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



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

札幌医科大学 医学部 循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座

Key words：細胞死，DUSP5，ミトコンドリア，ミトコンドリア蛋白キナーゼ系，蛋白ホスファターゼ

緒　言

心疾患による死亡原因として最も重要な急性心筋梗塞と慢性心不全のいずれにおいても、経時的に進行する心筋細胞死が病態の不可逆性に寄与していること、またその細胞死に複数の機序（ネクローシス、アポトーシス、ネクロプトーシスなど）が関与することが近年明らかにされ、ミトコンドリアはこれらいずれの細胞死の機序にも関与している［1, 2］。心筋細胞のネクローシスには、ミトコンドリア内膜に存在する透過性遷移孔（mitochondrial permeability transition pore、mPTP）の開口が直接的な機序として関与している［3］。mPTP は活性酸素ならびにミトコンドリア Ca^{2+}過負荷によって不可逆的に開口し、ミトコンドリア膜電位を消失させて細胞死を誘導する。mPTP の開口閾値は複数の因子によって制御されており、そのひとつに GSK-3βがある。我々は、酸化ストレスによって、細胞質内の GSK-3βがその活性依存的に VDAC2 と結合してミトコンドリアに移行し、mPTP と結合することでその開口閾値を低下させることを最近報告した［4］。一方、G 蛋白連関受容体や受容体チロシンキナーゼには、細胞を細胞死から保護するシグナル伝達を起動するものが存在し、その細胞保護には Akt などの蛋白キナーゼのミトコンドリア移行や、ミトコンドリアにおける ERK や GSK-3βリン酸化を伴っていることが、我々を含め複数のグループによって観察されている［3〜6］。しかし、蛋白キナーゼ系がどのようにミトコンドリア内に局在し、細胞死誘導刺激や細胞保護シグナルの活性化とどのような機能関連があるのかについて系統的に解析した結果は報告されていない。

本研究では、細胞保護に寄与する蛋白キナーゼとして虚血プレコンディショニング（ischemic preconditioning、IPC）の心筋保護効果に寄与が知られている Akt、ERK、GSK-3β、［3, 5］に注目し、蛋白ホスファターゼと併せて、細胞保護シグナルならびに酸化ストレスによる細胞死誘導に対してどのように応答し、機能関連しているかを解析した。実験には、培養心筋細胞株 H9c2 細胞、HEK293 細胞、ラット心室筋細胞から単離したミトコンドリアを用い、細胞保護シグナルの活性化には IPC mimetic の一つである insulin-like growth factor-1（IGF-1）を、酸化ストレスによる細胞死（ネクローシス）の誘導にはミトコンドリア complex Ⅲ阻害薬である antimycin A（AA）を用いた。

方法および結果

1. ミトコンドリアの単離とミトコンドリアサブフラクションの解析

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。培養細胞からのミトコンドリアを用い、トリプシン 0〜1,000 μg/ml による段階的な膜分解を行い、ミトコンドリア外膜、内膜、マトリックスそれぞれのマーカー蛋白として、TOMM20、prohibitin、cyclophilin D を用い、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た（図 1）。図 1 の結果から、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。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。

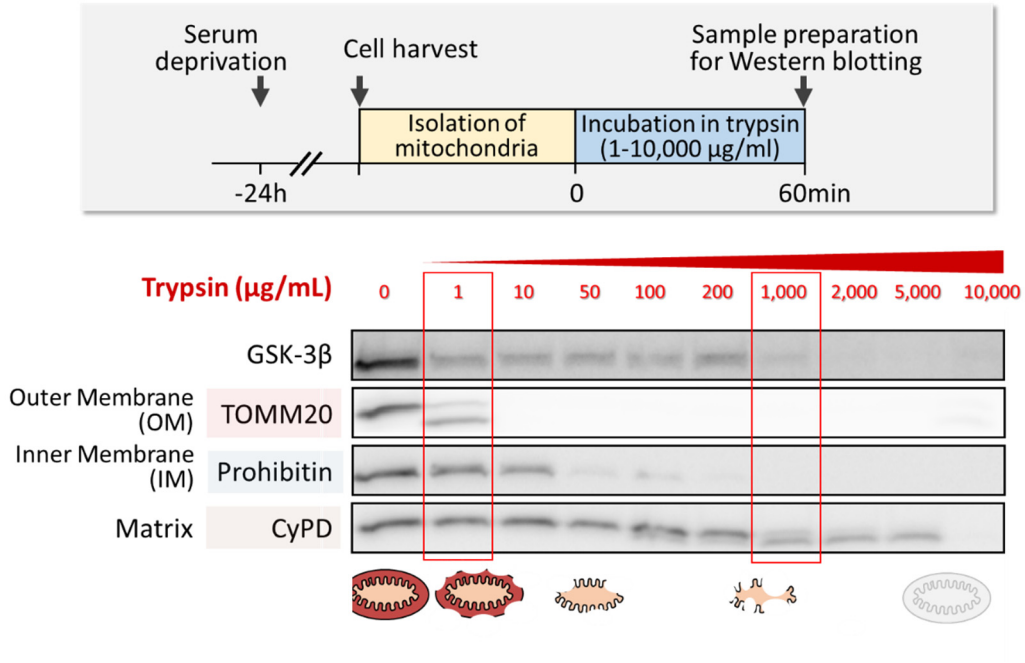


図 1. 単離ミトコンドリアの段階的膜分解によるミトコンドリアサブフラクションの解析
トリプシン 0～1,000 μg/ml 処理後のミトコンドリアサンプルにおける GSK-3β と、ミトコンドリア外膜、内膜、マトリックスそれぞれのマーカー蛋白レベル。最下段はミトコンドリア部分分解の模式図。

2. 細胞保護シグナルの活性化ならびに酸化ストレスが、ミトコンドリア局在蛋白キナーゼに及ぼす影響

細胞保護シグナル活性化には、培養細胞を IGF-1（50 nM）で 45 分間処理し、酸化ストレス誘導には、細胞を AA（100 μM）に 30 分間暴露した。また IGF-1 と AA の両者で処理した群も設けた。IGF-1 処理により、GSK-3β、Akt、ERK すべてのミトコンドリア移行とリン酸化が増加し、ミトコンドリア内膜でのリン酸化 ERK、リン酸化 GSK-3β レベルが有意に上昇した（図 2）。一方、AA 処置によって GSK-3β、ERK のミトコンドリア移行が誘導されたが、ERK、Akt、GSK-3β全てのリン酸化レベルが有意に減少した。AA 処置による Akt、GSK-3βの脱リン酸化は、IGF-1 前処置によって軽減したが、ERK の脱リン酸化には影響が見られなかった（図 2）。また、その Akt、GSK-3βの脱リン酸化に対する IGF-1 の抑制効果は、主にミトコンドリア外膜で認められた。

3. 酸化ストレスによるミトコンドリア局在蛋白ホスファターゼの変化

酸化ストレスにより、ミトコンドリアに局在する ERK、Akt、GSK-3βのリン酸化レベルが低下したことと（図 2）、GSK-3βは Akt、ERK によってリン酸化される器質であることから、Akt、ERK それぞれの蛋白ホスファターゼである PHLPP1、DUSP5 のミトコンドリア局在を検討した。PHLPP1 は主にミトコンドリア外膜に存在し、AA 処理により PHLPP1 のミトコンドリア移行が誘導され、外膜の PHLPP1 は約 2 倍に増加した。また、これまで DUSP5 は核のみに局在するとされていたが、ミトコンドリアにも存在することを単離ミトコンドリアサンプルの Western blotting、培養細胞に発現させた GFP-DUSP5 とミトコンドリアとの共局在から示すことが出来た。DUSP5 も PHLPP1 同様に、主にミトコンドリア外膜に存在し、AA 処理により約 1.5 倍に増加した。DUSP5 のミトコンドリア局在は、ラット心室筋細胞においても確認した。

