

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591086

研究課題名(和文)ミトコンドリア透過性遷移孔を制御する蛋白キナーゼ系の解析

研究課題名(英文)Protein kinases regulating the mitochondrial permeability transition pore

研究代表者

三浦 哲嗣(Tetsuji, Miura)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア透過性遷移孔(mPTP)の構成蛋白とキナーゼの関連を解析し、1) PTP開口閾値がシクロフィリンD(CypD)と無機リン輸送担体(PiC)の結合に規定され、2) 細胞質から水ミトコンドリアに移行したGSK-3betaは呼吸鎖複合体IIIと結合し活性酸素産生の亢進によりmPTPを開口させること、3) 細胞内シグナルによるGSK-3beta不活化がCypD-PiC相互作用を抑制し、mPTP開口の抑制ばかりでなくmPTP再閉鎖を促進すること、4) GSK-3betaのミトコンドリアへ移行にはVDAC2との結合が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to characterize roles of protein kinases in regulation of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. We found that interaction of cyclophilin D (CypD) and inorganic phosphate carrier (PiC) determines the threshold for mPTP opening and that translocation of GSK-3beta via its interaction with VDAC2 and subsequent interaction with complex III promotes mPTP opening by enhanced production of reactive oxygen species. Inactivation of GSK-3beta by PI3K-Akt signaling or by activation of the mitochondrial KATP channel was found to increase threshold for mPTP opening and also to accelerate re-closure of opened mPTP, leading to protection from cell necrosis.

研究分野：医歯薬学

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 細胞死 細胞内情報伝達 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore [mPTP])はミトコンドリア内膜に存在し細胞障害刺激によって開口するチャンネルであり、直接的に細胞壊死を誘導する機序であることが種々の細胞ならびに複数の傷害刺激を用いて明らかにされている。心筋梗塞、心不全の病態における mPTP 開口の意義について知見が最近蓄積されつつある一方、mPTP 開口を制御する分子機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では心筋保護の観点から、心筋細胞のミトコンドリアにおいて mPTP 開口に抑制的に作動する蛋白キナーゼと mPTP 構成蛋白の関連と mPTP 抑制の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

In vivo の実験には Wistar ラットと糖尿病モデルラットである Goto-Kakizaki ラット (GK ラット)を用い、in vitro の実験には心筋細胞株である H9c2 細胞を用いた。心筋細胞壊死の定量は GK ラットでは冠動脈閉塞再灌流後の心筋梗塞サイズを、H9c2 細胞では培養液への LDH 放出量を指標とした。mPTP の開口は、ラット心筋では単離したミトコンドリアの Ca^{2+} 保持能 (Ca^{2+} retention capacity, CRC)を、H9c2 細胞では TMRE によるミトコンドリア膜電位、ミトコンドリアに負荷した calcein の消失を指標とした。細胞分画は遠心分離、蛋白定量は Western blotting、蛋白-蛋白相互作用は 2 次元電気泳動と免疫沈降を用いた。

4. 研究成果

GK ラットにおける細胞保護シグナルの障害と mPTP 制御の修飾の解析から、mPTP 構成蛋白のうち無機リン輸送担体 (inorganic phosphate carrier, PiC)とミトコンドリアマトリックス蛋白である cyclophilin D (CypD)の結合レベルが mPTP 開口閾値 (Ca^{2+} 負荷に対する mPTP の感受性)を規定しており、その制御には PI3K と関連した受容体からの PI3K-Akt-glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)シグナルが重要であることを示された。また再灌流時の mPTP 開口閾値が心筋梗塞サイズを規定していることも明らかとなった。

再灌流の際に mPTP を開口させる主要な要因である活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) が mPTP を修飾する機序について H9c2 細胞を用いて検討した結果、ROS によって GSK-3 β はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 III (complex III)と結合してミトコンドリア内での ROS 産生を増幅すること、また産生された ROS は mPTP 開口を維持する機序として関与しており、その除去によって mPTP 再閉鎖

