

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790215
 研究課題名（和文） ミトコンドリアと小胞体の Bcl-2 の活性制御が異なるメカニズムの解析
 研究課題名（英文） Analysis on activity regulation of Bcl-2 in mitochondria and ER
 研究代表者
 矢野 正人（YANO MASATO）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：60315299

研究成果の概要：BH3-only タンパク質である Bid はアポトーシス促進因子であり、Bcl-2 はアポトーシス抑制因子である。本研究において、Bid による Bcl-2 の活性制御を調べたところ、小胞体上の Bcl-2 はミトコンドリア上の Bcl-2 に比べて不活性化されやすいことがわかった。また、アポトーシスを誘導する脂質であるセラミドが小胞体で上昇している細胞株においては、Bax（アポトーシス促進因子）や Bcl-2 の量が小胞体で増加していることがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アポトーシス、ミトコンドリア、小胞体、Bcl-2、活性制御、BH3-only タンパク質、構造変化、膜

研究開始当初の背景

アポトーシスシグナル伝達の多くはミトコンドリアを経由し、それらは Bcl-2 ファミリータンパク質によって制御されている。Bcl-2 ファミリータンパク質には、Bax などのアポトーシス促進因子や、Bcl-2 などのアポトーシス抑制因子、さらに、それらの作用を調節する Bid などの BH3-only タンパク質がある。細胞にある種のアポトーシス刺激が入った場合、上流のいくつかのアポトーシス

シグナル伝達経路を経由して、プロテアーゼであるカスパーゼが活性化される。活性化されたカスパーゼは、Bid を部分切断することにより、活性型の truncated-Bid (tBid) を作る。tBid は、サイトゾルの Bax とミトコンドリア外膜上の Bcl-2 の両方を活性化する。tBid の作用により、サイトゾルの Bax は、ミトコンドリア外膜上に移行した後、外膜に組み込まれて 3 回膜貫通型の活性型となり、アポトーシス促進的に作用する。一方、Bcl-2

は、通常時にはミトコンドリア外膜に1回膜貫通型でアンカーされているが、tBidが作用すると、Bcl-2はさらに膜に組み込まれて3回膜貫通型の活性型となり、アポトーシス抑制的に作用する。そして、活性化されたBcl-2は活性型Baxに結合してBaxを不活性化する。よって、活性型Bcl-2の量が活性型Baxの量よりも力価的に多ければ、アポトーシスは抑制される。逆に、活性型Baxの量の方が多ければ、アポトーシスが促進される。仮に、アポトーシスが促進された場合には、活性化Baxによってミトコンドリア外膜に透過孔が形成され、そこからサイトゾルに放出されたシトクロムcが、さらに下流にアポトーシスシグナルを伝達する。このように、ミトコンドリアにおけるBax、Bcl-2、tBidの相互作用と活性化のメカニズムについては、研究開始当時、多くのことが明らかになってきたが、それとともに新たな疑問も生じてきていた。特に、上記の『Bcl-2がミトコンドリア外膜に組み込まれて、1回膜貫通型から3回膜貫通型に構造変化することが、Bcl-2の活性化に必要である』という2006年に発表された知見に関しては、『Bcl-2の膜への組み込みに関与するミトコンドリア外膜の因子は何なのか？ミトコンドリアタンパク質輸送装置が関与しているのか？』などの新たな疑問が生じつつあった。

また、Bcl-2はミトコンドリアだけでなく小胞体にも存在するが、小胞体Bcl-2については、様々な付加的機能を持つことも示唆されており、その役割については当時から議論が展開されていた。ただし、小胞体Bcl-2も基本的にはミトコンドリアBcl-2と同様にアポトーシス抑制的に作用するという点では見解が一致していた。だが、これまでに行なわれてきた小胞体Bcl-2の機能解析は、いずれも細胞レベルでの定性的な解析であった。このため、小胞体Bcl-2がミトコンドリアBcl-2と同程度のアポトーシス抑制活性を持つのか否かを示す結果は報告されておらず、ミトコンドリアBcl-2と小胞体Bcl-2の機能についての定量的解析が望まれていた。

