

「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

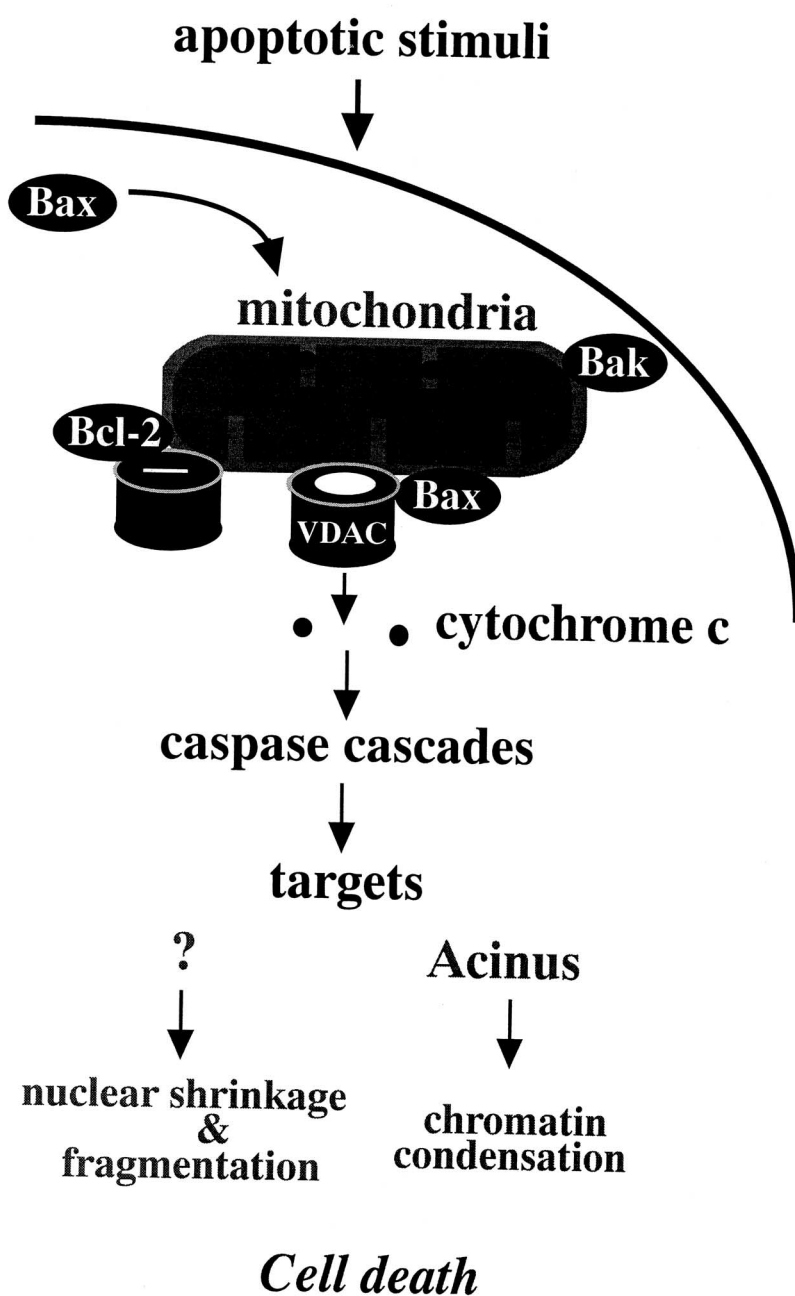
我々は、遺伝性の運動神経変性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症の疾患原因遺伝子産物Smnが、神経細胞死を防ぐBcl-2たんぱくに結合し、その活性を促進する機能を有することを示してきたが、Bcl-2の持つ細胞死抑制機能の生化学的なメカニズムとSmnによるその機能の増強の分子メカニズムの解明を目指して研究を展開してきた。特に、Bcl-2はミトコンドリアで機能し、(神経)細胞死を誘導するファクターであるシトクロムcの細胞質への遊離を抑制することで、細胞死を抑制することを示し、さらにシトクロムcの遊離はミトコンドリア膜上に存在するチャンネルVDAC (voltage-dependent anion channel) を介して起こり、Bcl-2はこのチャンネルを閉口することによりシトクロムcの遊離を抑制することを明らかにした。Bcl-2の機能分子ターゲットの同定により、アポトーシス抑制を目指した薬剤の開発が可能になった。

