プロテオミクスで解き明かすミトコンドリアからのシトクロム c 放出機構

山本武範,^{*,a} 山田安希子,^b 吉村勇哉,^{a,c} 寺田 弘,^d 篠原康雄^{a,c}

The Mechanisms of the Release of Cytochrome c from Mitochondria Revealed by Proteomics Analysis

Takenori Yamamoto,^{*,a} Akiko Yamada,^b Yuya Yoshimura,^{a,c}
Hiroshi Terada,^d and Yasuo Shinohara^{a,c}^aInstitute for Genome Research; ^bInstitute of Health Biosciences, University of Tokushima;
3-18 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan; ^cFaculty of Pharmaceutical Science,
University of Tokushima; 1-78 Shomachi, Tokushima 770-8505, Japan; and
^dFaculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science;
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan.

(Received July 4, 2012)

Mitochondrial permeability transition (PT) is the phenomenon in which the mitochondrial inner membrane becomes permeable to various solutes and ions. When PT is induced by Ca^{2+} , cytochrome c is released from mitochondria into the cytosol where it then triggers subsequent steps of programmed cell death, apoptosis. Thus, the proteins that regulate PT and cytochrome c release could become druggable targets for various diseases. However, the mechanisms of PT and the release of cytochrome c have not yet been revealed. We previously showed that valinomycin, a potassium selective ionophore, also caused release of cytochrome c from mitochondria without inducing PT. This result indicates that cytochrome c could be released from mitochondria with or without induction of PT. In this study, to understand the difference of effects of valinomycin and Ca^{2+} on mitochondria, we examined what protein species are released from valinomycin- and Ca^{2+} -treated mitochondria by LC-MS/MS. As a result, only the proteins located in the intermembrane space were found to be released from valinomycin-treated mitochondria, while those in both the intermembrane space and in the matrix were released from Ca^{2+} -treated mitochondria. Furthermore, the protein releases by each reagent occurred not selectively but in a concentration-dependent manner. Based on these results, the permeabilization effects of Ca^{2+} and valinomycin on the inner and outer mitochondrial membranes are discussed.

Key words—cytochrome c; mitochondria; permeability transition; proteomics; release

1. はじめに

ミトコンドリアは真核生物に存在する細胞小器官であり、その主たる機能はエネルギー変換である。生体が摂取した様々な栄養分子のエネルギーはミトコンドリアにおいて生体エネルギー通貨である ATP に変換される。この変換の仕組みはミトコンドリアが持つ 2 種類の膜のうち内膜に存在してお

り、内膜では栄養分子の持つエネルギーを一旦内膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル差に置き換え、このポテンシャル差を駆動力としてマトリックス内で ATP が合成される。このような ATP 合成を効率的に行うため、通常ミトコンドリア内膜の物質透過性は極めて低く保たれている。しかしながら、ミトコンドリアに過剰量の Ca^{2+} が取り込まれると、内膜の物質透過性が非選択的に上昇する「透過性遷移 (permeability transition: PT)」と呼ばれる現象が引き起こされる (Fig. 1)。透過性遷移は、それが誘起されたミトコンドリアで膨潤や ATP 合成阻害が起こるといった現象としての理解は早くから進んでいたものの、その生理的な意義については長らく不明であった。近年、透過性遷移が誘起されたミトコンドリアからシトクロム c というタンパク

The authors declare no conflict of interest.

^a徳島大学疾患ゲノム研究センター、^b同大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18)、^c徳島大学薬学部 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78)、^d東京理科大学薬学部 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)

*e-mail: tyamamo@genome.tokushima-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S06 で発表したものを中心に記述したものである。

質が漏出し、漏出したシトクロム c が細胞死実行の引き金を引くことが明らかにされたことから、にわかに透過性遷移の細胞死制御への関与がクローズアップされてきた。¹⁻³⁾ しかし、 Ca^{2+} がどのように内膜の透過性を上昇させるのか？ またこのときシトクロム c がどのように外膜を透過してミトコンドリアから漏出するのか？ といった疑問についてはいまだ解答が得られていない。

これらの疑問に対して突破口を見い出すべく、われわれはこれまでに Ca^{2+} 以外にどのような化合物

Fig. 1. Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome c Release from Mitochondria

When mitochondrial permeability transition (PT) is induced by Ca^{2+} , cytochrome c present in the intermembrane space of mitochondria is released. The released cytochrome c triggers subsequent steps of apoptosis.

が透過性遷移やそれに伴うシトクロム c 漏出を引き起こすのか、またそれらの化合物に共通する性質はどのようなものかという観点から研究を進めてきた。その結果、 Ca^{2+} 以外にも様々な化合物がミトコンドリアからシトクロム c を漏出させることを明らかにした。⁴⁻⁶⁾ その中でも、特にカリウム選択的イオノフォアとして知られるバリノマイシンが、透過性遷移を誘起することなくミトコンドリアからシトクロム c を漏出させるという興味深い知見を見出した (Fig. 2).⁷⁾ この結果は、これまで不可分の関係であると考えられてきたシトクロム c 漏出と透過性遷移という 2 つの現象は実は切り離して考えることができることを意味しており、シトクロム c 漏出機構に多様性があることを示すものであった。このことから、バリノマイシンと Ca^{2+} がミトコンドリア膜に及ぼす作用の違いを理解することが、シトクロム c の漏出機構解明への糸口となると考えられた。 Ca^{2+} により透過性遷移を伴ってシトクロム c が漏出する場合と、バリノマイシンにより透過性遷移を伴わずにシトクロム c が漏出する場合とでは、ミトコンドリア内膜の状態が全く異なることから、漏出するタンパク質の分子種にも違いがあるであろうことは容易に予想された。そこで本研究では、バリノマイシン又は Ca^{2+} を添加したミトコンドリアから漏出するタンパク質をプロテオミクス解析により網羅的に同定し、漏出されるタンパク質種の違いから両ミトコンドリアで起きている現象を分子レベルで理解することを試みた。

Fig. 2. Effects of Valinomycin and Ca^{2+} on Mitochondrial Configuration and Localization of Various Proteins

A. Transmission electron microscopic appearance of non-treated mitochondria (a), valinomycin-treated mitochondria (b), and Ca^{2+} -treated mitochondria (c) are shown. After each treatment, mitochondria were promptly harvested and subjected to the fixation processes. Bar under photograph "c" indicates 1 μm . B. For lanes a-d, supernatants (15 μL /lane) of non-treated, valinomycin-treated, and Ca^{2+} -treated mitochondria, or whole proteins of rat liver mitochondria (5 μg /lane), respectively, were subjected to SDS-PAGE. After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes thus prepared were incubated with specific antibodies against cytochrome c (Cyt.c), adenine nucleotide translocase (ANT) or voltage-dependent anion channel (VDAC).

2. 漏出タンパク質のプロテオミクス解析

プロテオミクス (proteomics) とは、広義には「タンパク質全体 (プロテオーム; proteome) を観察することを通して、生命機能の解明を目指す研究」を意味する。このプロテオミクスにおいて中核となるプロセスは、質量分析による大規模なタンパク質の分子同定である。すなわち、質量分析により得られたタンパク質の質量情報を、膨大なゲノム情報から導き出されるタンパク質分子の質量情報と照合することによって、サンプル中に存在するタンパク質の分子種を特定するのである。近年、プロテオミクス解析は質量分析装置の高精度化と操作の簡便化によって分野を問わず広く行われるようになってきた。われわれはこのプロテオミクス解析によってミトコンドリアから漏出するタンパク質の網羅的な分子同定を試みた。

まず、ラットの肝臓から単離したミトコンドリアをメディウム中でインキュベートし、ここにバリノマイシンを添加した場合にミトコンドリアから漏出するタンパク質について Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) によって分子同定を行った。その結果、シトクロム c やアデニレートキナーゼ 2 を始めとする複数の膜間腔に存在するタンパク質が同定された (Table 1)。これに対し、 Ca^{2+} を添加した場合には、膜間腔に存在するタンパク質に加え、マトリックス内に存在するタンパク質も同定された (Table 2)。これらの結果から、バリノマイシンを添加したミトコンドリアでは外膜のみの透過性が上昇するのに対し、 Ca^{2+} を添加した場合には内膜と外膜ともに透過性が上昇した状態となっていることが明らかになった。

3. ミトコンドリアからのタンパク質の漏出様式

では、ここで明らかになったバリノマイシンや Ca^{2+} の作用によって引き起こされるタンパク質の

漏出は分子種選択的に起こっているのだろうか？われわれはこの疑問に対しても、プロテオミクスを駆使したアプローチを試みた。すなわち、仮にミトコンドリアから“非選択的”に漏出が起きているならば漏出したタンパク質の分子種は本来ミトコンドリアに豊富に存在するタンパク質種と合致し、逆に“選択的”にタンパク質の漏出が起きているのならば両者に相関は認められないと考えられる。

そこで、まずミトコンドリアに豊富に存在するタンパク質をリスト化するため、ミトコンドリアの総タンパク質を質量分析に供し、無差別に約 100 種のタンパク質を同定した。一般に、質量分析によりタンパク質の分子同定を行った場合、含量の多いタンパク質からおよそ優先的に同定が行われていくため、われわれが同定した約 100 種のタンパク質は、700 種類以上とも言われるミトコンドリアを構成するタンパク質の中でも比較的豊富に存在するタンパク質であると考えられる。⁸⁾ そこで、ここで同定されたタンパク質をミトコンドリアに豊富に存在するタンパク質群として、バリノマイシン又は Ca^{2+} を添加した場合にミトコンドリアから漏出したタンパク質群との照合を行った。その結果、漏出したタンパク質種のほぼすべてがミトコンドリアに豊富に存在するタンパク質種と合致した。このことから、バリノマイシン又は Ca^{2+} の添加によって漏出したタンパク質は、いずれも“分子種非選択的”にミトコンドリアから漏出していることが分かった。このことに加え、漏出したタンパク質の中には 100 kDa を超えるような巨大なタンパク質も含まれていたことから、バリノマイシンを添加した場合には外膜で、 Ca^{2+} を添加した場合には外膜と内膜で壊裂が起きていることが強く示唆される。したがって、シトクロム c は壊裂した外膜の亀裂から他のタンパク質とともに細胞質に漏出してくるものと考え

Table 1. LC-MS/MS Analysis of Proteins Released from Valinomycin-treated Mitochondria

Identified Protein			
Name	AC ^{a)}	Mw ^{b)}	Localization
Sulfite oxidase	Q07116	55	Intermembrane space
Adenylate kinase isoenzyme 2	P29410	27	Intermembrane space
Cytochrome c	P62898	12	Intermembrane space

^{a)} Accession number in UniProt, ^{b)} Molecular weight.

Table 2. LC-MS/MS Analysis of the Proteins Released from Ca^{2+} -treated Mitochondria

