— 特集 (アポトーシス
と関連疾患) —

アポトーシス誘導因子 Bax の作用機作

麻生 定光

日本医科大学老人病研究所生化学部門

Mechanism of apoptosis induced by the Bax protein

Sadamitsu Asoh

Nippon Medical School, Institute of Gerontology

はじめに

生物個体の外からの刺激や細胞のおかれたミクロの環境からの刺激によって起きるアポトーシスは細胞の生理的反応機構である。アポトーシスはいろいろな遺伝子産物によって制御されているが、Bax 蛋白はそのひとつである。Bax は 19 番目の染色体に遺伝子座をもつ分子量 21 kDa の膜蛋白でおもにミトコンドリアに存在する。Bax の発現量と細胞死は相関していることが多く、Bax の発現上昇がガン細胞の抗ガン剤にたいする感受性を上げるなど Bax についての理解が臨床面で今後貢献できる可能性が大きい。Bax は刺激によって起きるアポトーシスを促進する因子とされているが、以下に述べるように外からの刺激が無くても細胞死を引き起こすことができるので、ここではアポトーシス誘導因子とした。最初に Bax が疾病とどのように関連しているのかを述べ、次にどのように細胞死を引き起こすかについて述べる。

1. Bax と疾病とのかかわり

Bax 蛋白は脳、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、骨髄、リンパ節など多くの臓器で発現していることが認められる。生理的に細胞の交替がない神経細胞や心筋細胞からなる大脳皮質、小脳、心臓では加齢とともに発現量は減少する。小脳のプルキンエ細胞では高い発現量を一生維持する。

bax 遺伝子の発現調節にはガン抑制遺伝子産物 p53、ガン原遺伝子産物 Gfi-1、ウイルス HTLV-1 がコードしている Tax が関与している。脈絡叢腫瘍がおきるトランスジェニックマウスの一対の *bax* 遺伝子をつずつ欠損させるとそれに伴い腫瘍形成の進行が著しく早くなる。ミューテーター遺伝子の変異によるヒト大腸ガンの 51% に *bax* 遺伝子の変異が認められる。培養細胞系で *bax* の変異によりアデノウイルスの E1a 蛋白による形質転換率 (細胞のガン化の指標) が

上昇する。*bax* の変異により細胞は死にくくなりガン化する機会が多くなると考えられ、*p53* と同様に *bax* はガン抑制遺伝子のひとつであると指摘されている。卵巣ガン由来の細胞に Bax を過剰に発現させると抗ガン剤 paclitaxel, vincrestin, doxorubicin に対する感受性が上昇する。ヒト乳ガン由来の細胞でも Bax の発現量と抗ガン剤に対する感受性は相関している。抗ガン剤の多くはガン細胞にアポトーシスを誘導する。このように Bax の発現量が高いとガン細胞は抗ガン剤による細胞死を引き起こし易くなっていると考えられる。

神経細胞死と Bax との関わりはどうであろうか？ 虚血やキノリン酸、カイニン酸によって Bax の神経細胞における発現が高まる。MPTP をマウスに注入するとすると黒質部の Bax の発現量は上昇する。また、アルツハイマー病で死亡した患者の脳内に Bax の発現量が高まっている神経細胞が多く認められる。このように虚血やパーキンソン病、アルツハイマー病でおきる神経細胞死に Bax は関与していると考えられる。*bax* 遺伝子が完全に欠損している *bax* ノックアウトマウスの神経細胞は軸索切断による神経変性が起きにくくなっている。胚発生途中で大量の神経細胞死を引き起こす *bcl-x* ノックアウトマウスでさらに *bax* をノックアウトするとその細胞死が抑制される。神経細胞でも Bax の発現量と細胞死は相関している。しかしながら、知覚神経細胞や毛様体神経細胞では逆に Bax の発現が細胞死を抑制しているという報告がある。*bax* ノックアウトマウスでは予想されるように胸腺、脾臓のリンパ球は増加するが、精巣内に大量のアポトーシスが見られ睪丸は萎縮している。Bax は細胞によってアポトーシスを抑制したり促進したりすることになる。このように多くの場合、Bax の発現量の上昇は細胞死という結果をもたらす。