4. 酸化ストレスによる細胞死における DUSP5 の寄与

AA 処置による細胞死を培養液中の LDH 量として定量した。AA 処置後の細胞死は、siRNA を用いた DUSP5 のノックダウンによって約 40%減少した。この細胞死抑制効果は、IGF-1 前処置の効果とほぼ同等であった。

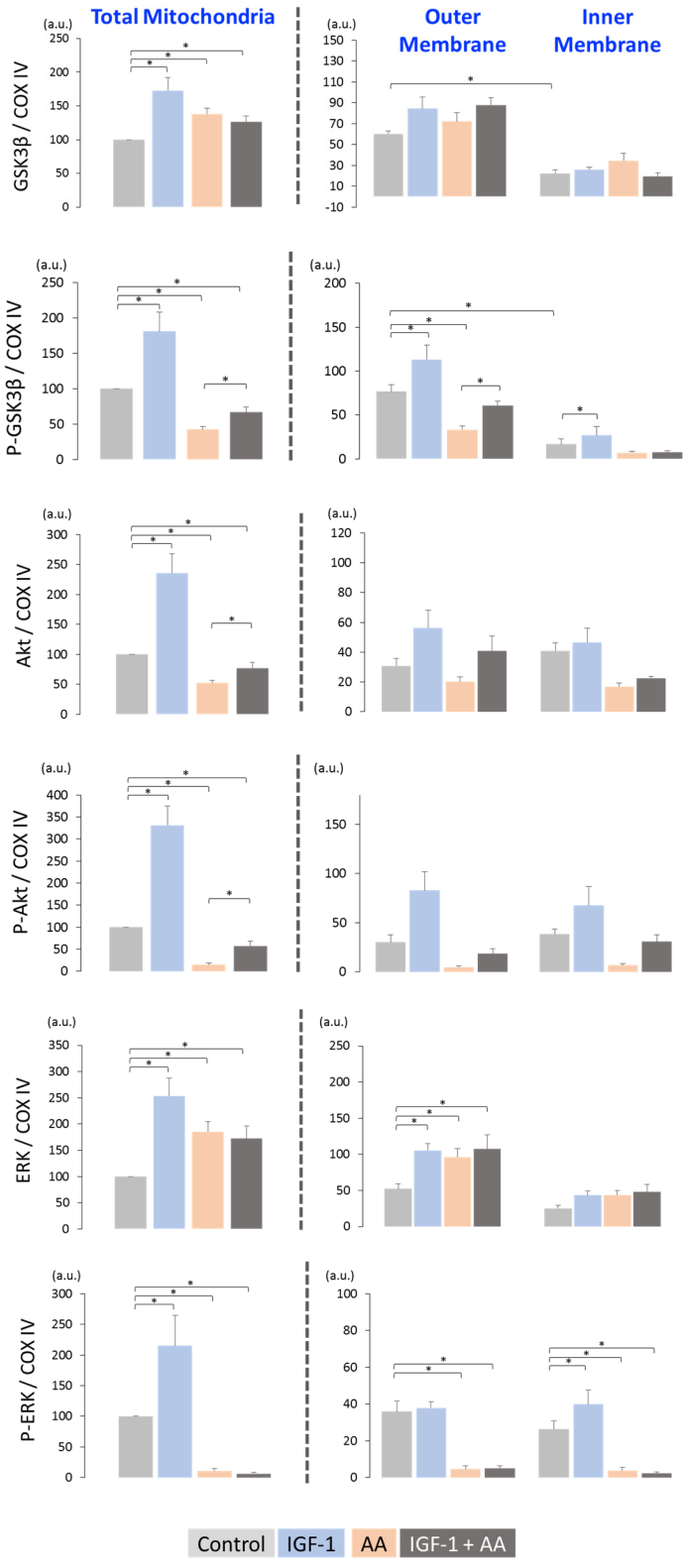


図 2. 細胞保護シグナル活性化、酸化ストレスによるミトコンドリア蛋白キナーゼの局在変化とリン酸化

IGF-1 = insulin-like growth factor-1, AA = antimycin A, *p < 0.05（one-way ANOVA）

考　察

我々は、酸化ストレスによる心筋細胞のネクローシスには、恒常活性型である Ser9 非リン酸化 GSK-3βがミトコンンドリアに移行し、ミトコンドリア内膜上の mPTP との相互作用することが mPTP 開口に寄与すること、また IPC やその mimetics による細胞保護シグナルの活性化は、PKC と Akt を介した GSK-3β-Ser9 のリン酸化をもたらし、そのリン酸化 GSK-3βと mPTP の結合が、mPTP 開口閾値の上昇や、開口した mPTP の再閉鎖の促進に寄与することを報告してきた［3〜6］。しかし、生理的には主に細胞質に存在する GSK-3βが、細胞保護シグナルの活性化により細胞内のどの部位でリン酸化を受け、mPTP との相互作用を制御をされているのかは不明であった。本研究の成績から、IGF-1 を用いた細胞保護シグナルの起動によって、GSK-3βだけでなく、GSK-3βリン酸化を制御する Akt、ERK がミトコンドリアに移行し、いずれも主にミトコンドリア外膜領域で蛋白レベルが増加することが示された。さらに、リン酸化 Akt は主にミトコンドリア外膜領域で、リン酸化 ERK は主にミトコンドリア内膜領域で増加し、GSK-3βリン酸化をもたらす蛋白キナーゼが、GSK-3βのミトコンドリア内局在によって異なることが示唆された。すなわち、ミトコンドリアに新たに移行した GSK-3βのリン酸化にはミトコンドリア外膜の Akt が、mPTP と既に結合している GSK-3βのリン酸化にはミトコンドリア内膜の ERK が重要であると考えられる。

本研究では、DUSP5 が核だけではなくミトコンドリアにも局在することを初めて明らかにし、酸化ストレスによる DUSP5 のミトコンドリア移行が、細胞保護的な ERK-GSK-3βシグナルの抑制と細胞死誘導に関連することを見出した。また、PHLPP1 も酸化ストレスによってミトコンドリア移行が増加し、Akt 脱リン酸化と関連していた。これらの知見は、酸化ストレスの細胞傷害性に、ミトコンドリア内での細胞保護シグナルの遮断が関与することを示すものであり、DUSP5 や PHLPP1 のミトコンドリア移行を阻害することが新たな細胞保護のアプローチとなる可能性が考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、札幌医科大学医学部循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座の大和田渉研究生、丹野雅也准教授である。