が促進され細胞死が減少することを見出した。さらにミトコンドリア K_{ATP} チャンネルの心筋細胞保護効果の一部は GSK-3 β 活性抑制による mPTP 再閉鎖促進であることが示された。

主に細胞質内に局在する GSK-3 β が mPTP を制御する機序を解明すべく、GSK-3 β のミトコンドリア移行の機構を解析した。その結果、酸化ストレスによる GSK-3 β のミトコンドリア移行にはそのキナーゼ活性と VDAC2 との結合が促進的に機能していること、また GSK-3 β の N 末端にミトコンドリア移行に關与するドメインがあることを明らかにした。

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 13 件)

- 1) Miura T. HASF, a PKC- activator with novel features for cardiomyocyte protection. *J Mol Cell Cardiol.* 査読あり 2014;69:1-3. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.011.
- 2) Yano T, Ferlito M, Aponte A, Kuno A, Miura T., Murphy E, Steenbergen C. Pivotal role of mTORC2 and involvement of ribosomal protein S6 in cardioprotective signaling. *Circ Res.* 査読あり 2014;114(8):1268-80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303562.
- 3) Sato T, Kobayashi T, Kuno A, Miki T., Tanno M., Kouzu H, Itoh T, Ishikawa S, Kojima T, Miura T., Tohse N. Type 2 diabetes induces subendocardium-predominant reduction in transient outward K^+ current with downregulation of Kv4.2 and KChIP2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 査読あり 2014;306:H1054-65. doi: 10.1152/ajpheart.00414.2013.
- 4) Miki T., Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev.* 査読あり 2013;18:149-66. doi: 10.1007/s10741-012-9313-3.
- 5) Kuno A, Hori YS, Hosoda R, Tanno M., Miura T., Shimamoto K, Horio Y. Resveratrol improves cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice through SIRT1 protein-mediated modulation of p300 protein. *J Biol Chem.* 査読あり 2013;288:5963-72. doi: 10.1074/jbc.M112.392050.
- 6) Itoh T, Kouzu H, Miki T., Tanno M., Kuno A, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Cytoprotective regulation of the mitochondrial permeability transition pore is impaired in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts. *J Mol Cell*