2. Bax は *bcl-2* ファミリー蛋白

Bax は *bcl-2* ファミリーと呼ばれる蛋白質群に属する。これらの蛋白の一次構造は濾胞性リンパ腫の原因遺伝子として単離された *bcl-2* の遺伝子産物 Bcl-2 と類似している。図 1 に 14 のメンバーを示した。歴史的にはアミノ酸の 1 次構造が類似している領域（ドメイン）、BH 1 (Bcl-2 homology 1) と BH 2 をもつ蛋白質として定義されたが、その他にも限られたメンバーだけが持つ BH3 や BH4 のドメインが同定されている。その後 Bik や Bid の様に BH3 ドメインだけを持つものも発見され *bcl-2* ファミリーに加えられた。これらのドメインを介して自分自身とホモダイマーや他のメンバーとヘテロダイマーを形成する。これらの蛋白質群はアポトーシスを引き起こす刺激に対し互いに正反対の結果をもたらす。図 1 の Bcl-2、Bcl-xL から始まる上半分はアポトーシスを抑制するのに対し、

図 1 *bcl-2* ファミリー。各メンバー間に保存されているドメイン BH 1, BH 2, BH 3, BH 4 を■で示した。C 末にある TM は疎水領域で膜内に組み込まれる部分である。最後に各メンバーの構成アミノ酸残基数 (aa) を示した。

Bax から始まる下半分はアポトーシスを逆に促進する。*bcl-2* ファミリーメンバーによるアポトーシスの制御はアポトーシス抑制因子群とアポトーシス促進因子群の相対的量の差によって行われ、抑制因子群が多い時は細胞は生存し、促進因子群が多い時は逆に細胞は死に向かうとされている(図 2)。しかしながら各メンバーの生化学的機能については不明である。

3. *bcl-2* ファミリーのジレンマ

bcl-2 ファミリーによるアポトーシスの制御はアポ

図 2 *bcl-2* ファミリーによるアポトーシスの制御。アポトーシス抑制因子と促進因子の相対的量の差によって細胞は生存あるいはアポトーシスを起こすと考えられている。

トーシス抑制因子と促進因子のヘテロダイマーの形成によって相手方の活性を阻害することで行われると考えられているが、どちらに本来活性があるのであろうか？ 抑制因子 Bcl-2 に本来抑制活性があつて Bax が Bcl-2 とヘテロダイマーを形成することによって Bcl-2 の活性が阻害され見かけ上 Bax に促進活性があるように見えるのか、逆に Bax に本来促進活性があつて Bcl-2 とヘテロダイマーを形成することによって Bax の活性を阻害することにより見かけ上 Bcl-2 に抑制活性があるように見えるのかこれまで不明であった。以下に述べるように Bax 自身に細胞死を誘導する機能があることがわかった。

4. Bax の発現が及ぼす生理的影響

大腸菌に微量(大腸菌蛋白の 0.01%)の Bax が発現するとその大腸菌は死に至る。酵母でも Bax の過剰発現により細胞死が引き起こされる。Bax の発現により大腸菌が増殖を止め死に至る直前に一過的に酸素消費が増大する。高分子物質に損傷を与える活性酸素のひとつスーパーオキシドの産生量も上昇する。切断を受けた DNA が増加し、突然変異率も上昇する。これらは増加した活性酸素の影響であると考えられる。不飽和脂肪酸も増加し細胞質膜は“柔らかく”なると考えられる。また酸素消費の上昇に伴って細胞内の pH がアルカリ側にシフトする。これは Bax を介したイオンの移動が起きている可能性を示す。Bax と 1 次構造が良く似ている Bcl-xL の 3 次構造が明らかになりコンピュータによる解析で Bax も良く似た 3 次構造を持つと予想された。Bcl-xL はイオンチャンネル活性が

あるので Bax も同様の活性を持っていると期待される。

原核生物の大腸菌細胞には細胞内小器官がなく真核生物のミトコンドリアのモデルとして見る事ができる。大腸菌での結果をもとにして類推すると、Bax の発現によりホ乳類細胞ではミトコンドリアの呼吸活性が一過的に上昇して活性酸素の産生量が増加する。また、ミトコンドリア膜にイオンチャンネルが Bax により形成され、膜電位が低下する。この類推は Bax の大量発現を誘導するだけでホ乳類細胞のミトコンドリアの膜電位が減少し活性酸素の増加および膜構造の損傷がおきて細胞死にいたるという報告と一致する。大腸菌からホ乳類細胞まで Bax が同様の致死作用を及ぼすことは興味深い。

