



Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in skinned rat ventricular myocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 早乙女, 雅夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/257

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 437号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏 名	早乙女 雅 夫		
論文題目	Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in skinned rat ventricular myocytes (ミトコンドリア膜電位は膜除去したラット心室筋細胞におけるミトコンドリアのカルシウム調節を修飾する)		

博士(医学) 早乙女 雅 夫

論文題目

Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in skinned rat ventricular myocytes
(ミトコンドリア膜電位は膜除去したラット心室筋細胞におけるミトコンドリアのカルシウム調節を修飾する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ミトコンドリアは、エネルギー供給器官として細胞内ホメオスタシスの調節に重要であるが、一方で mitochondrial permeability transition pore (mPTP) の開口を介して細胞死にも関与することが知られている。mPTP の開口は、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) の上昇やミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の脱分極、フリーラジカルの増加によって誘発され、チトクローム c などの前駆物質を放出してアポトーシスを誘導する。 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 調節における mPTP や他の $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 調節機構 (Ca^{2+} uniporter、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換) の関与に関する検討は、虚血再灌流障害や不全心筋などの病態を解明するために重要であるが、従来の単離ミトコンドリアを用いた研究ではミトコンドリアと他の細胞内器官を切り離してしまうため、生理的条件下における役割の評価が困難である。本研究では、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 調節機構や $\Delta\Psi_m$ が mPTP 開口へ及ぼす影響を明らかにするために、化学的に膜を除去したラットの心室筋細胞を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_m$ や $\Delta\Psi_m$ を測定し、mPTP 開口との関連について検討した。

〔材料ならびに方法〕

$[\text{Ca}^{2+}]_m$ は、ラット単离心筋細胞に Ca^{2+} 感受性色素の rhod-2 ($20\mu\text{M}$) を負荷し、サポニンにより細胞膜を化学的に除去した後に、共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。 $\Delta\Psi_m$ は、膜除去心室筋細胞に電位感受性色素の TMRE (20nM) を負荷して測定した。mPTP 開口は、ミトコンドリアに負荷した calcein ($1\mu\text{M}$) の流出を画像法によって測定した。ruthenium red (RuR) はミトコンドリア Ca^{2+} の取り込み機構である Ca^{2+} uniporter の阻害薬として、FCCP はミトコンドリア呼吸鎖の脱共役剤として、cyclosporin A (CsA) は mPTP の阻害剤として使用した。

〔結果〕

- (1) 単离心筋細胞の rhod-2 の分布は、サポニンにより膜を除去した後に、ミトコンドリアを選択的に染色する Mito Tracker Green と完全に一致した。膜除去心室筋細胞の rhod-2 蛍光強度は、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) に反応して上昇したが、RuR ($1\mu\text{M}$) を先行投与して Ca^{2+} uniporter を阻害すると、rhod-2 蛍光強度は上昇しなかった。また、FCCP ($0.3\mu\text{M}$) で Ca^{2+} uniporter の推進力である $\Delta\Psi_m$ を脱分極させた場合も、rhod-2 蛍光強度は上昇しなかった。以上より、膜除去心室筋細胞を用いて rhod-2 をミトコンドリアに選択的に負荷することにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の測定が可能であることが示された。
- (2) FCCP ($0.01\text{--}0.1\mu\text{M}$) を用いて $\Delta\Psi_m$ を部分的に脱分極させた場合、FCCP は濃度依存性に $[\text{Ca}^{2+}]_m$ を低下させた。FCCP ($0.3\text{--}1\mu\text{M}$) を用いて $\Delta\Psi_m$ を完全に脱分極させた場合、 Ca^{2+} uniporter を介した Ca^{2+} 取り込みは阻害されたが、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の低下は FCCP 投与前の半分程度であった。以上より、 Ca^{2+} uniporter は $\Delta\Psi_m$ 依存性に Ca^{2+} を取り込むが、 $\Delta\Psi_m$ が完全に脱分極した場合には、 Ca^{2+} uniporter 以外の Ca^{2+} 取り込み機構が存在

