

特集：リン脂質代謝と脂質メディエーター研究の最新の成果
第1部 リン脂質代謝酵素

アポトーシス制御因子としてのカルジオリピン研究の現状

中川 靖一

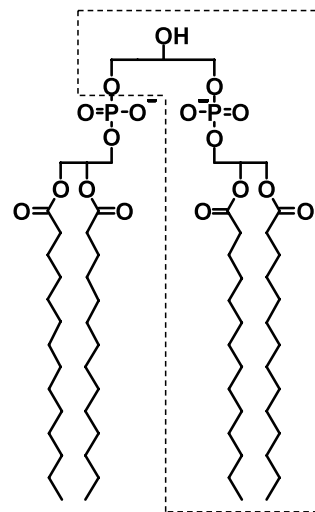
カルジオリピンはミトコンドリア固有のリン脂質であり、リン脂質が2分子重合した特徴的な構造を有する。カルジオリピンはさまざまなミトコンドリアタンパク質の活性発現に必要であり、また、コンタクトサイトなどのミトコンドリア特有の膜構造を構築するなど、ミトコンドリア機能の発現に不可欠のリン脂質である。カルジオリピンの代謝異常はミトコンドリア機能の不全を引き起こし、さまざまな疾病の原因となる。最近、カルジオリピンやカルジオリピンヒドロペルオキシドはシトクロム *c* の内膜への結合や遊離、Bax などのアポトーシス実行因子の移行のための膜ドメインの構築、膜透過性の制御など、アポトーシスの誘導に重要なリン脂質であることが明らかとなってきた。本稿では、膜リン脂質であるカルジオリピンが高度に制御されているアポトーシス誘導に関与するという興味深い現象について、私たちの結果とこれまでに明らかにされた知見とについて紹介する。

1. カルジオリピンとは

カルジオリピン (CL) (別名, ジホスファチジルグリセロール) はミトコンドリアに局在する酸性リン脂質である。その構造はホスファチジルグリセロールが重合した二量体で、二つのリン酸基, 4本の脂肪酸鎖を有しており, 他のリン脂質とは大きく異なっている (図1)。CLは細胞全体では4-5%程度のリン脂質であるが, ミトコンドリアでは17-20%を占める主要なリン脂質である。哺乳類のCLの主な脂肪酸はリノール酸 (18:2) である。特に心臓と肝臓には18:2は多く含まれており, ラット心臓では全脂肪酸の75%, 肝臓では78%である。これらの組織では18:2のみからなる tetralinoleoyl (18:2)₄CL など極めて不飽和度の高いCL分子種が多く存在する。マウス心臓の主なCL分子種は (18:2)₄:21%, (18:2)₃(18:1)₁:13%,

(18:2)₃(22:6)₁:18% であり, 肝臓では (18:2)₄:44%, (18:2)₃(18:1)₁:23% である¹⁾。

CLは主にミトコンドリア内膜に存在している。マウス肝臓のミトコンドリア内膜では全リン脂質の18%と多い



ホスファチジルグリセロール

図1 カルジオリピンの構造

北里大学薬学部 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1)
Recent studies of cardiolipin as a novel modulator of apoptosis
Yasuhito Nakagawa (School of Pharmaceutical Sciences Kitasato University, 5-9-1 Shirokane Minato-ku Tokyo 108-8641, Japan)

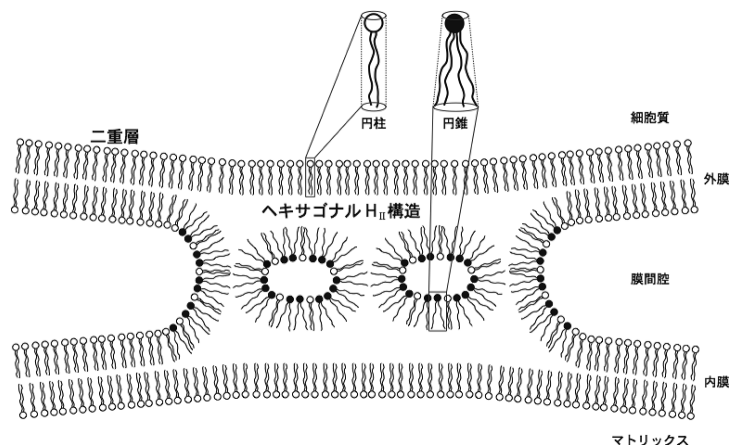


図2 ヘキサゴナル H_{II} の膜構造

が、外膜では4-5%程度である。コンタクトサイトはミトコンドリア内膜と外膜が接合、あるいは融合している非二重層を含む膜構造であり、さまざまな機能タンパク質が存在している。コンタクトサイトのリン脂質組成はCL (22%)、ホスファチジルコリン (PC) (26%)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) (22%) であり、CLはこの膜の構築に必須のリン脂質である²⁾。4本の脂肪酸鎖を有するCL分子は円錐形状 (corn shape) であり、その分子の会合は極性頭部を膜内部に向けた円筒形に集合し、Ca²⁺の存在下でヘキサゴナル H_{II}相を形成する (図2)。この非二重層はコンタクトサイトの形成や膜間の融合に必要とされる。コンタクトサイトはチャンネルの形成や Bax や tBid の結合ドメインとしてアポトーシスシグナルの発信に重要な膜構造である。

CLはミトコンドリアの電子伝達系の複合体、輸送タンパク質やリン酸化酵素などさまざまな機能タンパク質の活性発現に必要なリン脂質である。CLは電子伝達系の複合体I、複合体III、複合体IVに結合しており、それらの活性を維持している。CLは個々の複合体に結合しているだけでなく、複合体IIIの2分子、複合体IとIVのそれぞれ1分子 (I₁III₂IV₁) の会合によって形成される超複合体 (super-complex, または respirasome) を安定化させ、効率的なエネルギー産生に寄与している³⁾。CL合成酵素の欠失した酵母では超複合体 (III₂IV₁) が減少し、エネルギー産生が減少する⁴⁾。また、後述するようにCLの減少したBarth症候群患者のリンパ芽球では複合体IVは増加し、複合体I、IIIは減少しており、正常な超複合体が形成されない⁵⁾。

ミトコンドリア内膜の分子、イオンなどの輸送担体であるアデニンヌクレオチドトランスロケーター (ANT)、リン酸輸送担体 (phosphate carrier, PiC)、カルボキシキヤリヤータンパク質、脱共役タンパク質 (UCP) やピルビン酸キヤリヤーなどのミトコンドリア溶質輸送担体ファミリータンパク質 (mitochondrial carrier family protein) の活性発