2. 研究実施内容

アポトーシス制御因子Bcl-2ファミリー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シトクロムcの細胞質への遊離を制御することで、細胞死をコントロールしていること、およびこのシトクロムcの遊離がミトコンドリア膜上のpermeability transition (PT) poreを介して起こることを示していたが、PT pore complexの中にBcl-2ファミリーたんぱくの機能ターゲットが存在すると考え、主な構成成分で外膜上に存在するVDACに焦点を絞り解析を行った。まず、Bcl-2ファミリーたんぱく(アポトーシス抑制メンバー Bcl-xLとアポトーシス促進メンバー Bax, Bak)がVDACに結合することを免疫共沈降実験により示し、精製VDACを用いたりポソーム系で、Bcl-2ファミリーたんぱくが直接VDAC機能を制御することを示した。つまり、BaxやBakはそのチャンネル活性を促進するのに対し、Bcl-xLはそのチャンネルを閉口することを示した。さらに、Bax/Bak存在下で、シトクロムcがVDACを通過することを突き止めた。この結果は、アポトーシス時のミトコンドリアからのシトクロムcの遊離が、BaxやBak存在下にVDACを介して起こっていることを示しており、VDACがアポトーシス制御因子Bcl-2ファミリーたんぱくの機能ターゲットであることを強く示唆した。このことを実証するために、酵母を利用し、野生型酵母

由来のミトコンドリアではBaxやBakによりシトクロム遊離が観察されたが、VDACを欠損したミトコンドリアではBaxやBakによるシトクロム遊離が起こらないことを示し、VDACがシトクロム遊離に必須の因子であることを示した。

一方、SmnによるBcl-2機能の増強の分子基盤を解く一歩としてSmnがBcl-2に結合するための必須領域の同定を目指し、多数の欠失変異を用いた解析から、Smnの結合にBcl-2のN末領域が必須であることを示した。この領域にはBcl-2のアポトーシス抑制活性に必須のBH4ドメインが存在し、SmnがBcl-2のBH4領域の構造などに影響を与え機能を発揮している可能性を示した。



3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A. and Tsujimoto, Y. Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene*, 18: 4523-4529, 1999

Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487, 1999

Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J. R. and Tsujimoto, Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Dev.* 126:3 415-3424, 1999

Hagiwara, Y., Saitoh, Y., Arita, N., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Yoshimine, T. and Hayakawa, T. Long-term functional assessment of encapsulated cells transfected with Tet-on system. *Cell Transpl.*, 8: 431-434, 1999

Lee, J.-H., Takahashi, T., Yasuhara, N., Inazawa, J., Kamada, S. and Tsujimoto, Y.: Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene*, 18: 6183-6190, 1999

Ohtsubo, T., Kamada, S., Mikami, T., Murakami, H. and Tsujimoto, Y.: Identification of NRF2, a member of the NF-E2 family of transcription factors, as a substrate for caspase-3(-like) proteases. *Cell Death Diff.* 6: 865-872, 1999

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y.: Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401: 168-173, 1999

Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.: Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res.* 59:5542-5548, 1999

Igata, E., Inoue, T., Ohtani-Fujita, N., Sowa, Y., Tsujimoto, Y. and Sakai, T.: Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene promoter. *Gene* 238: 407-415, 1999

Tsujimoto, Y. and Shimizu, S.: Bcl-2 family: Life-or-death switch, *FEBS lett.* 466: 6-10, 2000

Shimizu, Y. and Tsujimoto, Y.: Pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate VDAC activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 577-582, 2000