

大阪大学大学院医学系研究科 教授

辻本 賀英

「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

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) は運動神経細胞の脱落に起因する筋萎縮で特徴づけられる常染色体劣性疾患であり、その原因遺伝子として *smn* (survival motor neuron) が同定されている。我々は、*Smn* たんぱくが *Bcl-2* (アポトーシス抑制というユニークな生理活性を有するがん遺伝子産物) に結合し、そのアポトーシス抑制活性を増大させることを見出し発表した。この CREST 研究はこの成果を基礎としており、これら遺伝子産物の解析を通し SMA の発症メカニズムを解明するとともに、神経変性疾患の治療応用への可能性をさぐることを目的とした。

本研究では、上記の目的達成のため、特に以下の2つの specific aims を設定し、研究を遂行した。(1) *Smn* による *Bcl-2* 機能増強の生化学的基盤の解明、および(2) *Bcl-2* およびそのファミリー因子によるアポトーシス制御の生化学的基盤の解明である。

*Smn* による *Bcl-2* 機能増強の分子機構を明らかにするために、種々の欠失変異遺伝子を作成し、それらを用いて *Bcl-2/Smn* の結合に必要な領域の割り出しを行った。その結果、細胞死抑制に必須のドメインである BH4 を含む *Bcl-2* の N 末領域と *Smn* のエキソン 6 領域(多くの疾患変異が見出されている)が相互作用に必須であることを明らかにした。BH4 ドメインは以下に述べるように *Bcl-2* 機能の重要なパーツであり、疾患治療薬の開発の観点からも興味深い機能ドメインである。また、免疫染色により *Bcl-2* 遺伝子発現が生後、運動神経において特異的に低下することを見出し、それが SMA における運動神経細胞の特異的脱落のメカニズムであることを示唆した。

*Bcl-2* およびそのファミリーメンバー(細胞死抑制機能を有するものと促進機能を有するメンバーからなる)は、ミトコンドリア膜上で機能し、ミトコンドリア外膜の透過性を調節することで細胞死を制御していることを示した。アポトーシスシグナルが発生するとシグナルは最終的にミトコンドリアに集約され、ミトコンドリア外膜の透過性が増大し、外膜/内膜間隙に存在するたんぱくが細胞質に漏出する。この中に複数のアポトーシスシグナル伝達物質(たとえばシトクロム c)が含まれており、これらが細胞質で下流の破壊的なプログラム、たとえばカスパー(アポトーシス特異的なたんぱく分解酵素)の活性化を誘起する。細胞死抑制メンバーである *Bcl-2* や *Bcl-x<sub>L</sub>* と促進メンバーである *Bax* や *Bak* の機能ターゲットの一つとしてミトコンドリア外膜のチャンネルである *VDAC* (voltage-dependent anion channel) を同定し、生化学的手法および電気生理学的手法により、*Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>* はチャンネルを閉孔し、一方、*Bax/Bak* はチャンネルの構造変化を誘導し、たんぱく通過孔を形成させることを示した。さらに、酵母を用いた遺伝学的な解析、および特異的な抗体を用いた細胞生物学的手法により、*VDAC* 活性が哺乳動物細胞のアポトーシスに必須であることの確証を得た。

*VDAC* 抑制を指標にして、*Bcl-2* 機能の最小ドメインが BH4 領域にあること示し、このドメインのみで細胞死を抑制しうることを示した。また tetrocarcin A (微生物代謝物)は *VDAC*

をターゲットとして Bcl-2 機能を抑制することを明らかにした。これらの結果は、「Bcl-2 ファミリーたんぱくは VDAC 制御を介して細胞死調節を行う」という我々のモデルを強くサポートするものである。また、BH4 ペプチドに膜透過性を付与した tat-BH4 ペプチドはマウスやラットにおいて細胞死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。

Bcl-2 および Bcl-x<sub>L</sub> の結合パートナーとして、多くの細胞で発現する小胞体たんぱくの一つである Reticulon-xS (Reticulon-x の一つのスプライシングバリエーション) を同定した。このたんぱくは、結合依存的に Bcl-2 および Bcl-x<sub>L</sub> の機能を抑制することを見出した。さらに、RTN-xS は数種類のカスパーゼ (caspase-8, -9 と -12) に結合すること、さらに興味深いことに小胞体ストレス特異的にダイマー形成を行うこと、RTN-xS のダイマー形成の誘導によりアポトーシスを誘導することなどを明らかにした。これらの結果は、RTN-xS が、種々の神経変性疾患に関わることが示唆されている小胞体ストレス誘導性細胞死のシグナル伝達因子 (caspase 活性化のためのアダプター分子) の候補であることを示唆している。