現にはCLが必須である⁶⁾。また、長鎖アシル CoA を長鎖アシルカルニチンに変換する酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1 (CPT1)⁷⁾やリン酸化酵素であるミトコンドリアクレアチンキナーゼやミトコンドリアヌクレオチド二リン酸キナーゼ (NDPK-D) の活性発現にもCLは必要とされる⁸⁾。

CLの代謝異常による疾病としてX染色体連鎖性劣性疾患であるBarth症候群が知られている。臨床的所見としては拡張型心筋症、好中球減少、筋力低下であり⁹⁾、電子顕微鏡観察では骨格筋、肝臓、腎臓や骨髄系前駆細胞のミトコンドリアの形態異常が見られる。病因はアシル基転移酵素のスーパーファミリーと相同性をもつ tafazzin の欠損であり、生化学的特徴としてはCLの減少、モノリゾCLの蓄積、CLへの18:2の取り込みの低下、(18:2)₄分子種の減少である¹⁰⁾。de novo合成されたCLは再アシル化によって高度不飽和脂肪酸を有する成熟したCLとなることから、Barth症候群では再アシル化経路が機能しないため、不飽和度の低い未成熟のCLとモノリゾCLが蓄積する。tafazzinがアシル基転移酵素であることの直接的な証明はされていないが、Barth症候群患者由来のリンパ芽球にアシル基転移酵素-1遺伝子を導入すると、CLへの18:2の取り込みが促進され、CLレベルが回復することから、tafazzinは18:2をモノリゾCLにアシル化するアシル基転移酵素と考えられている¹¹⁾。Barth症候群は成熟CLの生成の低下、アシル鎖組成の変動や超複合体 (I₁III₂IV₁) の不安定化によって生じるATP産生の低下などによる、深刻なミトコンドリア機能障害の疾病と考えられる¹²⁾。Barth症候群は未成熟のCLとモノリゾCLの蓄積による細胞死の疾患であるとの指摘もあり、アポトーシスとの関連が注目されている。

2. カルジオリピンとアポトーシス

アポトーシスはデスドメインを介する経路とミトコンド

リアを介する経路とに大別される。ミトコンドリアにはシトクロム *c* (cyt. *c*), Smac/Diablo, エンドヌクレアーゼ G, HtrA2/Omi, アポトーシス誘導因子 (AIF) などの種々のアポトーシス実行因子が存在しており, ミトコンドリアからの実行因子の放出がアポトーシスの実行を決定する。CLは内膜の cyt. *c* の結合・遊離の制御, アポトーシス実行のメインマシナリーである tBit と Bax のミトコンドリア膜への移行のための結合ドメインの形成やアポトーシス実行因子のミトコンドリアからの放出の制御などアポトーシスの誘導のさまざまな過程に関わっている。

1) ミトコンドリア内膜からの cyt. *c* の遊離

ミトコンドリアからの cyt. *c* の放出には, 内膜からの遊離とポア/チャンネルを介した外膜の通過の二つの過程が必要である¹³⁾。CLは cyt. *c* の A 部位と C 部位との相互作用によって結合している。A 部位では cyt. *c* のリシンと CL のリン酸基が緩やかな静電的結合をしており, C 部位では cyt. *c* の疎水性ポケットと CL の 1 本のアシル鎖が安定した疎水結合をしている¹⁴⁾。結合に関与しない 3 本のアシル鎖はアンカーとして内膜に埋め込まれ, cyt. *c* は内膜に固定される。

cyt. *c* と CL の親和性は CL を酸化することにより著しく低下する¹⁵⁾。CL の単分子膜や CL を含むリポソームに結合させた cyt. *c* は CL の酸化によって CL との親和性を失い, 膜から遊離する。CL ヒドロペルオキシド (CLOOH) の単分子膜への cyt. *c* の結合は未酸化の CL に比較して極めて弱い。私たちは生体膜に生成したリン脂質ヒドロペルオキシドを消去する抗酸化酵素であるリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx, GPX4) の機能を解析している過程で, ミトコンドリア型 PHGPx を高発現した細胞がアポトーシスに耐性を獲得することを見出した¹⁶⁾。2-デオキシグルコース (2DG) は RBL2H3 細胞 (mock 細胞) のミトコンドリアからの cyt. *c* 放出を促進してカスパーゼを活性化し, アポトーシスを誘導する。PHGPx 高発現細胞では, cyt. *c* の放出やカスパーゼの活性化は抑制され, アポトーシスは誘導されない。また, 高発現細胞はスタウロスポリン, エトポシド, UV によるアポトーシスにおいても耐性である。mock 細胞は cyt. *c* の放出に先行して CLOOH を生成するが, アポトーシス耐性の高発現細胞では CLOOH は検出されない。CL に特異的に結合する蛍光試薬である 10-*N*-nonyl acridine orange (NAO) によって CL を標識すると, 未刺激の mock 細胞と高発現細胞の蛍光強度には違いはない。一方, アポトーシスを誘導した mock 細胞の蛍光強度は減少するが, 高発現細胞では変化しない。アポトーシスを誘導した mock 細胞の CL 量は変動しないこと, NAO の CLOOH への結合は未酸化の CL より極めて弱いことから¹⁵⁾, アポトーシスを誘導し

た mock 細胞での NAO 蛍光の減弱は CLOOH の生成によることを示唆している。NAO は CL の量的変動を観察できる試薬として広く用いられている。一酸化窒素, セラミドや p53 でアポトーシスを誘導した細胞の NAO 蛍光が減弱したことから, アポトーシス誘導により CL が減少したとしているが, これらのアポトーシスにおいても, 蛍光の減弱は CLOOH の生成によることも考えられる。