2. 研究の目的

Bcl-2はミトコンドリアおよび小胞体に局在するアポトーシス抑制因子である。Bcl-2は通常1回膜貫通型の構造をしているが、ア

ポトーシス刺激により活性化されると、3回膜貫通型となりアポトーシス抑制的に働くことが2006年に報告された。このことから、Bcl-2の活性化に伴う1回膜貫通型から3回膜貫通型への変化に関わる何らかの因子が存在すると推定された。可能性の1つとして、ミトコンドリアあるいは小胞体に存在する既知のタンパク質輸送装置がそれに関与している可能性が考えられた。タンパク質を膜に組み込む装置としては、ミトコンドリアではTOM複合体やSAM複合体が、小胞体ではSec61複合体などがこれまでに知られていた。もしかすると、これらのタンパク質輸送装置がBcl-2の構造変化に関与し、それによってBcl-2の活性制御が行われているのかもしれないと推測された。もちろん、未知のタンパク質輸送装置が存在し、Bcl-2の膜への組み込みに関与している可能性も考えられた。そこで、本研究においてはBcl-2の活性化に伴う構造変化に関与する因子の同定を第1の目的とした。

また、一方で、当時、本研究実施者らにより、『通常はミトコンドリアBcl-2と小胞体Bcl-2は同程度のアポトーシス抑制活性を持つものに対して、アポトーシス亢進因子であるtBidの存在下では、小胞体Bcl-2はミトコンドリアBcl-2に比べてアポトーシス抑制活性かなり弱くなっている』ことを示唆する結果が得られていた。すなわち、『tBidにより、小胞体Bcl-2はミトコンドリアBcl-2とは異なる活性制御を受ける』ことを示唆する結果が得られていた。そこで、本研究の第2の目的として、tBid等のアポトーシス亢進因子によるBcl-2の活性制御がミトコンドリア上と小胞体上とで異なるメカニズムを詳細に定量的に検討することにした。

3. 研究の方法

(1) Bcl-2の活性が制御される際のBcl-2の構造変化に関与する未知因子の探索

Bcl-2の構造変化に伴う活性制御に関与する未知候補因子の同定を架橋試薬を用いた方法で試みた。具体的には、まず、FLAGタグのついたBcl-2を発現する細胞から、ミトコンドリアおよび小胞体を回収した。次に、これらに対してtBidの添加を行うが、この時、tBidの添加の前後にかけて、さらに架橋試薬も添加し、経時的にサンプルを採取していつ

た。これらを電気泳動で展開して抗 Bcl-2 抗体で検出することにより、Bcl-2 と架橋されるタンパク質の時間変化を調べた。また、ミトコンドリアにおけるタンパク質輸送装置である TOM 複合体や SAM 複合体が Bcl-2 の構造変化に関与する可能性が考えられたため、これらのタンパク質輸送装置と Bcl-2 や tBid、Bax との結合の有無を架橋実験やブルーネイティブ電気泳動法により検討した。