在することが示された。

- (3) FCCP (0.3 μ M) により $\Delta\Psi_m$ を完全に脱分極させた場合、ミトコンドリアからの calcein の排出は亢進し、この calcein の排出は CsA (0.1 μ M) によって抑制された。また、FCCP 投与による $[Ca^{2+}]_m$ の低下は、CsA 非存在下に比し CsA 存在下で亢進した。以上より、 $\Delta\Psi_m$ の完全な脱分極により mPTP が開口し、ミトコンドリア内へ Ca^{2+} が流入することが示唆された。
- (4) 灌流液の Na^+ 除去によりミトコンドリアの Na^+/Ca^{2+} 変換 (mitoNCX) を阻害すると、FCCP 投与による $[Ca^{2+}]_m$ の低下は認めなかった。mitoNCX は細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) 依存的に Ca^{2+} を排出し、ミハエリス定数 (K_m) を示す $[Na^+]_i$ は、正常 $\Delta\Psi_m$ では 3.6 mM であり、完全脱分極した場合には 7.6 mM であった。以上より、mitoNCX は $\Delta\Psi_m$ が完全脱分極した条件下でも Ca^{2+} を排出することが示唆された。

[考察]

我々は、膜除去したラットの心室筋細胞において rhod-2 と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、 $[Ca^{2+}]_m$ 調節機構に及ぼす $\Delta\Psi_m$ の効果と mPTP の関与を明らかにした。我々の研究では、 Ca^{2+} uniporter は $\Delta\Psi_m$ 依存性に Ca^{2+} を取り込み、 $\Delta\Psi_m$ が完全に脱分極すると mPTP が開口し、 $[Ca^{2+}]_m$ と $[Ca^{2+}]_i$ との濃度格差によってミトコンドリア内へ Ca^{2+} が流入することが示された。 Ca^{2+} イオン浸透薬のイオノマイシンを用いた実験でも、本実験条件では $[Ca^{2+}]_m < [Ca^{2+}]_i$ であることが示されている。mitoNCX は $[Na^+]_i$ 依存的に Ca^{2+} を排出し、その Ca^{2+} 排出速度は生理的な $[Na^+]_i$ (約 10 mM) でほぼ最大であった。また、 $\Delta\Psi_m$ の完全な脱分極によって mitoNCX の Ca^{2+} 排出速度は遅れたが、mitoNCX はミトコンドリアから Ca^{2+} を排出することが示された。

[結論]

本研究により、 $\Delta\Psi_m$ が脱分極する条件下での $[Ca^{2+}]_m$ 調節について、1) Ca^{2+} uniporter は $\Delta\Psi_m$ 依存性に Ca^{2+} を取り込む、2) $\Delta\Psi_m$ の完全脱分極により mPTP は開口し、ミトコンドリア内へ Ca^{2+} が流入する、3) $\Delta\Psi_m$ の完全脱分極によって Ca^{2+} 排出速度は遅れたが、mitoNCX は Ca^{2+} 排出を維持することが、膜除去心室筋細胞レベルで明らかになった。これらの結果は、虚血再灌流障害などの病態生理時の $[Ca^{2+}]_m$ 調節の解明に重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアは、エネルギー供給器官として細胞内ホメオスタシスの調節に重要であるが、一方で mitochondrial permeability transition pore (mPTP) の開口を介して細胞死にも関与することが知られている。mPTP の開口は、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_m$) の上昇やミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の脱分極などによって誘発され、虚血再灌流障害や不全心筋などの病態にも大きく影響している。従来の単離ミトコンドリアを用いた研究では、ミトコンドリアと他の細胞内器官を切り離してしまうため、生理的条件下における役割の評価が困難であった。

そこで申請者は、サポニンにより化学的に膜除去したラットの心室筋細胞において、共焦点レーザー顕微鏡を用いて $[Ca^{2+}]_m$ を測定する方法を確立し、 $[Ca^{2+}]_m$ 調節機構や $\Delta\Psi_m$ が mPTP 開口へ及ぼす影響について調べ、以下の結果を得た。

