母および野生型酵母にマウス由来の AIF を発現させた際の生

育への影響がどうなるのかについて検討した。

AIF のミトコンドリア膜からの解離に関して、まずは AIF が膜とどのような結合をしているかに注目して解析を行った。これまでに報告されてきた AIF の膜結合様式として AIF は、N 末端にミトコンドリア移行配列 (1-53 残基) と膜貫通ドメインを含む配列 (54-101 残基) を有し、プロテアーゼにより 101 残基目が切断され細胞死誘導型 AIF (AIF_{sol}, 102-612 残基) として膜から解離すると考えられてきた。しかしながら、膜貫通ドメインを有するミトコンドリア型 AIF (AIF_{mit}, 54-612 残基) が細胞質中に放出されるという報告もあることから、我々はマウス由来 AIF (AIF_{mit} または AIF_{sol}) を大腸菌に発現させ、イオン強度と pH を変化させた際の大腸菌膜との結合様式についてウェスタンブロット法を用いて詳細に解析した。

4. 研究成果

AIF のミトコンドリアにおける生理機能に関しては、出芽酵母を用いて内在性 AIF および外来性 AIF (マウス由来) の生育に対する影響に注目して解析してきた。内在性 AIF を欠損させた株では野生株に比べ生育速度が若干抑制されるが、欠損株に内在性もしくは外来性 AIF を遺伝子導入することで生育速度が野生株と同じレベルに回復した。このことは AIF がエネルギー生成系もしくは生合成経路への炭素源の供給に何らかの影響を与えていることを示唆しているが、AIF を発現誘導した培地条件では細胞内のミトコンドリアが少ないため電子伝達系への影響を直接観察することは出来なかった。

次に我々はマウス由来 AIF (AIF_{mit} または AIF_{sol}) を大腸菌に発現させ、イオン強度と pH を変化させた際の大腸菌膜との結合様式についてウェスタンブロット法を用いて解析した。菌体を懸濁・破碎する際の緩衝液

が低イオン強度 ($I = 8 \text{ mM}$) の場合、AIF_{mit} および AIF_{sol} とともに膜に結合していた。一方、高イオン強度下 ($I = 300 \text{ mM}$) では両酵素とも可溶性画分に移行するが、浸透圧の影響はほとんど受けないことが示された。この結果から、AIF の膜への結合は膜貫通ドメインに依存せず、イオン結合に依存していることが示唆された。事実、AIF の結晶構造において AIF の表面電荷は非常に正電荷が多いことから、次に pH を変化させた際の膜への結合能を調べたところ、正電荷が消えるアルカリ条件下では膜への結合能が顕著に低下することが示された。これらの結果から、AIF は膜貫通タンパク質ではなく自身の塩基性アミノ酸の正電荷と膜表面のリン脂質の負電荷によるイオン結合を介して膜表面に結合する膜表面性タンパク質であることが予想された。

さらに AIF_{mit} および AIF_{sol} のイオン強度変化に対する膜結合への影響を詳しく調べたところ、AIF_{mit} は自身が局在するミトコンドリア膜間腔のイオン強度 ($I = 100-150 \text{ mM}$) において、ほとんど膜に結合しているが、同イオン強度下において AIF_{sol} はほとんどが膜から解離した。別のグループの報告では AIF_{mit} および AIF_{sol} の配列の間 (54-101 残基) に存在する膜貫通ドメインによって AIF_{mit} は膜に結合しており、プロテアーゼにより 101 残基目が切断されることで AIF_{sol} が膜から解離することが予想されているが、我々の手で得られた結果からは、AIF の膜への結合は上述のような膜貫通ドメインに依存したものではないが、同じくプロテアーゼによる C 末端領域の切断が AIF_{sol} の膜からの解離に重要であることを示している。

しかしながら、細胞死の際に切断されていない AIF_{mit} がミトコンドリアから放出されているという報告もあることから、今後この大腸菌発現系を用いたプロテアーゼによる切断以外の AIF の膜からの解離機構の

解析が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(小坂 博昭)

研究者番号：60158897

(2)研究分担者

(山下 哲生)

研究者番号：80444727

(3)連携研究者

()