

「脳を守る」

平成10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た。この発見を契機に、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通し、疾患の発症メカニズムの解明と治療のストラテジの構築を目指した研究を行ってきた。特に、Bcl-2はミトコンドリアで機能し、ミトコンドリア膜上に存在するチャネルVDAC(voltage-dependent anion channel)を閉孔することによりアポトーシス誘導因子シトクロムcの遊離を抑制するモデルを提唱してきたが、VDACに対する特異的な中和抗体の作成に成功し、それを利用することによりモデルの確証を得た。この知見は、Bcl-2機能の最小ドメインの同定とともに、疾患治療のための薬剤の開発に対する重要な方向性を示した。

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、細胞死(神経細胞死も含む)を誘導するファクターであるシトクロムcなど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Bcl-2ファミリーたんぱくの機能ターゲットが外膜上に存在するVDACであることを示してきた。とくにアポトーシス促進機能を有するBcl-2ファミリーメンバー(Bax, Bakなど)はVDACを開孔することを通しシトクロムcの漏出を促し、一方、アポトーシス抑制メンバーBcl-xLはVDACを閉孔する。VDACがシトクロムc漏出に必須であることを示す遺伝学的証拠を得るために酵母を利用した。その結果、野生型酵母およびそれ由来のミトコンドリアにおいてBaxやBakによりシトクロムc遊離が観察されたが、VDACを欠損した酵母細胞およびミトコンドリアではBaxやBakによるシトクロムc遊離が起こらないことを示し、VDACがシトクロムc遊離に必須の因子であることを示した。この確証を哺乳動物細胞へ拡大するために、ヒトVDAC1に対する特異的な中和抗体の作成を行ない、細胞質に面している2ヶ所の領域をイムノジェンとして用いることによりVDAC活性を抑制する能力を有した特異的な抗体の作成に成功した。

これらを用い、単離ミトコンドリア系および細胞（マイクロインジェクション法を駆使）において、Bax/Bak誘導性のシトクロムc漏出およびアポトーシスにVDACが必須であることを示し、さらに細胞を用い複数のアポトーシス誘導剤（エトポシド、パクリタキセル、スタウロスポリン）により誘導されるアポトーシスが抗VDAC抗体のマイクロインジェクションにより極めて効率良く抑制されることを示し、哺乳動物細胞のアポトーシスにVDACが関与することの証拠を得た。

また、Bcl-2機能の詳細な解析および神経変性疾患の治療のためのドラッグ開発を目標に、Bcl-2の機能の最小機能ユニットの割り出しを行ない、N末近傍に存在するBH4ドメイン（SMNの結合領域とオーバラップする領域）がBcl-2機能に必要なかつ十分であることを示した。また、このオリゴペプチドに細胞膜透過性を付与するためにN末にHIV Tatたんぱく質のprotein transduction domainを付加すると、細胞培養液に添加するだけでアポトーシス抑制機能を発揮することを示し、疾患治療のための薬剤の開発に対する重要な方向性を示した。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Tsujimoto, Y. Role of anti-apoptotic Bcl-2 protein in spinal muscular atrophy. *J. Neural Transm. Suppl.* 58 : 41-52, 2000

Shimizu, S., Shinohara, Y. and Tsujimoto, Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19 : 4309-4318, 2000

Kusano, H., Shimizu, S., Koya, R.-C., Fujita, H., Kamada, S., Kuzumaki, N. and Tsujimoto, Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene* 19 : 4807-4814, 2000

Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M. and Tsujimoto, Y. A novel protein, RTN-xs, interacts with both Bcl-xL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 19 : 5736-5746, 2000

Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Diff.* 7 : 1174-1181, 2000

Hata, S., Fukuo, K., Morimoto, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Ogihara, T. Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 152 : 309-316, 2001

Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152 : 237-250, 2001