- (1) 単離心筋細胞のrhod-2の分布は、膜除去後にミトコンドリアを選択的に染色するMito Tracker Greenと完全に一致した。膜除去心筋細胞のrhod-2蛍光強度は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に反応して上昇したが、ルテニウムレッドやFCCPを先行投与してミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み経路のuniporterを阻害すると、rhod-2蛍光強度は上昇しなかった。
- (2) FCCPを用いて $\Delta\Psi_m$ を部分的に脱分極させた場合、濃度依存性に $[\text{Ca}^{2+}]_m$ は低下したが、FCCPで $\Delta\Psi_m$ を完全に脱分極させた場合には、uniporterを介した Ca^{2+} 取り込みは阻害されたのに、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の低下はFCCP投与前の半分程度であった。
- (3) FCCPにより $\Delta\Psi_m$ を完全に脱分極させた場合、mPTP開口の指標であるミトコンドリアからのカルセインの排出は亢進した。このカルセインの排出はmPTP阻害剤のサイクロスポリンAによって抑制され、FCCP投与による $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の低下はサイクロスポリンA存在下で亢進した。
- (4) 灌流派の Na^+ 除去によりミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換(mitoNCX)を阻害すると、FCCP投与による $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の低下は認めなかった。mitoNCXは細胞内 Na^+ 濃度($[\text{Na}^+]_i$)依存的に Ca^{2+} を排出し、ミハエリス定数(K_m)を示す $[\text{Na}^+]_i$ は、正常 $\Delta\Psi_m$ では3.6mMであり、完全脱分極した場合には7.6mMであった。

以上の結果から申請者は次のような結論を得た。

- (1) 膜除去心室筋細胞を用いてrhod-2をミトコンドリアに選択的に負荷することにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の測定が可能である。
- (2) Uniporterは $\Delta\Psi_m$ 依存性に Ca^{2+} を取り込むが、uniporter以外の Ca^{2+} 取り込み機構も存在し、 $\Delta\Psi_m$ が完全に脱分極した場合にはこれが機能する。
- (3) $\Delta\Psi_m$ の完全な脱分極によりmPTPが開口し、ミトコンドリア内へ Ca^{2+} が流入する
- (4) mitoNCXは、 $\Delta\Psi_m$ が完全脱分極した条件下でも、 Ca^{2+} を排出することが示唆された。

これらの結果は、虚血再灌流障害などの病態生理時の $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 調節の解明に重要であると考えられた。

審査委員会は、申請者が、細胞膜除去細胞を用いて、生理的な機能と構造を保った心筋細胞のミトコンドリア内 Ca^{2+} の動態を測定し、ミトコンドリアが脱分極した時にも、細胞内 Ca^{2+} の排出機能が残ることを明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において審査委員会は次のような質問を行った。

- (1) mPTPの構造とそのコンタクトポイントの生じる理由
- (2) mitoNCXの性質について
- (3) uniporterの電気的な特性について
- (4) 虚血再灌流障害時の Ca^{2+} 過負荷がミトコンドリアに与える影響について
- (5) ミトコンドリアで産生されたATPの細胞質への輸送について
- (6) rhod-2色素がミトコンドリア以外に分布する可能性について
- (7) Green fluorescent proteinでミトコンドリア分布を確認する可能性について
- (8) FCCPを投与した場合のpH変化が色素(rhod-2)に与える影響について
- (9) サポニンでの膜除去による色素とミトコンドリアへの影響について
- (10) 膜除去心筋細胞での $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 測定方法が従来の単離ミトコンドリアでの測定と異なる点について

- (11)虚血再灌流障害モデルと本研究の実験系との関連性について
- (12)本研究とアポトーシス・ネクローシスとの関連性について
- (13)虚血再灌流障害から回復した細胞の転機について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	寺 川	進
	副査	梅 村 和 夫	副査 渡 邊 裕 司