(2) Bcl-2 がミトコンドリア上と小胞体上で異なる活性制御を受けるメカニズムの解析

当時、申請者らは、HeLa 細胞から特定の方法で回収したミトコンドリアは、20 °C では安定であるが、35 °C ではミトコンドリアに付着した Bax が活性化（オリゴマー化とミトコンドリア外膜への組み込み）し、ミトコンドリアからシトクロム c が流出することを見いだしていた（このミトコンドリアは、温度依存的に Bax が活性化されてアポトーシスが進行するミトコンドリアであることから、apoptosis-competent ミトコンドリアと呼んでいる）。また、当時の解析により、この apoptosis-competent ミトコンドリアと Bcl-2 発現細胞から回収したミトコンドリアを共存させると、35 °C に加温しても、apoptosis-competent ミトコンドリアでのアポトーシス進行が抑制されること、同様に、Bcl-2 発現細胞から回収した小胞体を共存させた場合にも、このミトコンドリアでアポトーシス進行が抑制されることがわかっていた。すなわち、ミトコンドリアや小胞体上の Bcl-2 は別のミトコンドリア上のアポトーシス進行を抑制できることが示され、以前から提唱されていた BH3-only タンパク質による Bax と Bcl-2 の制御の存在を裏付ける結果が得られていた。そこで、ミトコンドリア Bcl-2 と小胞体 Bcl-2 への tBid の結合、さらには、ミトコンドリア Bcl-2 と小胞体 Bcl-2 によるアポトーシス抑制効果を定量的に解析することにより、小胞体 Bcl-2 とミトコンドリア Bcl-2 とが BH3-only タンパク質より異なる活性制御を受けるメカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

Bcl-2 を発現しているミトコンドリアもしくは小胞体を apoptosis-competent ミトコンドリアと共存させ、そこに BH3-only タンパ

ク質 tBid を添加した際に流出してくるシトクロム c の量を定量化することにより、ミトコンドリア Bcl-2 と小胞体 Bcl-2 が tBid によりどの程度異なる活性制御を受けるかを定量的に検討したところ、小胞体 Bcl-2 はミトコンドリア Bcl-2 に比べて約 2 ~ 3 倍不活性化されやすいことがわかった（図 1）。また、ミトコンドリア Bcl-2 は小胞体上 Bcl-2 に比べて tBid に結合しやすいことがわかった（図 2）。これら結果は、同じ BH3-only タンパク質により誘導されるアポトーシスシグナル伝達であっても、それがミトコンドリアを経由する場合と、小胞体を経由する場合とは、その効果が大きく異なることを意味しており、この制御システムの存在により、アポトーシスシグナル伝達は非常に複雑に制御されていると考えられた。

また、Bcl-2 の活性制御は、Bcl-2 の構造変化（膜への組み込み）によって制御されるという報告が出されていたことから、それらに関与する因子の同定を試みた。具体的には、ミトコンドリアにおいてタンパク質の膜への組み込みに関与することが知られている SAM 複合体と Bcl-2 との結合の可能性をブルーネイティブゲル電気泳動法で検討したが、アポトーシス刺激の前後において SAM 複合体と Bcl-2 との結合を検出することはできなかった。さらに、様々な架橋試薬を用いて Bcl-2 に結合する新規タンパク質の同定を試みたが、アポトーシス刺激の前後において結合もしくは解離する新規タンパク質を同定することはできなかった。そこで、Bcl-2 の活性制御に伴う構造変化（膜への組み込み）は、タンパク質因子ではなく、膜を構成する脂質因子によって制御されているのではないかと推定し、それを解析するための実験系を構築した。具体的にはスフィンゴミエリン合成酵素（SMS1）ノックアウトマウスの MEF 細胞を用いて実験を行った。ゴルジ体に局在する SMS1 は、細胞内セラミド輸送経路上に位置し、小胞体で合成されたセラミドをスフィンゴミエリンに変換する役割を担っている。よって、SMS1 ノックアウトマウスの MEF 細胞ではセラミドは小胞体やミトコンドリアに多く蓄積すると推定される。実際、アポトーシス促進および抑制因子の各オルガネラ局在量を調べたところ、SMS1 ノックアウトマウスの MEF 細胞では Bcl-2 およびアポトーシス促進

因子 Bax の小胞体局在量が約 2 倍に増大していた。このことから、セラミドは、Bcl-2 や Bax などの小胞体膜への組込みを促進する役割を持ち、小胞体膜上におけるアポトーシス促進と抑制のバランスを制御する役割を持つと推察された。一方で、SMS1 ノックアウトマウスの MEF 細胞のミトコンドリアにおいては、アポトーシス促進因子である Bak の局在量が約 1.5 倍に増大していた。このことから、ミトコンドリアで増加したセラミドは Bak のミトコンドリアへの局在を促進することでアポトーシスを促進する役割を持つと推察された。