遊離脂肪酸によるアポトーシスの誘導も報告されている¹⁷⁾。Wu らはエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5) を多く含む魚油で飼育したヌードマウスに移植した乳がん細胞の増殖は 18:2 を多く含むコーン油で飼育したマウスに比較して強く抑制されることを見出した¹⁸⁾。この増殖抑制は EPA によるアポトーシスの誘導によることを示している。EPA は RBL2H3 細胞 (mock 細胞) のアポトーシスを誘導するが, ミトコンドリア型 PHGPx 高発現細胞はアポトーシスに耐性である¹⁹⁾。EPA によるアポトーシスはカスパーゼ阻害剤では抑制されないことやアポトーシス誘導因子 (AIF) 阻害剤で抑制されることから, カスパーゼに依存しない AIF による細胞死である。EPA はミトコンドリア内の Ca²⁺, ヒドロペルオキシドを上昇させる²⁰⁾。ミトコンドリアへの Ca²⁺流入の阻害剤であるルテニウムレッドはミトコンドリア内のヒドロペルオキシドの上昇, およびアポトーシスを抑制する。ミトコンドリアへの Ca²⁺流入によるアポトーシスの誘導にはミトコンドリア膜透過性遷移孔 (permeability transition pore, PTP) の開放が関与することは知られているが, その機構はよくわかっていない。PHGPx 高発現細胞では, ミトコンドリア内 Ca²⁺レベルは上昇するが, ヒドロペルオキシドの生成とアポトーシスの誘導は抑制される。このことはミトコンドリアの Ca²⁺レベルの上昇が直接 PTP の開口を誘発するのではなく, Ca²⁺の流入によって生成するヒドロペルオキシドが PTP の開口に関与していることを示している。ミトコンドリアの抗酸化酵素であるマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD)²¹⁾やグルタレドキシシン 2²²⁾の高発現細胞はアポトーシスに耐性であることから, ミトコンドリアで生成する過剰の活性酸素やヒドロペルオキシドがアポトーシス誘導の因子となると考えられる。活性酸素がアポトーシスを誘導する機構として, 脂質, タンパク質, 核酸などの酸化的変性, Ca²⁺レベルの上昇, 細胞内レドックスの変動による apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)/Jun kinase (JNK) の mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) 経路の活性化などが考えられている。しかし, リン脂質ヒドロペルオキシドを消去する抗酸化酵素である PHGPx を高発現することによって阻止されるアポトーシスでは, リン脂質ヒドロペルオキシドがアポトーシス誘導に関与していることを明確に示している。各リン脂質ヒドロペルオキシドの中でも, CL の過酸化は内膜の CL に結

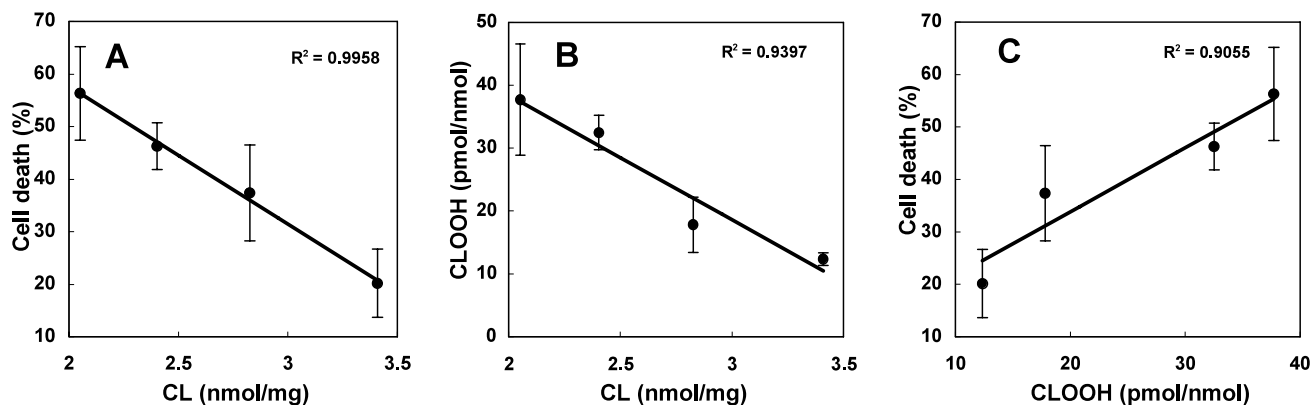


図3 CL量, 細胞死とCLOOHの生成量との相関

(A) CL量と細胞死との相関, (B) CL量とCLOOH生成量との相関, (C) CLOOH生成量と細胞死との相関。

合している *cyt. c* を遊離させることから, CLOOHがミトコンドリアを介するアポトーシス誘導の口火を切る指令分子であると考えられる。

アポトーシス誘導の鍵となる活性酸素やCLOOHの生成機構については, いくつかの機構が提唱されている。細胞内 Ca^{2+} の上昇により誘導されるアポトーシスでは, 活性化されたNADPHオキシダーゼが活性酸素を産生する²³⁾。 Ca^{2+} が溶質輸送担体であるPiCの高次構造を変化させることにより, ミトコンドリアのイオンの透過性が亢進し, 活性酸素が生成する²⁴⁾。ミトコンドリアに移行したBaxは活性酸素の産生を促進して, CLOOHの生成を誘発する²⁵⁾。過酸化水素の存在下では, CLと結合している *cyt. c* の立体構造が変化して, ペルオキシダーゼ活性を示すようになり, 近傍のCLが優先的に過酸化され, CLOOHが生成する²⁶⁾。いずれの機構においても, ミトコンドリア内に生成した活性酸素は他のリン脂質より不飽和度の高いCLを最大の標的として, 速やかにCLOOHを生成すると考えられる。

CLの減少はアポトーシスの感受性を高める。甲状腺機能低下²⁷⁾、虚血・再灌流²⁸⁾、老化²⁹⁾ではCLの減少が報告されており, いずれの病態でもアポトーシスの感受性が高まると考えられている。パルミチン酸(16:0)の添加によってCL合成の低下した心筋細胞では, *cyt. c* の放出によるアポトーシスが誘導される³⁰⁾。CL合成酵素(CLS)のノックダウン細胞ではCLは野生株の25%に減少し, TNF α やスタウロsporinによるアポトーシスの感受性が高まる³¹⁾。ホスファチジルグリセロリン酸合成酵素(PGPS)の発現の低下した温度感受性CHO変異株(M細胞)では, 40°Cで7日間培養することにより, CLは約50%に減少する³²⁾。一方, PGPS遺伝子をM細胞に導入した revertant 細胞(R細胞)のCLレベルは回復する。R細胞はスタウロsporinによるアポトーシスに耐性だが, M細胞では誘導される。M細胞の細胞死はCLの減少とともに増大す

ることから, CL量とアポトーシスの感受性とは負の相関を示す(図3A)。また, 細胞内のCLが減少するほど, スタウロsporinによるCLOOHの生成は増加する(図3B)。従って, アポトーシスの感受性とCLOOH生成の増加は正の相関関係にある(図3C)。アポトーシスを誘導した細胞のCLOOH生成が増加するほど, 容易に細胞死が誘導される。単離ミトコンドリアに16:0と Ca^{2+} を添加すると, 膜透過性の亢進による膨潤(swelling)が誘導され, *cyt. c* が放出される。M細胞の単離ミトコンドリアは16:0と Ca^{2+} により強い膨潤が誘導される(図4A)。CLを含むリポソームを融合することによってCLレベルを回復させたM細胞のミトコンドリアでは, 膨潤は抑制される。一方, R細胞のミトコンドリアでは顕著な膨潤は誘起されないが, CLOOHを含むリポソームと融合すると, 強い膨潤が誘導される(図4B)。このことはCLの低下やCLOOHの生成によるミトコンドリア膜の不安定化により, 透過性が亢進することを示している。また, CLOOHは電子伝達系の複合体活性を低下させることから^{28, 29, 33)}、電子伝達系の障害によって発生する活性酸素はさらなるCLOOHの生成を促進し, 膜透過性を亢進してアポトーシスの進行を増幅すると考えられる。

2) ミトコンドリアからの *cyt. c* の放出

cyt. c のミトコンドリアからの放出の第二の過程はミトコンドリア内膜から膜間腔に遊離した *cyt. c* のPTP, またはBaxなどから形成されるポア/チャンネルの通過によるミトコンドリア外への放出である。PTPはコンタクトサイトに形成されており, PTPの開閉を制御するANT, Baxと親和性を有する電位依存性アニオンチャンネル(voltage-dependent anion channel, VDAC)とシクロフィリンDなどから構成されている。ANTには6分子のCLが強固に結合しており, 界面活性剤処理によってもANTから解離しない⁶⁾。ANT活性の発現にはリシン残基に結合した6分

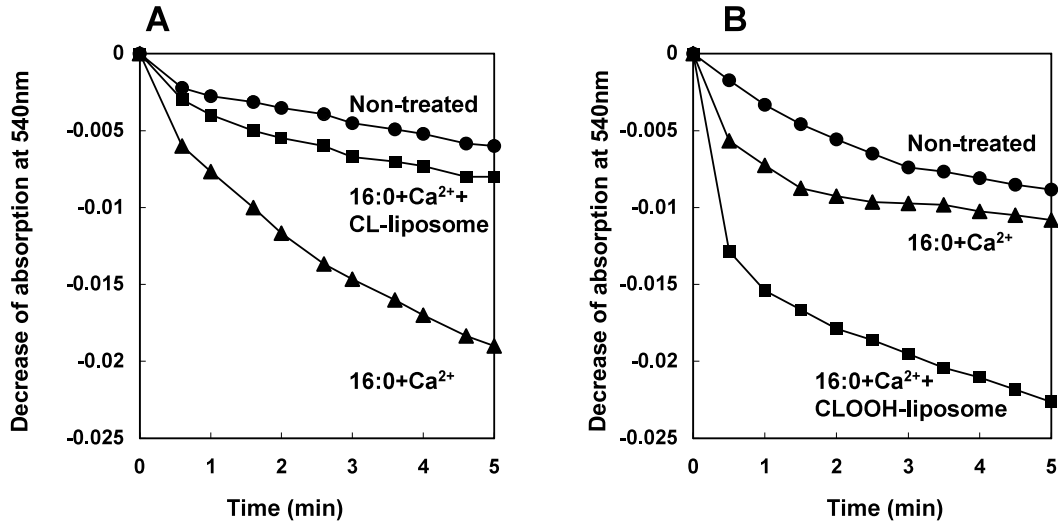


図4 M細胞とR細胞の単離ミトコンドリアの膨潤化反応

単離ミトコンドリアに16:0とCa²⁺を添加して、膨潤化を誘導した。膨潤化は540nmの吸光度の減少により評価した。(A) M細胞の単離ミトコンドリアの膨潤化、(B) R細胞の単離ミトコンドリアの膨潤化。

子のCLが必要である。ANTの特異的阻害剤であるボンクレキ酸はANTのマトリックス側に結合して、ANTの立体構造を変化(m-state)させることによりPTPを閉鎖する。一方、同じくANTの阻害剤であるアトラクチロシドはANTの膜間腔側に結合してANT構造を変化(c-state)させることによってPTPを開口する。活性酸素やCa²⁺の流入はPTPを開口してアポトーシス誘導因子を放出させる。どのようにANTの構造が変化するかについては不明だが、①システインに富むANT分子の活性酸素による酸化的な構造変化、②ANTの活性に必須であるCLにCa²⁺が結合することによるCLとANTとの親和性の変化、③CLOOHによるANTの構造変化などが考えられている。

先に述べたようにCLOOHを導入した単離ミトコンドリアでは容易に膨潤化され、cyt. cが放出される。この放出はPTPを閉鎖するシクロスポリンAやボンクレキ酸によって阻害されることから、CLOOHによる膨潤化やcyt. cの放出はPTPの開口によって誘導されると考えられる³⁴⁾。CLを含む再構成リポソームではANT活性は検出されるが、CLOOHを含む再構成リポソームではANT活性は検出されない³⁵⁾。CLとCLOOHを混合した再構成リポソームでは、CLOOHの比率が高くなるとともにANT活性は低下し、CLとCLOOHが同一の比率の再構成リポソームのANT活性は消失する。CLOOHはANTを不活性化して、PTPの開放、膨潤化、cyt. c放出の一連の反応を誘発する。

ANTはミトコンドリア溶質輸送担体ファミリータンパク質である。ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリータンパク質は約300アミノ酸からなる一本鎖ポリペプチドであり、六つの膜貫通領域と五つの膜外ループの共通の構造を

有している³⁶⁾。CLOOHはANTの高次構造を変化させることにより、疎水性領域の一部を膜表面に露出させることがANTペプチド抗体を用いて明らかとなった。ANTの細胞質側のループ(90~104アミノ酸残基のペプチドa)と膜貫通領域(115~129アミノ酸残基のペプチドb)に対する抗体(a, b)を作成し(図5C)、96穴プレートに固定したa, bペプチドと抗体の結合へのCLまたはCLOOHを含むANT再構成リポソームの添加による競合的阻害について検討した(図5B)。抗体aはCL、またはCLOOHのANT再構成リポソームと結合することにより吸収され、プレートに固定したペプチドaとの結合量は減少する(図5A)。両再構成リポソームによる阻害の程度に違いがないことから、ペプチド抗体aはCL、またCLOOH再構成リポソームのどちらにも同程度結合しており、CLOOHによるANTの高次構造の変化はない。一方、疎水性領域のペプチドbと抗体bとの結合はCL再構成リポソームを添加によっても阻害されないが、CLOOH再構成リポソームの添加では阻害される(図5A)。このことはCLOOH再構成リポソーム中のANTの構造は変化しており、膜に埋め込まれたペプチドbの一部が膜表面に露出し、抗体bと結合したことを示している。

アポトーシスの誘導によって多彩なCLOOH分子種の生成が予想されるが、どのようなCLOOH分子種が生成し、アポトーシス実行の過程に関与しているかの報告はほとんどない。Kaganらのグループはナノ-エレクトロスプレー質量分析計(ESI-MS)を用いて、 γ 線照射したマウスの小腸のlipidomicsを行った。CLOOHの主な分子種として、(18:2)₃(18:2-OOH)₁、(18:2)₂(18:2-OOH)₂、(18:2)₁(18:2-OOH)₃と(18:2-OOH)₄が検出された³⁷⁾。ホスファ

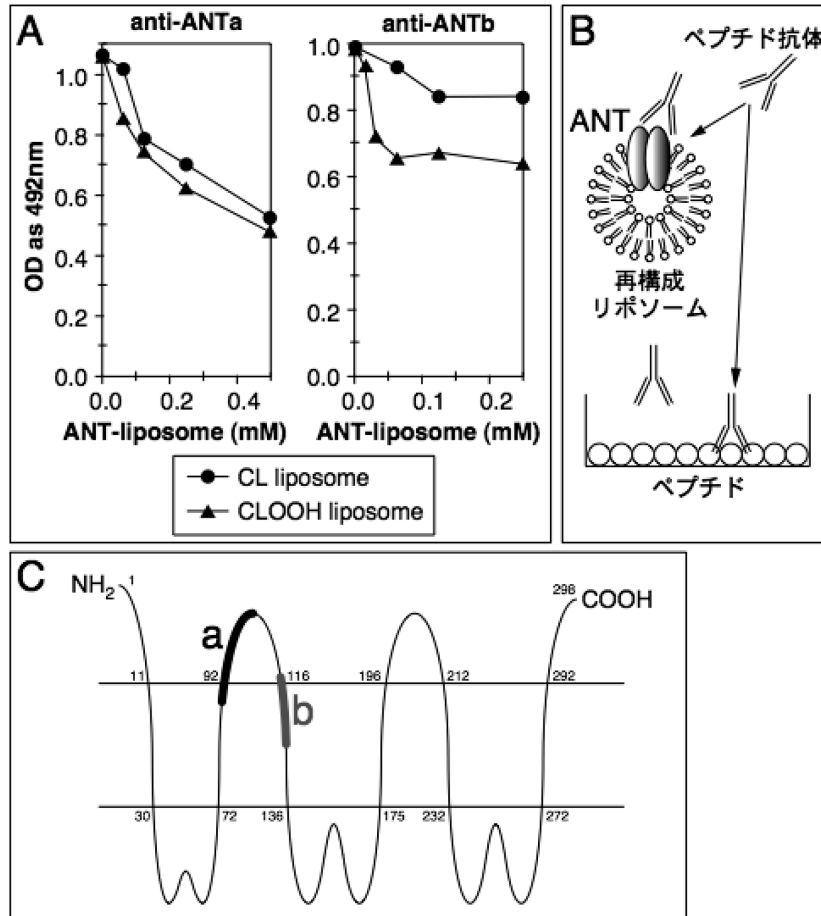


図5 ANTペプチドとペプチド抗体の結合へのANT再構成リポソームの競合的阻害

(A) CLまたはCLOOHを含むANT再構成リポソーム添加によるペプチドとペプチド抗体の結合への競合的阻害、(B) アッセイ系の概略：ANT再構成リポソームにペプチド抗体が結合すると、プレートに固定したペプチドと抗体の結合が減少する。(C) 抗体を作製したANTのペプチド領域。

チジルセリンヒドロペルオキシド (PSOOH) 分子種は検出されたが、PCやPEは高度不飽和脂肪酸を含むにもかかわらず、それらのヒドロペルオキシドは検出されなかった。スタウロスポリンでアポトーシスを誘導した脳神経細胞では、CLOOH、PSOOHとホスファチジルイノシトールヒドロペルオキシド (PIOOH) が生成するが、PCとPEのヒドロペルオキシドは検出されない³⁸⁾。CLOOH分子種では(16:1)₁(18:2)₂(22:6-OOH)₁と(18:1)₁(22:6)₁(18:0)₁(22:6-OOH)₁が検出される。アポトーシスとCLOOH分子種の研究は緒に就いたばかりであり、どのような分子種がアポトーシス実行に関わるのかについては、今後の解析を期待したい。

3) Bax, Bidとカスパーゼ8のミトコンドリアへの移行

CLのマイクロドメインはBax, Bidやカスパーゼ8などのアポトーシスの実行因子の集積の場である。FasLや

TNF α に誘導されるアポトーシスでは、カスパーゼカスケードの最上流にあるカスパーゼ8の活性化には二つの経路がある。デスドメインを介してアポトーシスが誘導されるtype I細胞では、カスパーゼ8はアダプター分子であるFADDで活性化される。一方、ミトコンドリアを經由してアポトーシスが誘導されるtype II細胞では、カスパーゼ8はミトコンドリアで活性化される。最近、GonzalvezらはCLの減少したBarth症候群患者のリンパ芽球細胞やtafazzinのノックダウンHeLa細胞はFasLによるアポトーシスに耐性であることを見出した³⁹⁾。HeLa細胞のミトコンドリアには活性型カスパーゼ8は検出されるが、ノックダウン細胞では検出されないことから、カスパーゼ8の活性化はミトコンドリアのCLマイクロドメインで行われることが明らかとなった。カスパーゼ8の活性化によるアポトーシス経路には、FasL→FADDによるカスパーゼ8活性化→カスパーゼ3の活性化→アポトーシスの経路と、

FasL→ミトコンドリアへの移行→CLマイクロドメインでのカスパーゼ8の活性化→Bidの活性化→cyt. *c*の放出→アポトーシスの経路がある。

細胞質のBidはカスパーゼ8によってN末端が切断されて活性型BidであるtBidとなり、速やかにミトコンドリア膜に移行する。LutterらはtBidのミトコンドリア外膜への移行の標的分子がCLであることを見出した⁴⁰⁾。tBidは遊離のCLとは親和性を示さず、生理的濃度のCLを含むリポソームへ選択的に結合する。一方、CLの減少したPGPS変異CHO細胞(M細胞)では、tBidのミトコンドリアへの移行は減少する。CLのリン酸基とtBidの塩基性領域である α ヘリックス4-6との分子間相互作用によって、tBidとCLは結合する。tBidがミトコンドリアのコンタクトサイトに存在していることやCLやPEが多く存在する膜に親和性を示すことから、tBidは二重層膜と非二重層構造のヘキサゴナルH_{II}相の混在した特異的なマイクロドメインを認識していると考えられる。tBidは酵母のミトコンドリアの電子伝達系を阻害するが、CLの欠損した変異酵母のミトコンドリアでは阻害が見られないことから、tBidは膜の透過性を高めるだけでなく、電子伝達系をも阻害する⁴¹⁾。

細胞質、またミトコンドリア膜に緩やかに結合した単量体のBaxは不活性だが、アポトーシス刺激によって多量化し、活性化される。細胞質のBaxはtBidとの相互作用によってミトコンドリア膜に挿入されて活性化される⁴²⁾。BaxのN末端の α ヘリックスはCLのマイクロドメインへの移行シグナルであり、膜の結合に必要な領域である⁴³⁾。tBidはBaxやBakとの多量体の形成に関与する⁴⁴⁾。この多量体化によって形成されたポア/チャンネルがどのようにアポトーシス実行因子を放出するかについての統一した見解は得られていない。cyt. *c*の外膜の通過はCLのマイクロドメインに形成されるBax/Bak四量体のポア/チャンネルによる⁴⁵⁾。また、BaxとVDACとの相互作用によりPTPを介してcyt. *c*を放出することも知られている。また、Baxのポア/チャンネルとPTPは互いに依存することなく、それぞれ独自でcyt. *c*の通過に関わるとする説とそれぞれ連携しているとする説がある。アポトーシスを誘導した神経細胞ではPTPを閉鎖するシクロスポリンAはBaxの膜への移行を阻止することから、Baxのポア/チャンネル形成にはPTPの開口が必要であると考えられる⁴⁶⁾。一方、アポトーシス刺激がなくてもミトコンドリアに移行する変異Baxを発現した細胞では、cyt. *c*の放出によるアポトーシスが誘導される。変異BaxによるアポトーシスはPTPを閉鎖するシクロスポリンAによって抑制されない。CLの欠損した変異酵母にBaxを強発現すると、cyt. *c*が放出されることなどから、Baxによるcyt. *c*の放出にはPTPやCLは関与しないと考えられる。また、ミリストイ

ル化したtBidはCLを有しないリポソームに結合すること、またミトコンドリアからのcyt. *c*の放出を促進する⁴⁷⁾。これらのことはcyt. *c*の放出に関わるBaxのポア/チャンネルがPTPやCLマイクロドメインとは異なった外膜にも形成されることを示している。

4) CLのミトコンドリア膜での分布の変動

ホスファチジルセリン(PS)のミトコンドリア外膜の内層(inner leaflet)から外層(outer leaflet)への移行(flip-flop)はアポトーシスの指標として用いられている。CLにおいてもアポトーシス誘導時に内膜でのflip-flopや内外膜での移行が観察される。スタウロスポリンでアポトーシスを誘導したHL60細胞では、内膜の内層のCLは外層に数分以内に移行する⁴⁸⁾。アポトーシス耐性のHCW-2細胞(変異HL60細胞)では、CLのflip-flopは起こらないことから、内膜でのCLの内層と外層の分布の乱れによる内膜構造(特にクリステ構造)の変化がアポトーシス誘導の一因になっていることも考えられる。

TNF α によるアポトーシスでは、刺激の初期にミトコンドリア膜表面にCLが移行する⁴⁹⁾。リン脂質輸送タンパク質(phospholipid scramblase, PLS)は膜結合酵素であり、膜間でリン脂質を双方向に輸送するタンパク質である。PLSは局在性の異なる4種の酵素があり、PLS3はミトコンドリアに存在しており、主に内膜のCLを外膜に輸送する。Ca²⁺結合領域を欠失した非活性型PLS3の高発現細胞では、CLの外膜への移動は抑制され、外膜CLは減少する。その結果、ミトコンドリアのサイズの縮小などの形態異常や呼吸鎖活性の低下が生じる^{50,51)}。また、この高発現細胞はtBidやUV照射によるアポトーシスに耐性となる。一方、活性型のPLS3の高発現によって外膜のCLが増加すると、ミトコンドリアのサイズが増大し、呼吸鎖活性が亢進する。tBidのミトコンドリアへの結合は増加し、アポトーシスの感受性が高まる。tBidはPLS3を活性化することから、外膜へのCLの移行は促進され、tBidの膜結合量はさらに増加し、アポトーシスの進行は加速される。このことはPLS3活性とtBid量は相互に正のフィードバックの関係にあることを示している。

CLはクリステ構造の構築に必要なリン脂質と考えられる。CLの減少したPGPS変異細胞³²⁾、Barth症候群患者のリンパ芽球⁵²⁾やtafazzinを欠失した酵母⁵³⁾のミトコンドリアのクリステ構造には明らかな異常が観察される。また、クリステの湾曲した膜構造の形成には“curvature phospholipid”であるCLやPEの集合が必要である。バクテリアの両サイドの先端部位(pole)にはCLが豊富に存在しており、湾曲の膜構造の形成に寄与していると考えられている⁵⁴⁾。CLが豊富に存在すると考えられているクリステにはcyt. *c*が高密度に集積しており⁵⁵⁾、アポトーシス誘導時

に遊離する *cyt. c* の主要な供給源となっている。外膜に *tBid* が結合すると、クリステ構造が変化し、クリステの *cyt. c* はミトコンドリア膜間腔に放出される⁵⁵⁾。CLの減少によるクリステ構造の変化はミトコンドリア内での *cyt. c* の再分布に大きく影響するであろう。また、電子伝達系の超複合体の活性はクリステ構造と密接に連携していることから⁵⁶⁾、クリステ構造の崩壊はエネルギー産生の低下も誘発して、アポトーシスの進行を促進することも考えられる。

3. おわりに

CLの生物的作用が他のリン脂質とは明らかに異なるのはその特徴的な分子構造による。CLは強い陰性の荷電、

疎水性を有し、ミトコンドリア膜に相分離したマイクロドメインを形成する。Ca²⁺存在下では、CLが集合することにより形成される非二重層のヘキサゴナルH_{II}構造はコンタクトサイトの構築には不可欠である。CL分子は円錐の形状であるため、湾曲したクリステなどミトコンドリア特有の構造の構築に寄与していると考えられている。また、多くのミトコンドリアタンパク質はCLと相互作用、または結合して、活性の発現に働く。したがって、CLの減少、脂肪酸組成の変動、CLOOHの生成、CLの内外膜での分布の変動はミトコンドリア膜の機能ドメインの崩壊、膜タンパク質の不活性化を誘発して、ミトコンドリア機能を大きく損なうことになる。アポトーシスの経路は誘導条件や細胞種などによって異なることを考慮する必要もある