Identified Protein			
Name	AC ^{a)}	Mw ^{b)}	Localization
Carbamoyl-phosphate synthase	P07756	166	Matrix
Pyruvate carboxylase	P52873	130	Matrix
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96	Mitochondria
Aconitate hydratase	Q9ER34	86	Mitochondria
Glutamate dehydrogenase 1	P10860	62	Matrix
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Q02253	58	Matrix
Aldehyde dehydrogenase	P11884	57	Matrix
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	P22791	57	Matrix
Sulfite oxidase	Q07116	55	Intermembrane space
Dihydrolipoyl dehydrogenase	Q63342	55	Matrix
Aspartate aminotransferase	P00507	48	Matrix
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P15650	48	Matrix
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P08503	47	Matrix
Acetyl-CoA acetyltransferase	P17764	45	Mitochondria
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P15651	45	Matrix
3-ketoacyl-CoA thiolase	P13437	42	Mitochondria
Ornithine carbamoyltransferase	P00481	40	Matrix
Malate dehydrogenase	P04636	36	Matrix
2,4-dienoyl-CoA reductase	Q64591	36	Mitochondria
3-hydroxyisobutyrate	P29266	36	Mitochondria
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P13803	35	Matrix
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	P97519	35	Matrix
Thiosulfate sulfurtransferase	P24329	33	Matrix
Enoyl-CoA hydratase	P14604	32	Matrix
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	P23965	32	Matrix
Electron transfer flavoprotein subunit beta	Q68FU3	28	Matrix
Adenylate kinase isoenzyme 2	P29410	27	Intermembrane space
Adenylate kinase isoenzyme 4	Q9WUS0	25	Matrix
Cytochrome c	P62898	12	Intermembrane space
10 kDa heat shock protein	P26772	11	Matrix

^{a)} Accession number in UniProt, ^{b)} Molecular weight.

られる。⁹⁾

しかしながら、 Ca^{2+} やバリノマイシンを添加したミトコンドリアでなぜ外膜の壊裂が起きるのかという次なる疑問が浮上してくる。この点についていまだ明確な解答は得られていないが、 Ca^{2+} を添加したミトコンドリアではマトリックス領域の膨張が

認められることから、¹⁰⁾ この膨潤によって外膜が物理的に壊裂するというモデルが考えられる。一方、バリノマイシンを添加したミトコンドリアでは Ca^{2+} の場合のように大きな膨潤は認められないことから、その外膜を壊裂させるメカニズムに興味を持たれる。

4. 呼吸基質非存在下のミトコンドリアにおけるシトクロム c の挙動の解析

ここまでの解析から、シトクロム c がミトコンドリアから漏出するとき、外膜の透過性が分子種非選択的に亢進していることが分かった。では、単に外膜の透過性が亢進すればシトクロム c はミトコンドリア外に漏出されるのであろうか？ この疑問に対する解答を得るため、われわれは様々な条件下のミトコンドリアに Ca^{2+} を添加してそのときのシトクロム c の挙動を解析した。その結果、ミトコンドリア内膜に電気化学ポテンシャル差を形成するために必要なコハク酸のような呼吸基質をメディウムに添加しなかった場合、 Ca^{2+} によって透過性遷移は誘起されるにもかかわらず (Fig. 3), ミトコンドリアからのシトクロム c 漏出は認められないことが明らかになった (Fig. 4)。またこのとき、シトクロム c の約 2 倍の分子量を有し膜間腔に存在するアデニレートキナーゼ 2 はミトコンドリア外にすべて漏出していた。このことから、呼吸基質非存在下で透過性遷移が誘起されたミトコンドリアでも外膜の透過性は十分に亢進するものの、このときなぜかシトクロム c は漏出しないことが分かった。

以上のことから、ミトコンドリアからシトクロム c が漏出するためには、 Ca^{2+} やバリノマイシンのような外的な刺激によって外膜の透過性が亢進するだけでは不十分であること、シトクロム c の漏出を制御している未知の機構が存在しこの機構に呼吸基質が関与していることが示唆された。多くの参考書の中で、シトクロム c はミトコンドリアの膜間腔に存在していると記載されているが、実際にはシトクロム c は内膜の細胞質側表面に静電引力で弱く結合した状態で存在している。このことから、シトクロム c がミトコンドリアから漏出するにはまず内膜から解離する必要がある、この解離のプロセスに呼吸基質が関与しているのかもしれない。¹¹⁾

5. おわりに

シトクロム c がミトコンドリアから漏出するとき、膜間腔に存在するシトクロム c がどのように外膜を透過するのかという疑問に対し、これまで大きく 2 つの仮説が立てられていた。1 つは、シトクロム c を透過させる巨大なチャネルが外膜に形成されるという説、もう 1 つは外膜の壊裂によるという説である。われわれが今回の研究から得た知見は後者

