

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657084

研究課題名（和文）ミトコンドリアにおけるアポトーシス孔開閉機構の動的解析

研究課題名（英文）Structural analysis of mitochondrial apoptotic pore

研究代表者

清水 重臣（SHIMIZU SHIGEOMI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70271020

研究成果の概要（和文）：アポトーシスが実行される為には、ミトコンドリアの膜透過性の亢進が不可欠の現象である。しかしながら、その詳細は明らかにされていない。本研究では、超微形態学や蛍光イメージングを駆使して、膜透過性亢進に関わる分子構造を解き明かすことを目的とした。その結果、膜透過性が亢進する際には、クリステの融合や開裂、外膜のブループ様構造の出現が観察された。また、Bak（あるいは Bax）分子が巨大なオリゴマーを形成することを見出した。これらの知見は、膜透過性亢進機構の分子実態を明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of apoptotic mitochondrial permeability increase has not been fully elucidated yet. We aimed to analyze this structure using electron and fluorescence microscopes. In this research, we found the occurrence of cristae fusion and opening, outer membrane blebbing, and Bak oligomerization during apoptosis. These findings unveil structural mechanism of apoptotic mitochondrial changes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

細胞死の研究は、様々な生命現象を制御する細胞機能の一つとして積極的に研究が進められ、分子カスケードの解明が進んできた。そして多くの研究者の手により、ミトコンドリアにはアポトーシスを決定するアポトーシス孔が存在し、その開閉が細胞死の on/off のスイッチとなっている事が明らかとなっている。

このアポトーシス孔の開閉機構の解析は、

生物学的に極めて重要であり、多くの研究者が長年にわたって解析に取り組んできたが、その実態はベールに包まれている。

2. 研究の目的

電子顕微鏡や超解像度顕微鏡等を駆使する事により、細胞死の際にミトコンドリア膜に形成されるアポトーシス孔を捕捉し、細胞の生死決定機構の動的実態を明らかにする

ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)単離ミトコンドリアの膜透過性変化をリアルタイムイメージングし、アポトーシスを観察した。

ミトコンドリア膜上に一過性に形成されるアポトーシス孔の開口を、単離ミトコンドリアをカバーガラス上に固着化し、その形態(ノマルスキー画像)と膜透過性変化(アポトーシス孔の開閉)をリアルタイムで観察した。

アポトーシス孔を特異的に開口させる刺激としてBH3ペプチドを用い、BH3の点突然変異ペプチドを陰性コントロールとした。

(2)電子顕微鏡解析を用いて、アポトーシス時、ならびにネクローシス時の単離ミトコンドリアの形態を観察した。

アポトーシスの誘導はBH3ペプチドを用いて、ネクローシスの誘導はカルシウムイオンを投与することによって行なった。これらの薬剤投与後に、経時的にミトコンドリアの形態変化を、化学固定法と急速凍結切片法にて観察した。

(3)量子ドットを用いて、アポトーシス実行に関わる蛋白質Bakの局在変化を観察した。

Bak蛋白質はアポトーシス実行時に、多量体を形成する。そこで、単量体を認識する抗Bak抗体と多量体を認識する抗Bak抗体に各々異なる量子ドットを固着し、電子顕微鏡にて観察した。

(4)アポトーシス孔の制御化合物の同定と作用点解析

約2万4千種類の化合物ライブラリーの中から、ミトコンドリアのアポトーシス孔を強く制御できる低分子化合物を探索し、細胞レベルでの影響を観察した、また、標的分子の同定を試みた。さらに、新しいアポトーシス孔制御分子を同定する為に、酵母の遺伝学を用いる系を開発した。

(5)Bcl-2ファミリー分子に依存しないアポトーシス機構の発見

アポトーシスの実行にはBaxやBakなどのBcl-2ファミリー蛋白質が必要と考えられて来たが、上記の研究を遂行する過程で、

Bax/Bakに依存しないアポトーシス経路を発見した。

4. 研究成果

(1)単離ミトコンドリアの膜透過性変化をリアルタイムイメージングし、アポトーシスを観察した。

単離ミトコンドリアを観察したところ、アポトーシスが実行される時に、ミトコンドリア外膜の変形を伴う事を見出した。

(2)電子顕微鏡解析を用いて、アポトーシス時、ならびにネクローシス時の単離ミトコンドリアの形態を観察した。

ネクローシス刺激が加えられたミトコンドリアでは、(1)外膜と内膜の間の膜間スペースやクリステの膨潤、(2)ミトコンドリアの破裂、(3)外膜の破壊、が観察された。

一方、BH3ペプチドによってアポトーシス刺激が加えられたミトコンドリアでは、(1)外膜の膨潤に引き続く膜間腔の開裂、(2)ミトコンドリア外膜にブレブ様の構造物の形成を観察する事ができた。これらの変化は、アポトーシス活性を失った変異型BH3ペプチドの投与や、BH3の標的分子であるBakを欠損させたマウス由来のミトコンドリアでは観察されなかった。即ち、これらのミトコンドリア膜の変化は、アポトーシス時のミトコンドリアの膜透過装置そのものであると考えられた。

(3)量子ドットを用いて、アポトーシス実行に関わる蛋白質Bakの局在変化を観察した。

量子ドットを電子顕微鏡によって充分に捕捉することができなかった。この研究の為に、超解像度顕微鏡技術の応用が望ましい事が判明した。

(4)アポトーシス孔の制御化合物の同定と作用点解析

約2万4千種類の化合物ライブラリーの中から、アポトーシス孔を強く制御できる低分子化合物を5種類同定した。このうち、3種類は、細胞に投与したときにアポトーシスを抑制できる事が判明した。これらの化合物の標的分子を探索中であるが、未だ同定には至っていない。

酵母細胞にBax分子を過剰発現することにより、酵母ミトコンドリア上で膜透過性亢進現象を起こさせる事に成功した。さらに、こ

の反応を抑制できる遺伝子の同定を行なった。その結果、ミトコンドリアの外膜に局在する新規膜蛋白質の同定に成功した。この分子は、膜透過性亢進装置の形成に関わっているものと思われた。

(5) Bcl-2 ファミリー分子に依存しないアポトーシス機構の発見

従来知られているアポトーシスを誘導する膜透過装置の他に、新たな膜透過亢進装置が存在する事を見出した。即ち、Bax や Bak を用いずに外膜の膜透過性を亢進させるアポトーシス誘導性の装置である。この装置を Bax/Bak 依存的膜透過装置と比較することによって、アポトーシスを誘導するコア分子の同定が可能になる。

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 12 件)

- 1、I. Nakase, S. Okumura, S. Katayama, H. Hirose, S. Pujals, H. Yamaguchi, S. Arakawa, S. Shimizu, S. Futaki. Transformation of an antimicrobial peptide into a plasma membrane-permeable, mitochondria-targeted peptide via the substitution of lysine with arginine. **Chemical Commun.** 48:11097-99, 2012
- 2、Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, A. Miyajima. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. **Curr. Biol.** 22:1166-75, 2012
- 3、M. Fukamatsu, M. Ogawa, S. Arakawa, H. Ashida, M. Suzuki, M. Furuse, K. Nakayama, S. Shimizu, M. Kin, H. Mimuro, C. Sasakawa. Shigella targets epithelial tricellular junctions to spread between cells via a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway. **Cell Host Microbe.** 11:325-336, 2012
- 4、A. Konishi, S. Arakawa, Z. Yue, S. Shimizu. Involvement of Beclin 1 in the engulfment of apoptotic cells. **J. Biol. Chem.** 287: 13919-29, 2012
- 5、Y. Yoshioka, S. Shimizu, T. Ito, M. Taniguchi, M. Nomura, T. Nishida, Y. Sawa. p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor. **J Surg Res.** 174 : 291-297, 2012
- 6、清水重臣 : 生体におけるマイトファジー

の役割 「実験医学」 羊土社 30: 1390-95 2012

- 7、清水重臣 : オートファジー細胞死の分子機構とその生体での役割「実験医学」羊土社 30:550-5 2012
- 8、T. Yamasaki, H. Kawasaki, S. Arakawa, K. Shimizu, S. Shimizu, O. Reiner, H. Okano, S. Nishina, N. Azuma, J.M. Penninger, T. Katada, H Nishina. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. **Journal of Neuroscience.** 31: 16872-16883, 2011
- 9、M. Narita, A.R.J. Young, S. Arakawa, S.A. Samarajiwa, T. Nakashima, S. Yoshida, S.K. Hong, L.S. Berry, S. Reichelt, M. Ferreira, S. Tavaré, K. Inoki, S. Shimizu, M. Narita. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. **Science** 332: 966-970, 2011
- 10、H. Hikita, T. Takehara, T. Kodama, S. Shimizu, M. Shigekawa, A. Hosui, T. Miyagi, T. Tatsumi, H. Ishida, Li W, T. Kanto, N. Hiramatsu, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, N. Hayashi. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology** 54: 240-251, 2011.
- 11、清水重臣 : ミトコンドリアの変化「細胞死解析プロトコール」羊土社 108-118 2011
- 12、清水重臣 : アポトーシスと非アポトーシス細胞死「臨床血液」教育講演号, 2011