当 CREST 研究の主目的のサポートとして、幾つかの異なった観点から細胞死 (アポトーシスならびにネクローシス) の分子機構の解析を行ってきたが、以下のような成果を得た。

アポトーシスの実行過程の解析のために、独自の *in vitro* アッセイ系を確立し、アポトーシスに特徴的でありその定義の一つになっている核クロマチン凝縮に関わる新規の因子 (Acinus と命名) を単離同定した。この分子のアポトーシスにおける関与を解析するため、Acinus 結合たんぱくを探索し、幾つかの分子を同定した。これらの中に RNA プロセッシングに関わる因子が含まれている。また Acinus の正常機能を明らかにする目的で Acinus 欠損マウスの作成を行い、Acinus 欠損マウスは胚発生遅延を呈し (E7.5)、致死となることを見出した。より詳細な解析のためコンディショナルノックアウトマウスの系統も作成した。

脳梗塞などの虚血性変性疾患における細胞死の分子メカニズムを明らかにする目的で、低酸素・低グルコース誘導性の細胞死の解析を行った。この細胞死はアポトーシスをドライブするカスパーゼに依存しない系であることを示し、その解析の糸口として顕著にまた再現性良く現れる核の収縮を取り上げ、核収縮に必須の因子の探索を行った。permeabilized 細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を確立し、核収縮誘導因子の精製を行い phospholipase A2 (PLA2) 活性を持つ新規分子を同定した。siRNA を用いた機能的ノックアウト法を利用することにより、特に iPLA2 分子が低酸素・低グルコース誘導性の細胞死と核収縮に必須であることを示した。

アポトーシスの特徴の一つであるアクティブブレブリングの生理的意義とその分子メカニズムの解明を目指し、ブレブリングに関わる因子の単離同定を試みた。この目的のために、まず、アクティブブレブリングという動的なイベントを再現できる *in vitro* アッセイ系を確立する必要があると考え、種々の permeabilized 細胞法を検討し、細胞抽出液によりアクティブブレブリングを誘導できる *in vitro* 系の確立に成功した。

ここで得られた成果は、細胞死プロセスの幾つかの重要なステップの解明につながるも

のであり、脊髄性筋萎縮症を含む神経変性疾患の発症メカニズムの理解に有用であると同時に、疾患治療という観点からも重要な情報を提供している。

## 2. 研究構想

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は運動神経細胞の脱落に起因する筋萎縮で特徴づけられる常染色体劣性疾患であり、その原因遺伝子 *smn* (survival motor neuron) 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により単離された。しかし、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* がん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。従って、これらの分子およびその相互作用の詳細な解析により、脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解明に貢献しようと考え、さらに疾患の治療に対し有用なストラテジも提示できるものと考えた。また、我々は、*Bcl-2* は少なくとも一部のネクローシス（例えば虚血時の細胞死のようにミトコンドリア脱機能により誘導されるネクローシス）を抑制しうることを示していたため、*Bcl-2* 機能の解析成果は、脊髄性筋萎縮症にとどまらず他の神経変性疾患（たとえば脳梗塞など）の治療に対しても有用な情報を提供できると考え研究を行った。

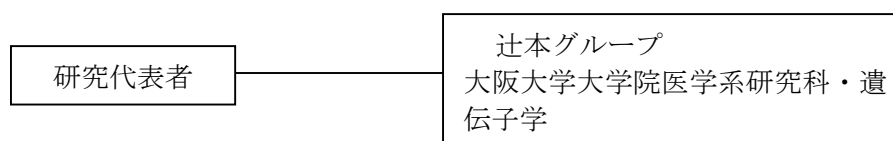
これらの目的を達成するために、以下の2つを *specific aim* を設定した。(1) *Bcl-2* およびそのファミリー因子のアポトーシス制御機能の生化学的基盤の解明、(2) *Smn* による *Bcl-2* 機能増強の生化学的基盤の解明。さらに、細胞死の分子メカニズムの解明は、神経変性疾患発症メカニズムの解明と疾患治療に重要な情報を与えうると考え、種々の側面から細胞死の分子メカニズムの解明も目指した。

