

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590858

研究課題名(和文) ミトコンドリアと核のクロストーク: イノシトール三リン酸受容体を介するシグナリング

研究課題名(英文) Crosstalk between mitochondria and nucleus: signaling via inositol-3-phosphate receptor

研究代表者

林 秀晴 (HAYASHI HIDEHARU)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50135258

研究成果の概要(和文): カルモジュリンとカルシウムカルモジュリンカイネース(CaM/CaMKII)により、活性酸素種の産生を介してミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)は開口し、膜電位($\Delta\Psi_m$)は脱分極した。これらの効果は、筋小胞体から放出される Ca^{2+} の上昇により調節されており、筋小胞体とミトコンドリア間のcross-talkが証明された。また、 Ca^{2+} の上昇は核内転写因子の調節にも関与していることが示唆された。一方、glycogen synthase kinase-3 β によるmPTPの開口は、ミトコンドリアとhexokinase IIの結合に依存することが示され、ミトコンドリアにおけるシグナル伝達における機構の一部が解明された。

研究成果の概要(英文): Mitochondrial PTP opened and $\Delta\Psi_m$ depolarized by CaM/CaMKII via the production of reactive oxygen species. These effects were regulated by an elevation of Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum, showing the cross-talk between SR and mitochondria. An elevation of Ca^{2+} could also regulate the nuclear transcription factor. Opening of mPTP by GSK3 β was shown to be dependent on the binding of hexokinase II, which explains one mechanism of signaling transduction in mitochondria.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：心臓病学、心臓細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア、共焦点レーザー顕微鏡、細胞内 Ca^{2+} 、ミトコンドリア膜透過性遷移孔、膜電位、カルモジュリン、glycogen synthase kinase-3 β 、hexokinase II

1. 研究開始当初の背景

(1) イノシトール3リン酸受容体(IP₃レセプター)は平滑筋や内皮細胞などで報告されているが、心筋のIP₃レセプターの

役割については(特に Ca^{2+} regulationとの関係は)明らかになっていない。

(2) 近年IP₃レセプターが核のエンベロップに非常に多く分布していることが

明らかになった。さらに、 IP_3 レセプターの刺激により、核エンベロップから Ca^{2+} が放出され、この Ca^{2+} 濃度の上昇は核内のカルモジュリンとカルシウムカルモジュリンカイネース (CaMKII) を活性化することが報告された。この核内のCaMKIIの活性化は核内転写因子を調節して、心肥大を起こす遺伝子を発現する。

(3) この IP_3 と核エンベロップからの Ca^{2+} 放出を介した病的な遺伝子発現の活性化はエンドセリンなどにより心肥大を誘発する機構の新しい細胞内シグナリングカスケードとして注目され、今まで明らかでなかった心筋細胞における IP_3 レセプターの役割について新しい概念を提唱している点で注目される。

(4) 以前より RYR を介した筋小胞体 (SR)からの Ca の放出により局所の Ca^{2+} 濃度が上昇して、近接するミトコンドリアの uniporter を介してミトコンドリアに取り込まれ、ミトコンドリア内膜の膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の脱分極やミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_m$)の上昇などを来たすいわゆる SR とミトコンドリアとの Ca^{2+} を介した cross-talk が報告されている。

(5) 核の周囲にはミトコンドリアが高密度で分布していることが知られており、また核内の転写因子の調節や遺伝子発現にはエネルギーを必要とすることから、核エンベロップから放出された Ca^{2+} が核膜から拡散して核周囲に存在するミトコンドリアの代謝に影響を与えている可能性がある。すなわち核とミトコンドリアの Ca^{2+} を介した cross-talk が存在する可能性が考えられる。しかし、心筋細胞レベルにおいて、 IP_3 レセプター刺激時のミトコンドリア機能への効果