5. Bax の致死領域

大腸菌細胞に致死作用を及ぼす領域は BH 1 ドメインと BH 2 ドメインの間 (アミノ酸残基 115—144) に存在した。この領域 30 アミノ酸からなるペプチドを大腸菌細胞に過剰発現させると細胞死に至る。この領域を残して C 末端側あるいは N 末端側を欠失した変異 Bax 蛋白をマウス前骨髄芽球性細胞に発現させると IL-3 除去やカンプトテシン添加によるアポトーシスを促進した。一方、この領域の N 末端側を少しでも欠くと促進活性は失われた。マウス細胞に外から *bax* 遺伝子を導入すると *bax* 遺伝子を組み込んだ細胞を得る頻度は低い。上述の致死領域を持つ変異 *bax* 遺伝子でも同様の結果を得た。これは *bax* 遺伝子が導入されて大量に Bax を発現する細胞は死ぬためであろうと考えられる。大腸菌やホ乳類細胞に細胞死を誘導する領域が共通であることは Bax の作用する標的およびその機構が進化の過程でよく保存されてきたことを示している。

6. Bcl-2, Bcl-xL は変異 Bax の活性を抑制できない

さて Bcl-2 は Bax の活性を阻害するのにヘテロダイマーの形成が必要であろうか？ N 末端 111 アミノ残基を欠く変異 Bax 蛋白 Bax 112—192 は Bcl-2, Bcl-xL とのヘテロダイマー形成に必要な BH 3 ドメインを持っていない。Bax 112—192 を発現しているマウス細胞を正常に生育させても、その 2 % はこの変異 Bax の活性でアポトーシスを起こしている。正常な Bax を発現している細胞も同様である。しかしながら致死領域を少し欠いた Bax 121—192 を発現している細胞では低い。これらの細胞に Bcl-2 や Bcl-xL を過

図3 BH 3 ドメインを欠く変異 Bax 112—192 のアポトーシス誘導モデル。(A) Bax は BH 3 ドメインを介して Bcl-2 とヘテロダイマーを形成しその細胞死誘導活性は阻害される。(B) 変異 Bax 112—192 は BH 3 ドメインを欠いているため Bcl-2 とヘテロダイマーが形成されず、活性は阻害されることなく (C) と同様に細胞死を誘導する。(D) では BH 3 ドメインだけを過剰発現させた時、Bcl-2 は BH 3 ドメインを持つペプチドとヘテロダイマーを形成するため内在性の正常 Bax は阻害されることなく細胞死を誘導する。

剰発現させても、Bax 112—192 を発現している細胞のアポトーシスを起こしている細胞の数に変化は無く、変異 Bax の活性を抑制することはできなかったが、Bax を発現している細胞では 1/3 に減少し Bax の活性は抑制された。図 3 にモデルを示した。(A) では正常 Bax は Bcl-2 とヘテロダイマーを形成することでその活性は阻害され細胞は生存する。(B) と (C) では、BH 3 ドメインを欠くが致死領域を持つ変異 Bax は Bcl-2 とヘテロダイマーを形成できないので Bcl-2 が過剰に存在しても細胞はアポトーシスを起こす。(D) では、導入発現された BH 3 ドメインだけを持つペプチドは Bcl-2 とヘテロダイマーを形成し、その結果内在性の正常な Bax は阻害されることなく細胞はアポトーシスを起こすと予想される。この場合致死領域を持たないこのペプチドに見かけ上細胞死を誘導する活性があるかのように見える。Bik や Bid はこの例であろう。Bax に本来あるアポトーシス誘導活性は Bcl-2 とヘテロダイマーを形成することで阻害され、かつ直接相互作用しない限り阻害されないことを示している。Bcl-2 には本来アポトーシスを抑制する活性は無いと考えられる。

さいごに

Bax には生物種を問わず細胞死を引き起こす活性がある。Bax の発現量の増加に伴って刺激に対するアポトーシス誘導の閾値が下がり最後には刺激が無くてもアポトーシスは誘導されると考えられる。アポトー

シスの制御という点では、Bax 以外のメンバーの解析が必要である。今後 Bax の詳細な生化学的機能が解明されていくとともに、その性質を利用して生体にとって不必要な細胞（塊）に強制的に Bax を発現させアポ

トーシスによって生体から取り除くことなど Bax の臨床的な応用面の研究が盛んになると期待される。

（受付：1997 年 8 月 11 日）

（受理：1997 年 8 月 15 日）