図1)ミトコンドリアBcl-2(Bcl2MT)および小胞体Bcl-2(Bcl2MC)を共存させた際のapoptosis-competentミトコンドリアからのシトクロムcの流出量

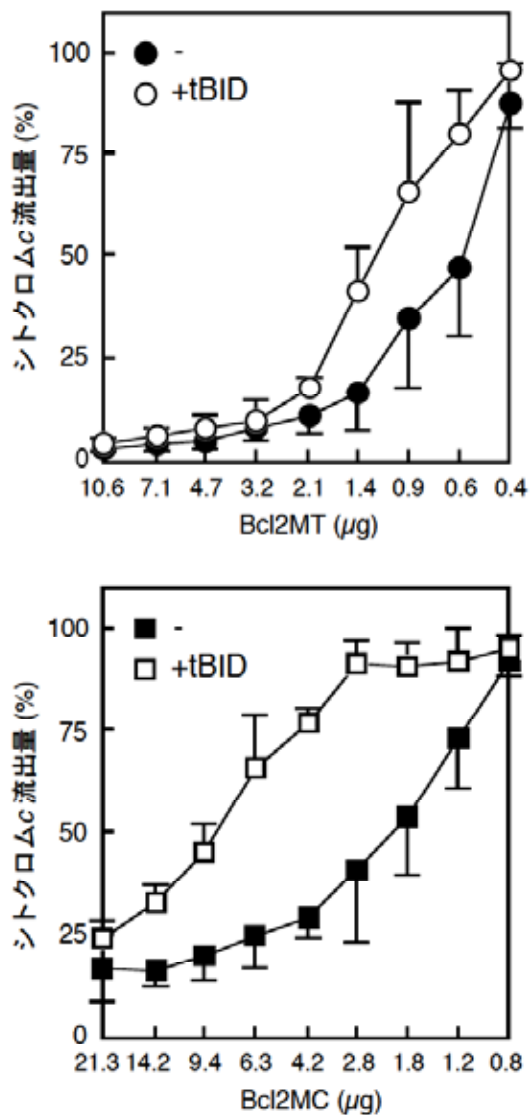
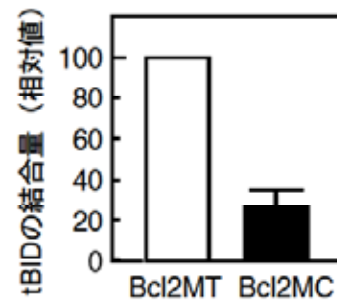


図2)ミトコンドリアBcl-2(Bcl2MT)および小胞体Bcl-2(Bcl2MC)へのtBidの結合量



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2件)

Urano, T., Ito, Y., Akao, M., Sawa, T., Miyata, K., Tabata, M., Morisada, T., Hato, T., Yano, M., Kadomatsu, T., Yasunaga, K., Shibata, R., Murohara, T., Akaike, T., Tanihara, H., Suda, T., Oike, Y. Angiotensin-Related Growth Factor Enhances Blood Flow Via Activation of the ERK1/2-eNOS-NO Pathway in a Mouse Hind-Limb Ischemia Model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28巻, p.827-834, 2008年, 査読あり

Yano, M., Terada, K., Gotoh, T., Mori, M. *In vitro* analysis of Bcl-2 proteins in mitochondria and endoplasmic reticulum: Similarities in anti-apoptotic functions and differences in regulation. *Experimental Cell Research*, 313巻, p.3767-3778, 2007年, 査読あり

[学会発表](計1件)

矢野 正人, 寺田 和豊, 後藤 知己, 森 正敬, BH3-onlyタンパク質によるミトコンドリアおよび小胞体Bcl-2の活性制御, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢野 正人 (YANO MASATO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：60315299

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし