

84 心筋ミトコンドリア局在蛋白キナーゼ系の構成と機能	三浦 哲嗣
------------------------------------	--------------

【目的】 細胞壊死誘導機構であるミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore、mPTP) を制御する蛋白キナーゼが、ミトコンドリア内でどのように局在し機能連関しているのか解明することを目的とした。

【方法】 心筋細胞株 H9c2 細胞、HEK293 細胞、ラット心筋サンプルを用い、ミトコンドリア単離キットならびに段階的遠心分離法によってミトコンドリアを単離したうえで段階的トリプシン処理を行い、外膜、内膜、マトリックスそれぞれのマーカー蛋白を基に、外膜溶解、内膜溶解、マトリックス蛋白溶解後のサンプルを調整し、Akt、ERK、GSK-3βと関連ホスファターゼのミトコンドリア内分布を Western blotting で同定した。細胞保護シグナル活性化のミトコンドリア局在蛋白キナーゼ/ホスファターゼへの影響を解析するため、培養細胞を insulin-like growth factor-1 (IGF-1、50 nM) で 45 分間処理した群、酸化ストレスの影響を解析するため、mitochondrial complex III 阻害薬である antimycin A (AA、100 μM) に 30 分間暴露した群、また AA と IGF-1 の両者で処理した群を設けた。蛋白キナーゼ、ホスファターゼの機能関連を明らかにするため、siRNA を用いて標的蛋白の発現を抑制した。細胞死は、培養液中の LDH 放出量を指標に定量した。

【結果】 ミトコンドリアの段階的トリプシン処理においてトリプシン 0 μg/ml 処理と 1 μg/ml 処理の差をミトコンドリア外膜でのレベル、1 μg/ml 処理と 1,000 μg/ml 処理の差をミトコンドリア内膜レベルと評価した (下図)。生理的な条件 (Control) では、ERK、GSK-3βは主にミトコンドリア外膜に、Akt は外膜、内膜とも同程度に存在した。

蛋白ホスファターゼとして、これまで報告のあった PHLPP1 に加え、核にのみ局在するとされていた DUSP5 がミトコンドリアに存在することを、Western blotting と GFP-DUSP5 の発現実験で見出した。

酸化ストレスは、細胞質の DUSP5、PHLPP1 のミトコンドリア移行、外膜での ERK と Akt の脱リン酸化、それらの下流にある GSK-3βリン酸化の減弱、非リン酸化 GSK-3βと cyclophilin D との結合増加をもたらし、細胞死を誘導した。siRNA を用いた DUSP5 の発現抑制は酸化ストレスによる細胞死を有意に抑制した。

IGF-1 による細胞保護シグナルの起動は、ERK、Akt、GSK-3βの細胞質からミトコンドリア外膜への移行の増加とそれらの外膜、内膜でのリン酸化を亢進させ、酸化ストレスによる細胞死を抑制した。

以上の結果と我々既報の成績を総括すると、酸化ストレスによる mPTP の開口には、PHLPP1 と DUSP5 のミトコンドリア移行による Akt、ERK 脱リン酸化を介した細胞保護シグナルの遮断が寄与していること、また細胞保護シグナルによって mPTP と直接結合し抑制的に機能するリン酸化 GSK-3βのレベルは、細胞質からミトコンドリアへの GSK-3βの移行と、外膜での Akt によるリン酸化、また内膜での ERK によるリン酸化によって制御されていることが考えられた。

ミトコンドリア部分分解サンプルの蛋白キナーゼレベル
細胞保護シグナル活性化 (IGF-1)、酸化ストレス (AA) の影響

