

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

辻本 賀英

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析」

1. 研究実施の概要

我々は、遺伝性の運動神経変性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症の疾患原因遺伝子産物 Smn が、神経細胞死を防ぐ Bcl-2 たんぱくに結合し、その活性を促進する機能を有することを示してきたが、Bcl-2 の持つ細胞死抑制機能の生化学的なメカニズムと Smn によるその機能の増強の分子メカニズムの解明を目指して研究を展開してきた。特に、Bcl-2 はミトコンドリアで機能し、神経細胞死を誘導するファクターであるチトクロム c の細胞質への遊離を抑制することで、細胞死を抑制することを示し、さらにチトクロム c の遊離はミトコンドリア膜上に存在するたんぱく複合体チャネル (permeability transition pore) を介して起こり Bcl-2 はこの permeability transition pore をターゲットとしてチトクロム c の遊離を抑制することを明らかにした。今後、permeability transition pore 内の Bcl-2 機能ターゲットの絞り込みを行うことで、治療のための分子ターゲットの同定が可能と思われる。

2. 研究実施内容

遺伝性の運動神経変性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子 Smn は 1995 年にフランスの Melki 達によりポジショナルクローニング法を用いて単離されたものであるが、その後、遺伝子産物の機能は不明であった。我々はアポトーシス抑制活性を有する Bcl-2 が遺伝子産物の機能解析の一環として、yeast two-hybrid 法を含む種々の方法を用いて Bcl-2 たんぱくに結合する因子の探索を行ってきたが、その一つとして Smn を単離した。脊髄性筋萎縮症では、Smn 機能が欠如することで運動神経が脱落しその結果、筋萎縮が起こること、また Bcl-2 が細胞死を抑制することから、Smn が Bcl-2 に結合しその細胞死抑制機能を増強するというモデルをたて、ヒト細胞株を用いた解析で、そのモデルを証明した。その後、Bcl-2 の細胞死抑制機能の生化学的基盤の解明と Smn-Bcl-2 シナジーの分子基盤の解明を目指し、研究を行ってきた。

Bcl-2 には類似因子が多数知られており、これらは Bcl-2 ファミリーを形成して

いる。このファミリーには、Bcl-2, Bcl-xL のように細胞死抑制機能を有するメンバーと、Bax や Bak で代表される細胞死促進機能を有したメンバーが含まれ、これらはミトコンドリアで機能することによりアポトーシスを制御している。アポトーシス時には、ミトコンドリア膜の透過性が増大し、シトクロム c が遊離され、遊離シトクロム c がアポトーシスの実行を担うたんぱく分解酵素群（カスペースファミリー）を活性化する。Bcl-2 ファミリーたんぱくはこの過程を制御することでアポトーシスをコントロールしていると考えられてきた。この機構を解明するために、単離ミトコンドリアを用いた系を開発し、リコンビナント Bcl-2 ファミリーたんぱくを用いて、これらたんぱくのアポトーシス制御活性を再現することに成功し、Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能解析に大きな技術的な進歩をもたらした。この系を利用することで、シトクロム c の遊離はミトコンドリア膜上に存在するたんぱく複合体チャネル（permeability transition pore）を介して起こることを示した。permeability transition pore は、ミトコンドリアの内膜および外膜たんぱくを含むチャネルであり、その分子構築は必ずしも完全に理解されていないが、外膜チャネルであるVDAC (voltage-dependent anion channel) と内膜チャネルであるANT (adenine nucleotide translocator)を含む。Bcl-2 ファミリーたんぱくはこのpermeability transition pore に結合することを見い出し、Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能ターゲットであるところを明らかにした。これらの結果をもとに、permeability transition pore 内の Bcl-2 ファミリーたんぱくの真の機能ターゲットの絞り込みを行うことが可能であり、その成果は疾患治療のための分子ターゲットの同定を可能にすると同時に、Smn-Bcl-2 シナジーの分子基盤の解明のための有用な材料を提供するものと思われる。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Shigeomi Shimizu, Yutaka Eguchi, Wataru Kamiike, Yoshimitsu Funahashi, Alexandre Mignon, Virginie Lacronique, Hikaru Matsuda, and Yoshihide Tsujimoto, Bcl-2 Prevents Apoptotic Mitochondrial Dysfunction by Regulating Proton Flux., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1998). 95, 1455-1459.
- Shin-ichi Yoshimura, Yoshiko Banno, Shigeru Nakashima, Katsunobu Takenaka, Hideki Sakai, Yasuaki Nishimura, Noboru Sakai, Shigeomi Shimizu, Yutaka Eguchi, Yoshihide Tsujimoto, and Yoshinori Nozawa, Ceramide Formation Leads to Caspase-3 Activation during Hypoxic PC12 Cell Death: Inhibitory effect of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation, J. Biol. Chem. (1998). 273, 6921-6927.
- Hiroki Tanabe, Yutaka Eguchi, Shigeomi Shimizu, Jean-Claude Martinou and

- Yoshihide Tsujimoto, Death-signaling cascade in mouse cerebellar granule neurons, *Eur. J. Neurosci.* (1998). 10, 1403-1411.
- Youichi Saitoh, Yutaka Eguchi, Yasushi Hagiwara, Norio Arita, Yoshihide Tsujimoto, and Toru Hayakawa, Dose-Dependent Doxycycline-Mediated Adrenocorticotrophic Hormone Secretion from Encapsulated Tet-On Proopiomelanocortin Neuro2A Cells in the Subarachnoid Space, *Hum. Gene Therapy*, (1998). 9, 997-1002.
- Kentaro Ozawa, Keisuke Kuwabara, Michio Tamatani, Kohichi Takatsuji, Yoshitane Tsukamoto, Sumiko Kaneda, Hideki Yanagi, David M. Stern, Yutaka Eguchi, Yoshihide Tsujimoto, Satoshi Ogawa, and Masaya Tohyama, 150-kDa Oxygen-regulated Protein (ORP150) Suppress Hypoxia-induced Apoptotic Cell Death, *J. Biol. Chem.* (1999). 274, 6397-6404.
- Yutaka Eguchi, Ani Srinivasan, Kevin J. Tomaselli, Shigeomi Shimizu, and Yoshihide Tsujimoto, ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction., *Cancer Res.* (1999). 59, 2174-2181.