[学会発表] (計 16 件)

- ①清水重臣 : 「Maintenance of tissue homeostasis by dying cells and autophagy」第 35 回日本分子生物学会 (2012/12/13)
- ②清水重臣 : 「様々なストレスに対応する為に機能するオートファジー」第 16 回日本統合医療学会 (2012/12/9)
- ③Shimizu S. : "Molecular Mechanisms and Physiological Roles of Atg5/Atg7-independent Macroautophagy" The 6th Symposium on Autophagy (2012/10/30)
- ④清水重臣 : 「Alternative Macroautophagy and Cancer」第 71 回日本癌学会 (2012/9/19)
- ⑤清水重臣 : 「なぜ赤血球にはミトコンドリアがないのか? ~オートファジーの働き~」第 3 回ミトコンドリアと DDS (2012/7/7)
- ⑥清水重臣 : 「放射線によって誘導される様々な細胞死とオートファジー」第 2 回

分子状水素医学シンポジウム
(2012/2/11)

- ⑦ Shimizu S.: “Various Types of Cell Death and Autophagy” 第34回日本分子生物学会年会(2010/12/13-16 横浜)
- ⑧ 清水重臣: 「生体で見られる様々な細胞死とオートファジー」第1回横断的腫瘍フォーラム(2011/12/07)
- ⑨ 清水重臣: 「アポトーシスと非アポトーシス細胞死」第73回日本血液学会(2011/10/14-16)
- ⑩ 清水重臣: 「オートファジーを標的とした難治疾患克服への戦略」金沢大学がん進展制御研究所セミナー(2011/9/27)
- ⑪ 清水重臣: 「様々な疾患を惹起するミトコンドリア細胞死孔の解析」第84回日本生化学会(2011/9/24)
- ⑫ 清水重臣: 「オートファジーと神経変性疾患」「病態に根ざしたALSの新規治療法開発班」平成23年度ワークショップ(2011/9/22)
- ⑬ 清水重臣: 「オートファジーを標的とした難治疾患克服への戦略」新適塾「難病への挑戦」第7回(2011/9/02)
- ⑭ 清水重臣: 「細胞死とオートファジーのクロストーク」日本Cell Death学会(2011/7/29)
- ⑮ 清水重臣: 「細胞死を司るミトコンドリア孔の解析」過渡的複合体シンポジウム(2011/7/21)
- ⑯ Shimizu S.: “Alternative macroautophagy” International Symposium “Parkinson Disease and Mitophagy” (2011 6/11)

[図書] (計2件)

- 1、S. Shimizu, S. Arakawa, Y. Nishida, H. Yamaguchi, T. Yoshida. Mammalian autophagy can occur through an Atg5/Atg7-independent pathway. **AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection.** 印刷中
- 2、清水重臣: アポトーシス調節系 「分子標的薬」日本臨床 70: 125-30 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 「ベンゾチオフェン化合物、該化合物を有効成分とするオルタナティブオートファジー誘導剤及び抗癌剤、並びに抗癌活性を有する化合物をスクリーニングするための方法」

発明者: Shigeomi SHIMIZU, Takamitsu HOSOYA, Michiko MUROHASHI, Suguru YOSHIDA
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学、

出願番号: PCT/JP2013/052947

出願日: 2013/02/07

国内外の別: 国外

名称: 「抗癌活性を有する化合物をスクリーニングするための方法」

発明者: 清水重臣、室橋道子

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

出願番号: 特願2012-026377

出願日: 2012年2月9日

国内外の別: 国内

名称: 「ベンゾチオフェン化合物、並びに該化合物を有効成分とするオルタナティブオートファジー誘導剤及び抗癌剤」

発明者: 清水重臣、細谷孝充、室橋道子、吉田優

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

出願番号: 特願2012-026373

出願日: 2012年2月9日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 重臣 (SHIMIZU SHIGEOMI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号: 70271020