Fig. 3. Morphological Changes in Mitochondria Examined by Transmission Electron Microscopy and Release Analysis of Cytochrome c from Mitochondria

Photographs in panels A and B represent the morphologies of mitochondria observed in the presence and absence, respectively, of the respiratory substrate (succinate). When used, 5 mM succinate (plus 0.5 μg rotenone/mg mitochondrial protein) was included in the incubation medium. Photos labeled “none” show the morphology of non-treated mitochondria; and those labeled “+ Ca^{2+} ” and “+ Ca^{2+} + CsA,” the morphology of mitochondria treated with 100 μM Ca^{2+} and with 100 μM Ca^{2+} plus 2.5 μM CsA, respectively. Bar indicates 1 μm for all photos. CsA: cyclosporine A; PT inhibitor.

Fig. 4. Release Analysis of Cytochrome c and Adenylate Kinase 2 from Mitochondria Treated with Ca^{2+} in the Presence or Absence of Respiratory Substrate

For examination of the effects of Ca^{2+} treatment of mitochondria in the presence or absence of succinate on the release of cytochrome c and adenylate kinase 2, mitochondria incubated under either condition were promptly centrifuged. The pellet (P) and supernatant (S) thus obtained from individual mitochondrial suspensions were subjected to SDS-PAGE followed by immuno-detection of cytochrome c and adenylate kinase 2 (AK2). Ca^{2+} and CsA were added to final concentrations of 100 μM and 2.5 μM , respectively. CsA: cyclosporine A; PT inhibitor.

の膜壊裂説を強く支持するものであった。しかしながら、膜の壊裂を起こし外膜の透過性を上昇させることがシトクロム c をミトコンドリアから漏出させる分子機構のすべてではなく、それ以外にも呼吸基質が関与する未知の制御因子が存在することが示唆される。今後これらの因子が同定され、シトクロム c 漏出機構の全貌が解き明かされることを期待して

いる.

REFERENCES

- 1) Zoratti M., Szabo I., *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139–176 (1995).
- 2) Bernardi P., Colonna R., Costantini P., Eriksson O., Fontaine E., Ichas F., Massari S., Nicolli A., Petronilli V., Scorrano L., *Biofactors*, **8**, 273–281 (1998).
- 3) Kroemer G., Reed J. C., *Nat. Med.*, **6**, 513–519 (2000).
- 4) Shinohara Y., Bandou S., Kora S., Kitamura S., Inazumi S., Terada H., *FEBS Lett.*, **428**, 89–92 (1998).
- 5) Yamamoto T., Tachikawa A., Terauchi S., Yamashita K., Kataoka M., Terada H., Shinohara Y., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3573–3579 (2004).
- 6) Yamamoto T., Terauchi S., Tachikawa A., Yamashita K., Kataoka M., Terada H., Shinohara Y., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 299–306 (2005).
- 7) Shinohara Y., Almofti M. R., Yamamoto T., Ishida T., Kita F., Kanzaki H., Ohnishi M., Yamashita K., Shimizu S., Terada H., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5224–5230 (2002).
- 8) Forner F., Foster L. J., Campanaro S., Valle G., Mann M., *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 608–619 (2006).
- 9) Yamada A., Yamamoto T., Yamazaki N., Yamashita K., Kataoka M., Nagata T., Terada H., Shinohara Y., *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 1265–1277 (2009).
- 10) Terauchi S., Yamamoto T., Yamashita K., Kataoka M., Terada H., Shinohara Y., *Mitochondrion*, **5**, 248–254 (2005).
- 11) Yamamoto T., Yoshimura Y., Yamada A., Gouda S., Yamashita K., Yamazaki N., Kataoka M., Nagata T., Terada H., Shinohara Y., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 619–623 (2009).