を明らかにした報告はなく、その詳細については不明である。

2. 研究の目的

- (1) 細胞膜除去細胞において、 IP_3 レセプター刺激時の (a) $\Delta\Psi_m$ 、 pH_m 、 $[Ca^{2+}]_m$ 、フリーラジカルの産生、ミトコンドリア酸化還元状態の変化、mPTPの開口とその kinetics について検討し、(b) $[Ca^{2+}]_m$ や $\Delta\Psi_m$ 動態の動態を調節する uniporter、 Na^+/Ca^{2+} 交換機構、 H^+/Ca^{2+} 交換機構の関与について検討し、核および SR とミトコンドリアとの cross-talk を明らかにする。
- (2) 持続的心肥大誘発モデルにおいて、病態発現に IP_3 を介したシグナルカスケードとミトコンドリアが関与しているかを明らかにし、肥大心におけるミトコンドリアの治療標的としての意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

- (1) ラットの心筋細胞をサポニンにより細胞膜除去処理した後に、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) は tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) を、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) 開口の指標に calcein を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の指標に 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF)を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により測定した。
- (2) ラット心室筋の単離ミトコンドリアを用いてミトコンドリアと結合した hexokinase II (HKII) をウェスタンブロットと電子顕微鏡を用いて測定した。

4. 研究成果

- (1) ミトコンドリアの機能の細胞内 Ca^{2+} とCaM/CaMKIIによる調節:

心筋細胞において、細胞内 Ca^{2+} とカルモジュリン (CaM) およびCaM依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。[結果](1) CaM

投与により、40 分後に $\Delta\Psi_m$ は前値の $53.4 \pm 3.7\%$ ($p<0.05$) に低下し、 $\Delta\Psi_m$ は CaM の濃度依存性に低下した。CaM の $\Delta\Psi_m$ に対する効果は、CaM および CaMKII の阻害薬である W-7 と autocalmitide 2-related inhibitory peptide により抑制された。同様に mPTP の開口を示唆する calcein の蛍光強度も $73.5 \pm 1.9\%$ ($p<0.05$)と低下し、この効果も AIP により抑制された。さらに mPTP の阻害薬である cyclosporin A は $\Delta\Psi_m$ と calcein の低下を抑制した。(2) CaM 投与により DCF の蛍光強度は前値の 8.4 倍 ($p<0.05$) に速やかに上昇し、上昇は ROS の消去剤である Trolox により抑制された。Trolox は $\Delta\Psi_m$ と calcein を低下のいずれも抑制した。(3)細胞内 Ca^{2+} を BAPTA によりキレートとすると CaM の $\Delta\Psi_m$ と mPTP、および ROS 産生に対する効果は減弱した。また thapsigargin により SR の Ca^{2+} 含有量を減少させると、CaM の $\Delta\Psi_m$ と mPTP および ROS 産生に対する効果は減弱した。[考察] CaM/CaMKII により、ROS の産生を介して mPTP は開口し、 $\Delta\Psi_m$ は脱分極した。これらの効果は、筋小胞体 から放出される Ca^{2+} の上昇により調節されていた。これらのシグナルは心不全の成立に関連しており、今後の心不全に対する新しい治療のターゲットとして期待される。また、 Ca^{2+} の上昇は核内転写因子の調節にも関与していることが示唆される。

(2) ミトコンドリアPTPとGSK3 β の調節におけるhexokinase IIの役割：

虚血再灌流障害の抑制にミトコンドリアの permeability transition pore (mPTP) の機能が注目されている。glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)の mPTP に対する効果と、そのメカニズムについて研究した。[結果] (1) GSK3 β (10 nM) は calcein 強度を低下させ (投与前の $79.2\pm 1.3\%$, $p<0.01$)、これは