*Bcl-2* ファミリーたんぱくの機能解析は、特に我々を含む複数のグループが示してきたように *Bcl-2* ファミリーたんぱくの主要な機能場所はミトコンドリアであるという事実に基づき、ミトコンドリア膜上での機能解析に主眼をおいた。*Bcl-2* の機能解析、および *Smn* による *Bcl-2* 機能の増強メカニズムの解明の一助とするために、*Bcl-2* や *Bcl-x<sub>L</sub>* に結合する新規の因子の単離、解析も同時に行うこととした。*Smn* の *Bcl-2* への結合様式を明らかにするために構造生物学的手法も取り入れた解析を目指した。また、細胞死の分子メカニズムを解き明かすために、幾つかの現象に焦点を当て解析を行った。特に、この研究の開始当時、未解決であった核の形態的な変化（アポトーシス時にみられるクロマチン凝縮）や核の収縮反応などの分子機構の解明に力を注いだ。我々が取った方策は、こられ核の形態変化を再現できる *in vitro* の系を確立し、それを利用することによりクロマチン凝縮や核収縮に関わる因子を単離するというものであった。

これらの解析を通し、Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能解明、Smn による Bcl-2 機能の増強メカニズムの解明、細胞死の分子メカニズムの幾つかの重要なステップの解明を行い、そこから SMA の発症メカニズムをさぐるとともに、治療応用へのストラテジを提供することを目指し、これを支える研究チームを形成し研究を開始した。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



### 4. 研究期間中の主な活動

#### (1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

### 5. 主な研究成果

#### (1) 論文発表 (海外 62 件)

1. Watanabe, M., Shirayoshi, Y., Koshimizu, U., Hashimoto, S., Yonehara, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Nakatsuji, N. Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control. *Exp. Cell Res.* 230: 76-83, 1997
2. Takahashi, T., Honda, H., Hirai, H. and Tsujimoto, Y. Overexpression of Bcl-xL prevents bacterial superantigen-induced apoptosis of thymocytes in vitro. *Cell Death & Differ.* 4: 159-165, 1997
3. Tanabe, H., Eguchi, Y., Kamada, S., Martinou, J.-C. and Tsujimoto, Y. Susceptibility of cerebellar granule neurons derived from bcl-2-deficient and transgenic mice to cell death. *Eur. J. Neurosci.* 9: 848-856, 1997
4. Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tachibana, T., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes to Cells* 2: 55-64, 1997
5. Paumen, M. B., Ishida, Y., Han, H., Muramatsu, M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Honjo, T. Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 523-525, 1997
6. Shigenaga, A., Funahashi, Y., Kimura, K., Kobayakawa, Y., Kamada, S., Tsujimoto, Y. and Tanimura, T. Targeted expression of ced-3 and Ice induces programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death & Differ.* 4: 371-377, 1997
7. Eguchi, Y., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57: 1835-1840, 1997
8. Kamada, S., Funahashi, Y. and Tsujimoto, Y. Caspase-4 and caspase-5, members of the ICE/CED-3 family of cystein proteases, are CrmA-inhibitable proteases. *Cell Death & Differ.* 4: 473-478, 1997