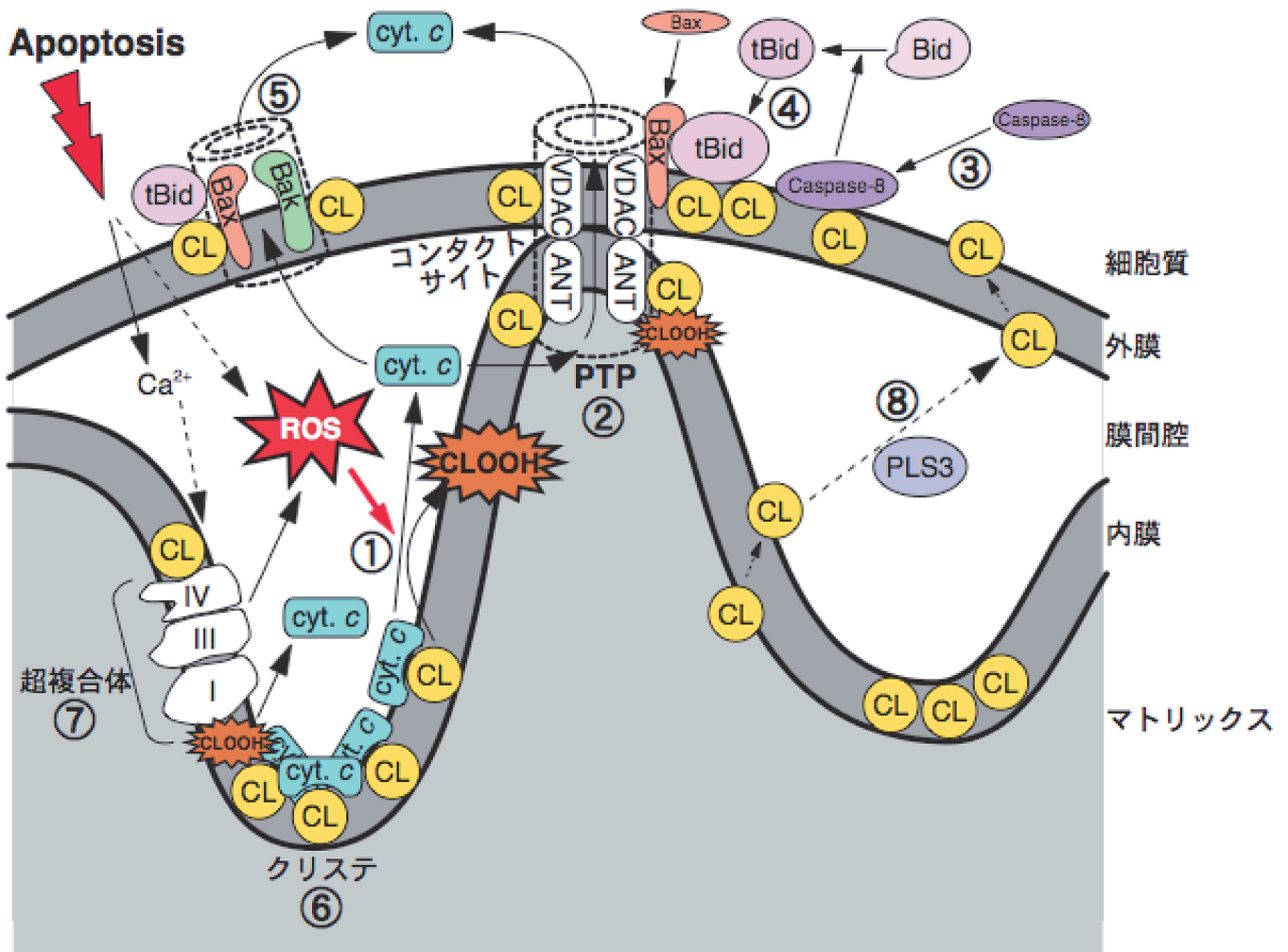


図6 CLまたはCLOOHが関与するアポトーシス誘導の過程

① *cyt. c* と結合しているCLが活性酸素 (ROS) によってCLOOHに酸化されると、*cyt. c* は膜間腔に遊離する。②CLOOHはANTを不活性化してPTPを開放して、*cyt. c* を漏出させる。③カスパーゼ8はCLのマイクロドメインに移行して活性化される。④Bidは活性化カスパーゼ8によって切断され*tBid* となり、CLのマイクロドメインに結合する。⑤*tBid* と会合したBaxはBakと多量化してポア/チャンネルを形成して、*cyt. c* を漏出する。⑥CLはクリステ構造の維持に必要なリン脂質であり、クリステはCLに結合した *cyt. c* が多く集積しており、膜間腔への *cyt. c* の主要な供給源となっている。⑦CLは電子伝達複合体の超複合体の高次構造を維持しており、*tBid* などで阻害されると不安定となり、ROSを発生する。⑧リン脂質輸送タンパク質3 (PLS3) は内膜のCLを外膜に移行してアポトーシスの誘導を促進する。アポトーシス誘導により、CLの内膜、外膜で flip-flop が起こる。

が、CLやCLOOHがミトコンドリアを介したアポトーシスの初期過程を制御する分子であることは明らかである。CLやCLOOHがアポトーシス誘導に関与する過程として、①内膜での cyt. c との結合と遊離、②ANTによるPTPの開閉の制御、③カスパーゼ8の外膜への移行と活性化、④tBidの結合ドメインの形成、⑤Baxの多量体のチャンネル/ポア形成、⑥クリステ構造の構築、⑦電子伝達系の超複合体構造の安定化、⑧膜分布の変動などがある(図6)。CL、CLOOHがアポトーシス研究で注目されるようになったきっかけは、2000年のCLOOHによるミトコンドリアからの cyt. c 放出に関する私たちの研究¹⁵⁾とtBidのミトコンドリア移行の標的分子としてのCLに関するLutterらの研究⁴¹⁾である。その後、多くの領域からの研究が報告されるようになり、tBid、BaxやANTとCLの結合様式の分子論的解析、CLの代謝変動によるアポトーシス誘導機構の解析、CLOOHの生成機構などの研究によって、CLやCLOOHがアポトーシス実行に重要な分子であることが明らかにされてきた。しかし、アポトーシス誘導時のCLの代謝や膜での分布の変動の機構、病態との関連、CLのマイクロドメインやコンタクトサイトの構造の形成と崩壊の機構など明らかにされなくてはならない課題は多い。

高度不飽和脂肪酸を有する成熟したCLの減少はBarth症候群で見られるような重篤な疾病を引き起こすことから、CLを構成している高度不飽和脂肪酸はミトコンドリア機能維持に深く関わっている。しかし、これまでのCL研究のほとんどは高度不飽和脂肪酸の少ない培養細胞や酵母で行われたものであり、CLの疾病への関与を理解するための情報は充分ではない。今後はCL合成酵素、再アシル化酵素やPLS3などCL代謝に関わる遺伝子を高発現、また破壊したマウスを樹立して、個体レベルでのCLの生理的意義や疾病との関与が明らかにされることを期待したい。