- Cardiol. 査読あり 2012;53:870-9. doi: 10.1016/j.yjmc.2012.10.001.
- 7) Takada A, Miki T, Kuno A, Kouzu H, Sunaga D, Itoh T, Tanno M, Yano T, Sato T, Ishikawa S, Miura T. Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes. PLoS One. 査読あり 2012;7:e39893. doi: 10.1371/journal.pone.0039893.
 - 8) Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. Cardiovasc Diabetol. 2012 査読あり;11:67. doi: 10.1186/1475-2840-11-67.
 - 9) Bell R, Beeuwkes R, Bøtker HE, Davidson S, Downey J, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Ibanez B, Kitakaze M, Lecour S, Mentzer R, Miura T, Opie L, Ovize M, Ruiz-Meana M, Schulz R, Shannon R, Walker M, Vinten-Johansen J, Yellon D. Trials, tribulations and speculation! Report from the 7th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. Basic Res Cardiol. 査読あり 2012;107:300. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00395-012-0300-6/fulltext.html>
 - 10) Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. Basic Res Cardiol. 査読あり 2012;107:273. doi: 10.1007/s00395-012-0273-5.
 - 11) Ishikawa S, Kuno A, Tanno M, Miki T, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Role of connexin-43 in protective PI3K-Akt-GSK-3 signaling in cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読あり 2012;302:H2536-44. doi: 10.1152/ajpheart.00940.2011.
 - 12) Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. Cardiovasc Res. 査読あり 2012;94:181-9. doi: 10.1093/cvr/cvr302
 - 13) Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Itoh T, Takada A, Sato T, Kouzu H, Shimamoto K, Miura T. Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection. Hypertension 査読あり 2011;57:110-115. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158469.
- 〔学会発表〕(計 12 件)
- 1) Ogasawara M, Kuno A, Ishikawa S, Tobisawa T, Kouzu H, Yano T, Miki T, Miura T. Acceleration of mPTP re-closure after oxidant stress by mitochondrial K_{ATP} channel activation is achieved by suppression of residual ROS production. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (March 15-17, 2014) Yokohama, Japan.
 - 2) Murase H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Yano T, Kouzu H, Tobisawa T, Ogasawara M, Ishikawa S, Miura T. Activation of the glucagon-like peptide-1 receptor restores myocardial autophagic flux and reduced mortality after myocardial infarction in diabetic rats. Scientific Sessions 2013, the American Heart Association (Nov 16-20, 2013), Dallas, USA.
 - 3) Miura T. The role of mitochondria in organ protection. 10th Meeting of Asian Society of Cardiothoracic Anesthesiologists (Oct 3-5, 2013), Singapore.
 - 4) Tobisawa T, Sato T, Yuda S, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kobayashi T, Akasaka H, Tohse N, Miura T. Type 2 diabetes induces ventricular electrical remodeling with a transmural gradient. European Society of Cardiology Congress 2013 (Aug 8 – Sept 4, 2013) Amsterdam, Netherlands
 - 5) Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Ogasawara M, Tobisawa T, Murase H, Sato T, Kouzu H, Miki T, Miura T. Mechanisms underlying mitochondrial translocation of GSK-3beta, a crucial inducer of mitochondrial permeability transition: GSK-3beta activity, interaction with VDAC2 and a mitochondrial targeting sequence. American Heart Association BCVS (July 22-25, 2013) Las Vegas, USA.
 - 6) Ito T, Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Sunaga D, Murase H, Ishikawa S, Miura T. Interaction of cyclophilin D with inorganic phosphate carrier during ischemia determines threshold for mPTP opening and reperfusion-induced cell necrosis. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (March 15-17, 2013) Yokohama, Japan
 - 7) Tanno M, Miki T, Kuno A, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Ishikawa S, Sunaga D, Miura T. Interaction with VDAC2 promotes mitochondrial translocation of GSK-3beta in a kinase

activity-dependent manner and induces cell death. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (March 15-17, 2013) Yokohama, Japan

- 8) Suanga D, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Tanno M, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Murase H, Miura T. Facilitated re-closure of the mitochondrial permeability transition pore underlies protection of cardiomyocytes from ROS-induced necrosis by activation of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel. Scientific Sessions 2012, the American Heart Association. (Nov 3-7, 2012), Los Angeles, USA.
- 9) Kouzu H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Titin-isoform shift may underlie distinct ventricular responses to pressure and volume overloads in type 2 diabetic heart. Scientific Sessions 2012, the American Heart Association (Nov 3-7, 2012), Los Angeles, USA.
- 10) Miura T. Mitochondria and cardioprotection. The 64th Annual Meeting of Korean Physiological Society. (Oct 24-26, 2012), Busan, Korea.
- 11) Itoh T, Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Sunaga D, Ishikawa S, Miura T. UPR in endoplasmic reticulum vs. in mitochondria in diabetic myocardium: which is responsible for deficient regulation of mitochondrial permeability transition pores? Scientific Sessions 2011, the American Heart Association. (Nov 12-16, 2011) Orlando, USA.
- 12) Tanno M, Kuno A, Itoh T, Sato T, Ishikawa S, Sunaga D, Miura T. GSK-3beta translocation to mitochondria by oxidant stress in a kinase activity-dependent manner and contributes to lethal ROS production. Scientific Sessions 2011, the American Heart Association. (Nov 12-16, 2011) Orlando, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 哲嗣 (MIURA TETSUJI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90199951

(2) 研究分担者

三木 隆幸 (MIKI TAKAYUKI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00336405

研究分担者

丹野 雅也 (TANNO MASAYA)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 00398322