9. Shigenaga, A., Kimura, K., Kobayakawa, Y., Tsujimoto, Y. and Tanimura, T. Cell ablation by ectopic expression of cell death genes, *ced-3* and *Ice* in *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.* 39: 429-436, 1997
10. Kamada, S., Washida, M., Hasegawa, J., Kusano, H., Funahashi, Y. and Tsujimoto, Y. Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene* 15: 285-290, 1997
11. Tsujimoto, Y., Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W. and Matsuda, H. Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia Suppl* 3: 380-2, 1997
12. Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K. and Kuzumaki, N. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J.* 16: 4650-4656, 1997
13. Yasuhara, N., Sahara, S., Kamada, S. and Tsujimoto, Y. Evidence against a functional site for Bcl-2 downstream of caspase cascade in preventing apoptosis. *Oncogene* 15: 1921-1928, 1997
14. Kitanaka, C., Namiki, T., Noguchi, K., Mochizuki, T., Kagaya, S., Chi, S., Hayashi, A., Asai, A., Tsujimoto, Y. and Kuchino, Y. Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on Bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene* 15: 1763-1772, 1997
15. Kagaya, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Sugiyama, A., Asai, A., Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Kuchino, Y. A functional role for death proteases in s-Myc-and c-Myc-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6739-6745, 1997
16. Iwahashi, H., Eguchi, Y., Yasuhara, N., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. and Tsujimoto, Y. Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 390: 413-417, 1997
17. Yamabe, K., Shimizu, S., Kamiike, W., Waguri, S., Eguchi, Y., Hasegawa, J., Okuno, S., Yoshioka, Y., Ito, T., Sawa, Y., Uchiyama, Y., Tsujimoto, Y. and Matsuda, H. Prevention of hypoxic liver cell necrosis by in vivo human bcl-2 gene transfection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 217-223, 1998
18. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1455-1459, 1998
19. Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K. and Nakamura, Y. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chrom. & Cancer* 21: 230-235, 1998
20. Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., Schreiber, R.D., Tsujimoto, Y. and Taniguchi, T. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes to Cells* 3: 29-37, 1998
21. Tanabe, H., Eguchi, Y., Shimizu, S., Martinou, J.-C. and Tsujimoto, Y. Death-signaling cascade in mouse cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1403-1411, 1998
22. Kosai, K., Matsumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y. and Nakamura, T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 683-690, 1998

23. Yoshimura, S., Banno, Y., Nakashima, S., Takenaka, K., Sakai, H., Nishimura, Y., Sakai, N., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Nozawa, Y. Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 273: 6921-6927, 1998
24. Saitoh, Y., Eguchi, Y., Hagihara, Y., Arita, N., Watahiki, M., Tsujimoto, Y. and Hayakawa, T. Dose-dependent doxycycline-mediated adrenocorticotrophic hormone secretion from encapsulated Tet-On proopiomelanocortin Neuro2A cells in the subarachnoid space. *Human Gene Therapy* 9: 997-1002, 1998
25. Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R.C., Kuzumaki, N. and Tsujimoto, Y. A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: Cloning of the anti-apoptotic gene gelsolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 8532-8537, 1998
26. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tsujimoto, Y., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Matsushima, K., Yang, G., Tanabe, H., Martinou, J.-C., Hori, M., Yanagihara, T. Amelioration of hippocampal neuron damage after global ischemia by neuronal overexpression of Bcl-2 in transgenic mice. *Stroke* 29: 2616-2621, 1998
27. Okuno, S.-i., Shimizu, S., Ito, T., Nomura, M., Hamada, E., Tsujimoto, Y. and Matsuda, H. Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 273, 34272-7, 1998
28. Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14681-14686, 1998
29. Ozawa, K., Kuwabara, K., Tamatani, M., Takatsuji, K., Tsukamoto, Y., Kaneda, S., Yanagi, H., Stern, D.M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Ogawa, S. and Tohyama, M. ORP150 (150 kDa oxygen-regulated protein) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 274: 6397-6404, 1999
30. 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
31. Eguchi, Y., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res.* 59: 2174-2181, 1999
32. 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
33. 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: 3415-3424, 1999
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
  38. 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
  39. Igata, E., Inoue, T., Ohtani-Fujita, N., Sowa, Y., Tsujimoto, Y. and Sakai, T. Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene. *Gene* 238: 407-415, 1999
  40. 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
  41. Sato, K., Eguchi, Y., Kodama, T. and Tsujimoto, Y. Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell Death & Diff.* 7: 374-383, 2000
  42. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. and Tsujimoto, Y. BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-2 family members closes VDAC, and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3100-3105, 2000
  43. Ueno, H., Kondo, E., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Nakamoto, T., Sasaki, K., Mitani, K., Furusaka, A., Tanaka, T., Tsujimoto, Y., Kadowaki, T. and Hirai, H. Association of insulin receptor substrate proteins with Bcl-2 and their effects on its phosphorylation and antiapoptotic function. *Mol. Biol. Cell* 11: 735-746, 2000
  44. Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. and Tsujimoto, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and VDAC, which is permeable to cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 275: 12321-12325, 2000
  45. Koya, R. C., Fujita, H., Shimizu, S., Ohtsu, M., Takimoto, M., Tsujimoto, Y. and Kuzumaki, N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome *c* release. *J. Biol. Chem.* 275: 15343-15349, 2000
  46. Tsujimoto, Y. Role of anti-apoptotic Bcl-2 protein in spinal muscular atrophy. *J. Neural Transm. Suppl.* 58: 41-52, 2000
  47. 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
  48. 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
  49. 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
  50. 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
  51. 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

52. Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka Y. Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by a pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*, 21: 4944-4956 (2002)
53. Akao, Y., Maruyama, W., Shimizu, S., Nakagawa, Y., Shamoto-Nagai, M., Youdim, M.B.H., Tsujimoto, Y. and Naoi, M. Apoptosis induced by N-methyl(R) salsolinol, an endogenous neurotoxin, is mediated by mitochondrial permeability transition and suppressed by Bcl-2 and rasagiline, N-prooargyl-1(R)-aminoindan. *J. Neurochem.*, In press
54. Lee, M.Y., Kim, S.Y., Shin, S.L., Choi, Y.S., Lee, J.H., Tsujimoto, Y., Lee, J.H., Reactive astrocytes express bis, a bcl-2-binding protein, after transient forebrain ischemia. *Exp Neurol*. 175: 338-346 (2002)

#### Reviews

1. Tsujimoto, Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death & Differ.* 4: 429-434, 1997
2. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria. *Genes to Cells* 3: 697-707, 1998
3. Tsujimoto, Y. Prevention of neuronal cell death by Bcl-2. *Results Probl. Cell Differ.* 24, 137-55, 1998
4. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Bcl-2 family: Life-or-death switch, *FEBS lett.* 466: 6-10, 2000
5. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Diff.* 7: 1174-1181, 2000
6. Tsujimoto, Y. Regulation of cell death by the Bcl-2 family of proteins. *Proc. The 9<sup>th</sup> International Catecholamine Symp.* In press
7. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. The voltage-dependant anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 9: 187-193, 2002
8. Tsujimoto, Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Bioscience Report*. 22: 47-58, 2002

#### (2) 特許出願 (国内 3 件、海外 3 件)

##### ①国内

- 1) 辻本 賀英、清水 重臣「アポトーシス抑制又は促進物質のスクリーニング方法」  
特願平 11-101888、平成 11 年 4 月 8 日
- 2) 佐原 節子、恵口 豊、辻本 賀英「アポトーシス関連遺伝子」  
特願平 11-103317、平成 11 年 4 月 9 日
- 3) 辻本 賀英、清水 重臣「BH4 融合ポリペプチド」  
特願平 11-371449、平成 11 年 12 月 27 日

##### ②海外

- 1) 辻本 賀英、清水 重臣、「アポトーシス抑制又は促進物質のスクリーニング方法」  
PCT/JP00/02200、平成 12 年 4 月 5 日

2)佐原 節子、恵口 豊、辻本 賀英「アポトーシス関連遺伝子」

PCT/JP00/02254、平成 12 年 7 月 4 日

3)辻本 賀英、清水 重臣「BH4 融合ポリペプチド」

PCT/JP00/09274、平成 12 年 12 月 26 日

(3) 新聞報道等

①新聞報道

読売新聞 1997 年 11 月 27 日

脊髄性筋萎縮症原因遺伝子産物 SMN と Bcl-2 の機能的な相互作用を報告した Nature 論文の紹介

読売新聞 1999年 6 月21日 (夕刊)

化学工業新聞 1999年 6 月 3 日

日刊工業新聞 1999年 6 月 3 日

日本工業新聞 1999年 6 月 7 日

VDAC と BCL-2 family たんぱくの機能的な相互作用を報告した Nature 論文の紹介

日本経済新聞1999年 9 月18日

日刊工業新聞1999年 9 月 9 日

日本工業新聞1999年 9 月 9 日

科学新聞 1999年 9 月17日

Acinus の単離同定を報告した Nature 論文の紹介

朝日新聞 1999年 9 月20日 (夕刊)

VDAC/Bcl-2 と Acinus の紹介

朝日新聞 1999年10月 1 日

産経新聞 1999年10月21日 (朝刊)

大阪科学賞受賞のニュース

科学新聞 2000年 8 月25日

CREST での研究の紹介

日経産業新聞2001年 6 月20日

辻本チームの研究の紹介

②受賞

1999 年 第 17 回大阪科学

「細胞死抑制遺伝子 bcl-2 の発見と細胞死の分子機構の解析」

(4) その他特記事項

なし