文 献

- Kiebish, M.A., Bell, R., Yang, K., Phan, T., Zhao, Z., Ames, W., Seyfried, T.N., Gross, R.W., Chuang, J.H., & Han, X. (2010) *J. Lipid Res.*, **51**, 2153-2170.
- Ardail, D., Privat, J.P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., & Louisot, P. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 18797-18802.
- Vonck, J. Schäfer, E. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 117-124.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., & Schägger, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 52873-52880.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., & Ryan, M.T. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 462-469.
- Beyer, K. & Klingenberg, M. (1985) *Biochemistry*, **3821-3826**.
- Pande, S.V., Murthy, M.S., & Noël, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **877**, 223-230.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Ramirez, S., Brückner, A., Kay, L., Polge, C., Epand, R.F., Lee, R.M., Lacombe, M.L., & Epand, R.M. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 2032-2047.
- Schlame, M. & Ren, M. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 5450-5455.
- Hauff, K.D. & Hatch, G.M. (2006) *Prog. Lipid Res.*, **45**, 91-101.
- Taylor, W.A. & Hatch, G.M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 30360-30371.
- Houtkooper, R.H. & Vaz, F.M. (2008) *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 2493-2506.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 1259-1263.
- Rytömaa, M. & Kinnunen, P.K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3197-3202.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T., & Nakagawa, Y. (2000) *Biochem. J.*, **351**, 183-193.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M. & Nakagawa, Y. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29294-29302.
- Maia, R.C., Culver, C.A., & Laster, S.M. (2006) *J. Immunol.*, **177**, 6398-6404.
- Wu, M., Harvey, K.A., Ruzmetov, N., Welch, Z.R., Sech, L., Jackson, K., Stillwell, W., Zaloga, G.P., & Siddiqui, R.A. (2005) *Int. J. Cancer*, **117**, 340-348.
- Koumura, T., Nakamura, C., & Nakagawa, Y. (2005) *Free Radic. Res.*, **39**, 225-235.
- Koumura, T., Nakamura, C., & Nakagawa, Y. (2005) *Free Radic. Res.*, **39**, 1083-1089.
- Pias, E.K., Ekshyyan, O.Y., Rhoads, C.A., Fuseler, J., Harrison, L., & Aw, T.Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 13294-13301.
- Enoksson, M., Fernandes, A.P., Prast, S., Lillig, C.H., Holmgren, A., & Orrenius, S. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 774-779.
- Kim, J.Y., Yu, S.J., Oh, H.J., Lee, J.Y., Kim, Y., & Sohn, J. (2010) *Apoptosis*, **16**, 347-358.
- Leung, A.W. & Halestrap, A.P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 946-952.
- Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N.A., & Kagan, V.E. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 145-150.
- Belikova, N.A., Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N., Kapralov, A. A., Tyurin, V.A., Potapovich, M.V., Basova, L.V., Peterson, J., Kurnikov, I.V., & Kagan, V.E. (2006) *Biochemistry*, **45**, 4998-5009.
- Paradies, G., Petrosillo, G., & Ruggiero F.M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 5-8.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolesse, M., Di Venosa, N., Federici, A., & Ruggiero, F.M. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 53-59.
- Paradies, G., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G., & Quagliarillo, E. (1997) *FEBS Lett.*, **406**, 136-138.
- Ostrander, D.B., Sparagna, G.C., Amoscato, A.A., McMillin, J. B., & Dowhan, W. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 38061-38067.
- Choi, S.Y., Gonzalez, F., Jenkins, G.M., Slomianny, C., Chretien, D., Arnoult, D., Petit, P.X., & Frohman, M.A. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 597-606.
- Kawasaki, K., Kuge, O., Chang, S.C., Heacock, P.N., Rho, M., Suzuki, K., Nishijima, M., & Dowhan, W. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 1828-1834.
- Musatov, A. (2006) *Free Radic. Biol. Med.*, **41**, 238-246.
- Petrosillo, G., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F.M., &

- Paradies, G. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 6311–6316.
- 35) Imai, H., Koumura, T., Nakajima, R., Nomura, K., & Nakagawa, Y. (2003) *Biochem. J.*, **371**, 799–809.
- 36) Aquila, H., Link, T.A., & Klingenberg, M. (1987) *FEBS Lett.*, **212**, 1–9.
- 37) Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Epperly, M.W., Greenberger, J.S., & Kagan, V.E. (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 299–314.
- 38) Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Feng, W., Mnuskin, A., Jiang, J., Tang, M., Zhang, X., Zhao, Q., Kochanek, P.M., Clark, R.S., Bayir, H., & Kagan, V.E. (2008) *J. Neurochem.*, **107**, 1614–1633.
- 39) Gonzalez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E. D., Brooks, D.G., Wanders, R.J., Petit, P.X., Vaz, F.M., & Gottlieb, E. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 681–696.
- 40) Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., & Wang, X. (2000) *Nat Cell Biol.*, **2**, 754–761.
- 41) Gonzalez, F., Bessoule, J.J., Rocchiccioli, F., Manon, S., & Petit, P.X. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 659–667.
- 42) Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D.W. (2008) *Cell.*, **135**, 1074–1084.
- 43) Sani, M.A., Dufourc, E.J., & Gröbner, G. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 623–631.
- 44) Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., & Schlesinger, P.H. (2000) *Cell Death Differ.*, **7**, 1166–1173.
- 45) Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., & Newmeyer, D.D. (2002) *Cell*, **111**, 331–342.
- 46) Precht, T.A., Phelps, R.A., Linseman, D.A., Butts, B.D., Le, S. S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., & Heidenreich, K.A. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 255–265.
- 47) Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., & Korsmeyer, S.J. (2000) *Science*, **290**, 1761–1765.
- 48) Garcia Fernandez, M., Troiano, L., Moretti, L., Nasi, M., Pinti, M., Salvioli, S., Dobrucki, J., & Cossarizza, A. (2002) *Cell Growth Differ.*, **13**, 449–455.
- 49) Sorice, M., Circella, A., Misasi, R., Pittoni, V., Garofalo, T., Cirelli, A., Pavan, A., Pontieri, G.M., & Valesini, G. (2000) *Clin. Exp. Immunol.*, **122**, 277–284.
- 50) Liu, J., Dai, Q., Chen, J., Durrant, D., Freeman, A., Liu, T., Grossman, D., & Lee, R.M. (2003) *Mol. Cancer Res.*, **1**, 892–902.
- 51) Liu, J., Epand, R.F., Durrant, D., Grossman, D., Chi, N.W., Epand, R.M., & Lee, R.M. (2008) *Biochemistry*, **47**, 4518–4529.
- 52) Acehan, D., Xu, Y., Stokes, D.L., & Schlame, M. (2007) *Lab. Invest.*, **87**, 40–48.
- 53) Claypool, S.M., Boontheung, P., McCaffery, J.M., Loo, J.A., & Koehler, C.M. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 5143–5155.
- 54) Huang, K.C., Mukhopadhyay, R., & Wingreen, N.S. (2006) *PLoS. Comput. Biol.*, **2**, e151.
- 55) Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., & Korsmeyer, S.J. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 55–67.
- 56) Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.P., & Velours, J. (2002) *EMBO J.*, **21**, 221–230.
-