文　献

1) Moe GW, Marin-Garcia. Role of cell death in the progression of heart failure. Heart Fail Rev. 2016 Mar; 21(2):157-67. doi: 10.1007/s10741-016-9532-0. PMID: 26872675
2) Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, Dhalla NS. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. Heart Fail Rev. 2016 Mar;21(2):213-21. doi: 10.1007/s10741-016-9537-8. PubMed PMID: 26872672.
3) Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. Cardiovasc Res. 2012 May 1;94(2):181-9. doi: 10.1093/cvr/cvr302. Epub 2011 Nov 9. PubMed PMID: 22072634
4) Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Horio Y, Miura T. Translocation of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by interaction with voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2). J Biol Chem. 2014 Oct 17;289(42):29285-96. doi: 10.1074/jbc.M114.563924. Epub 2014 Sep3. PubMed PMID: 25187518
5) Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. Cardiovasc Res. 2010 Oct 1;88(1):7-15. doi: 10.1093/cvr/cvq206. Epub 2010 Jun 18. PubMed PMID: 20562423

6) Sunaga D, Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Ogasawara M, Yano T, Miki T, Miura T. Accelerated recovery of mitochondrial membrane potential by GSK-3β inactivation affords cardiomyocytes protection from oxidant-induced necrosis. PLoS One. 2014 Nov 12;9(11):e112529. doi: 10.1371/journal.pone.0112529. eCollection 2014. PubMed PMID: 25390651