cyclosporine A (CsA, mPTP の阻害薬: 100 nM)、または SB216763 (SB21, GSK3 β の阻害薬、3 μ M) により阻害された ($90.4\pm 1.8\%$, $92.1\pm 1.2\%$, $p<0.01$)。(3) 無グルコースもしくはグルコース 6 リン酸の灌流により、GSK3 β による mPTP の開口は抑制され (各々 $91.5\pm 1.5\%$, $88.7\pm 1.4\%$, $p<0.01$)、GSK3 β の mPTP への作用はグルコース代謝に関係していることが示唆された。(4) DCCD (1 μ M) によるミトコンドリアからの HKII の解離は、GSK3 β による mPTP 開口を増強した ($59.3\pm 1.5\%$, $p<0.01$)。(5) 電子顕微鏡とウェスタンブロットにより、GSK3 β は HKII のミトコンドリアへの結合が減少し、虚血再灌流モデルにおいて HKII とミトコンドリアの結合は低下し、GSK3 β の阻害薬である SB21 によりこの結合低下は抑制された。[考察]GSK3 β によるミトコンドリア PTP の開口は、ミトコンドリアと HKII の結合に依存する。以上より、ミトコンドリアにおけるシグナル伝達における機構の一部が解明された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1) Shiraki K, Satoh H, Saitoh T, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H: Comparison of global and regional abnormalities in 99m Tc-sestamibi and cardiac magnetic resonance imaging in dilated cardiomyopathy. J. Cardiac. Fail. 16: 641-648, 2010.
- (2) Satoh H, Matoh F, Shiraki K, Saitoh T, Odagiri K, Saotome M, Usushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H: Delayed enhancement on cardiac magnetic

- resonance and clinical, morphological and electrocardiographical features in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Cardiac Fail.* 15: 419-427, 2009.
- (3) Odagiri K, Katoh H, Kawashima H, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46: 989-997, 2009.
- (4) Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296: H1125-H1132, 2009.
- (5) Kawashima H, Satoh H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the Ca^{2+} loading of the sarcoplasmic reticulum without changing its Ca^{2+} release. *Circ. J.* 73: 1133-1140, 2009.
- (6) Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H: Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca^{2+} entry via non-selective cation channels. *Cardiovasc. Res.* 83:97-105, 2009.
- (7) Asai M, Takeuchi K, Uchida S, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Yamada S, Hayashi H, Watanabe H: Misinterpretation of the effect of amlodipine on cytosolic calcium concentration with fura-2 fluorospectrometry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377: 423-427, 2008.
- (8) Matoh F, Satoh H, Shiraki K, Odagiri K, Saitoh T, Urushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H: The usefulness of delayed enhancement magnetic resonance imaging for diagnosis and evaluation of cardiac function in patients with cardiac sarcoidosis. *J. Cardiol.* 51: 179-188, 2008.
- (9) Tominaga H, Katoh H, Odagiri K, Takeuchi Y, Kawashima H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H105-H112, 2008.
- [学会発表] (計 5 件)
- (1) Kawashima H, Satoh H, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor 1 (I-1) augments protein kinase A-dependent increase in SR Ca^{2+} loading without changing SR Ca^{2+} release events. The 72th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2008.3. Fukuoka.
- (2) Odagiri K, Katoh H, Tominaga H, Kawashima H, Takeuchi Y, Tanaka T, Ohtani H, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Local control of mitochondrial membrane potential and permeability transition pore by calcium and calmodulin in rat ventricular

myocytes. The 72th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2008.3. Fukuoka.

(3) Otani H, Katoh H, Tominaga H, Odagiri K, Takamitsu Y, Tanaka T, Urushid T, Satoh H, Hayashi H: Dual effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition in rat ventricular myocytes. The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2008.3. Fukuoka.

(4) Katoh H, Kumazawa A, Tanaka T, Nobuhara M, Otani H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Binding of Hexokinase to Mitochondria is Involved in the Regulation of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Glycogen Synthase Kinase-3 β . XX World Congress of the International Society for Heart Research, 2010.5. Kyoto

(5) Satoh H, Kawashima H, Saotome M, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor-1 can augment a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca²⁺ loading without changing the SR Ca²⁺ release. The 20th World Congress of International Society of Heart Research, 2010.5. Kyoto.

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 林秀晴: 再灌流障害. 循環器疾患最新の治療. 2010-2011. 南江堂. P123-125, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀晴 (HAYASHI HIDEHARU)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50135258

(2) 研究分担者

佐藤 洋 (SATO HHIROSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30293632
加藤 秀樹 (KATOH HIDEKI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80314029