



## Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ opens mitochondrial permeability transition pore through mitochondrial hexokinase II dissociation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-11-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 隆光 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00003443">http://hdl.handle.net/10271/00003443</a>

博士（医学） 田中 隆光

#### 論文題目

### Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ opens mitochondrial permeability transition pore through mitochondrial hexokinase II dissociation

（グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 $\beta$  はミトコンドリアのヘキソキナーゼ II 解離を介してミトコンドリア膜透過性遷移孔を開口する）

#### 論文の内容の要旨

[はじめに]

グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) は細胞内グリコーゲン合成に関わるセリン・スレオニンキナーゼである。GSK3 $\beta$  はリン酸化によってその活性が抑制され、様々な細胞生存シグナルに関与することが知られているが、最近の研究では GSK3 $\beta$  がミトコンドリアに局在するヘキソキナーゼ II (mitoHK-II) をミトコンドリアから解離させてしまうことが、アポトーシスを惹起し、細胞の生死を決定すると報告されている。GSK3 $\beta$  の抑制は心保護に対しても重要な働きを有すると報告されているが、GSK3 $\beta$  の抑制が虚血再灌流障害に与える影響とそのメカニズムには十分に解明されていない。また、ミトコンドリア透過性遷移孔 (mPTP) は心筋の虚血再灌流障害において細胞死を決定することが知られているが、GSK3 $\beta$  による mitoHK-II の解離が mPTP 開口に与える影響についても明らかでない。本研究において我々は、虚血再灌流障害における GSK3 $\beta$  の役割と mitoHK-II の解離が mPTP 開口に与える影響について検討した。

[材料ならびに方法]

本研究は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication, revised 2011) および浜松医科大学動物実験倫理規定を遵守し、遂行した。雄 Sprague-Dawley ラットの摘出心をランゲンドルフ灌流装置に接続し、SB216763 (GSK3 $\beta$  阻害剤: 3  $\mu$ mol/L) 存在下および非存在下のもとで 35 分間の全虚血と 40 分間の再灌流を行い、その左室内圧を測定した。また、ラット摘出心から単離心筋細胞を採取し、サポニン処理をすることにより細胞膜透過性単離心筋細胞を作成した。ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) は細胞膜透過性単離心筋細胞に tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 10 nmol/L) を用いて、mPTP 開口は calcein-AM (1  $\mu$ mol/L) を用いて共焦点レーザー顕微鏡で測定した。虚血再灌流後のミトコンドリア局在ヘキソキナーゼ II のミトコンドリアからの解離 (mitoHK-II 解離) は単離ミトコンドリアのヘキソキナーゼ II 発現量をウエスタンブロッティング法で測定することにより評価した。

[結果]

ラット摘出心に虚血再灌流刺激を与えると、再灌流後の左室発生圧 (LVDP) は低下し、mitoHK-II 解離が促進した。一方、SB216763 (GSK3 $\beta$  阻害剤: 3  $\mu$ mol/L) を投与すると虚血再灌流後の LVDP 低下は軽減し、mitoHK-II 解離も抑制されて

いた。細胞膜透過性単離心筋細胞を用いた検討でも GSK3 $\beta$  は mitoHK-II 解離を促進させていた。また、細胞膜透過性単離心筋細胞に GSK3 $\beta$  を投与すると、ミトコンドリアからの calcein 放出を促進し、 $\Delta\Psi_m$  を脱分極させた。これらの変化は mPTP 開口阻害剤である cyclosporine A (CsA: 0.1 mmol/L) によって抑制されたため、GSK3 $\beta$  は mitoHK-II の解離を介して mPTP を開口していることが示唆された。次に我々は mitoHK-II の活性が GSK3 $\beta$  誘発性の mPTP 開口に与える影響を検討した。細胞膜透過性単離心筋細胞に無糖細胞内用液を灌流させて mitoHK-II 活性を抑制させると、GSK3 $\beta$  誘発性のミトコンドリア calcein 放出や  $\Delta\Psi_m$  脱分極は抑制され、mPTP 開口は抑制された。また、細胞膜透過性単離心筋細胞に glucose-6-phosphate (G6P: 0.01 mmol/L) を投与して mitoHK-II 活性を抑制しても、GSK3 $\beta$  誘発性のミトコンドリア calcein 放出が抑制され、mPTP 開口が抑制されることが示唆された。以上から、mitoHK-II 活性の抑制は GSK3 $\beta$  誘発性の mPTP 開口を抑制することが示唆された。

#### [考察]

本研究において我々はランゲンドルフ灌流心と細胞膜透過性単離心筋細胞を用いて GSK3 $\beta$  が虚血再灌流障害と mPTP 開口に与える影響を検討した。我々の研究は (1) GSK3 $\beta$  不活性化が mitoHK-II の解離抑制を介して再灌流後の心機能を保護すること、(2) GSK3 $\beta$  活性化が mitoHK-II 解離を介して mPTP 開口を促進すること、(3) mitoHK-II 不活性化が GSK3 $\beta$  誘発性の mPTP 開口を抑制することを明らかにした。MitoHK-II の解離が mPTP 開口を促進させるメカニズムについては明らかになっていないが、mitoHK-II は電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) を介してミトコンドリア外膜に接続するため、VDAC の不安定性がその一因であると考えられた。また、mitoHK-II はミトコンドリア ATP を使って G6P を産生するため、mitoHK-II の抑制による ATP 浪費の抑制が、mitoHK-II 不活性化によって mPTP 開口が抑制されたメカニズムなのかもしれない。我々の研究結果は極端な実験環境下での検証であるため、そのまま一般的な病態生理に適用して考えることは困難かもしれない。しかしながら、少なくとも mitoHK-II がその解離や不活性化によって mPTP 開口に影響を与えることが本研究によって明らかになった。

#### [結論]

GSK3 $\beta$  不活性化は mitoHK-II の解離を抑制し虚血再灌流後の心機能を保護する。また、GSK3 $\beta$  活性化は mitoHK-II の解離を介して mPTP 開口を促進し、mitoHK-II の不活性化は GSK3 $\beta$  誘発性の mPTP 開口を抑制する。