

Alterations in Cardiac Contractile Proteins Due to Oxygen Free Radicals

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 信吾 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/961

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 108号	学位授与年月日	平成 3年 3月26日
氏 名	鈴木 信 吾		
論文題目	Alterations in Cardiac Contractile Proteins Due to Oxygen Free Radicals (活性酸素ラジカルの心筋収縮蛋白に及ぼす影響)		

Alterations in Cardiac Contractile Proteins Due to Oxygen Free Radicals (活性酸素ラジカルの心筋収縮蛋白に及ぼす影響)

論文の内容の要旨

虚血再灌流時における心収縮障害に活性酸素ラジカルの関与が示唆され、心筋の筋鞘と筋小胞体の Ca^{2+} 輸送系が活性酸素ラジカルにより抑制されることが報告されている。本研究は活性酸素ラジカルの心筋筋原線維に及ぼす影響を明らかにする目的で、筋原線維ATPase活性と、この酵素に重要なSH基に及ぼす活性酸素ラジカルの影響について検討した。

【方法】

(1)体重200~250gの雄Sprague-Dawleyラットを用い、心筋筋原線維をSolaroらの方法で分離した。(2)筋原線維 Mg^{2+} -ATPase活性は筋原線維(0.5mg protein)を25mM imidazole (pH7.0)、2mM MgCl_2 、5mM NaN_3 、1mM EGTA、50mM KCl溶液中で5分間30°Cでプレインキュベーション後、2mM ATPを添加して5分間反応させた後12%TCA溶液にて反応を停止させ、遊離したPiをTaussskyらの方法で測定した。Total ATPase (Ca^{2+} -ATPase + Mg^{2+} -ATPase)活性は1mM EGTAの代わりに10 μM free Ca^{2+} を含む溶液でプレインキュベーションして測定した。Total ATPaseと Mg^{2+} -ATPaseの差を Ca^{2+} -ATPase活性とした。(3)筋原線維のSH基の測定は5-5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid)(DTNB)を用いて測定した。(4)活性酸素ラジカル産生系として、2mM キサンチン(X)-0.03U/mlキサンチンオキシダーゼ(XO)系、過酸化水素(1mM)および次亜塩素酸(0.4mM)を用いた。(5)ラジカルスカベンジャーとしてはSOD(80 μg /蛹)、カタラーゼ(10 μg /蛹)およびL-メチオニン(1mM)を用いた。

【結果】

(1)X+XO存在下において、筋原線維 Mg^{2+} -ATPase活性は有意に促進された(4.97 ± 0.16 vs $2.53 \pm 0.13 \mu\text{mol/mg protein/hr}$, $p < 0.05$)。一方、 Ca^{2+} -ATPase活性は有意に抑制され(6.48 ± 0.18 vs $10.29 \pm 0.17 \mu\text{mol/mg protein/hr}$, $p < 0.05$)、筋原線維のSH基は有意に減少した(54.2 ± 1.0 vs $67.0 \pm 1.3 \text{nmol/mg protein}$, $p < 0.05$)。これらの変化はSOD+カタラーゼの添加により有意に保護された。(2) Mg^{2+} -ATPase活性は過酸化水素存在下(5.46 ± 0.18 vs 2.96 ± 0.12 , $p < 0.05$)および次亜塩素酸存在下(9.51 ± 0.16 vs 2.80 ± 0.12 , $p < 0.05$)においても有意に促進された。一方、 Ca^{2+} -ATPase活性はいずれも有意に抑制された(5.92 ± 0.38 vs 10.89 ± 0.45 , $p < 0.05$; 5.73 ± 0.31 vs 10.96 ± 0.15 , $p < 0.05$)。また、筋原線維のSH基はいずれも有意に減少した(47.6 ± 2.6 vs 66.3 ± 2.7 , $p < 0.05$; 35.7 ± 2.9 vs 67.6 ± 1.1 , $p < 0.05$)。これらの変化はカタラーゼやL-メチオニンの添加により有意に保護された。(3)SH基のreductantである1mM dithiothreitol (DTT)の添加によりX+XO、過酸化水素と次亜塩素酸による筋原線維 Mg^{2+} -ATPaseと Ca^{2+} -ATPase活性の変化は有意に保護された。(4)SH基のreagentであるDTNB及びN-ethylmaleimide (NEM)により Mg^{2+} -ATPase活性は有意に促進され、 Ca^{2+} -ATPase活性は有意に抑制された。

【考案】

活性酸素ラジカルが心筋筋原線維の Mg^{2+} -ATPase活性を促進し、 Ca^{2+} -ATPase活性を抑制することを認めた。既に活性酸素ラジカルが細胞膜や筋小胞体の膜結合酵素に影響を及ぼすことが報告されている。その機序として、膜リン脂質の過酸化や酵素蛋白のSH基の酸化が考えられている。われわれが用いた筋原線維は膜リン脂質を含まないことより、活性酸素ラジカルの筋原線維結合酵素蛋白そのものに対する直接作用、特にSH基の酸化による機序が示唆された。筋原線維の Ca^{2+} -ATPase活性は、アクチン・ミオシン・トロポニン等いくつかの構成要素の相互作用により発現するものであり、活性酸素ラジカルによる Ca^{2+} -ATPase活性への作用はこれらの構成要素に作用した結果と考えられる。 Ca^{2+} -ATPaseは心収縮蛋白のエネルギー利用系として極めて重要な働きを有しており、その障害は心収縮に重大な影響を及ぼすと考えられる。活性酸素ラジカルによる心収縮機能不全の一つの機序として、ラジカルによる筋原線維 Ca^{2+} -ATPase活性の抑制の関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

虚血再灌流時に活性酸素ラジカルが心収縮障害にどのように関与するかを解明するために、本研究では心筋筋原線維ATPase活性と、この酵素に重要なSH基に及ぼす活性酸素ラジカルの影響について検討している。

本実験ではSprague-Dawleyラットを用い、心筋筋原線維を精製し、その Mg^{2+} -ATPase 活性、 Ca^{2+} -ATPase 活性、及びSH基の測定を行っている。活性酸素種及びラジカル産生系としてキサンチン(X) -キサンチンオキシダーゼ(XO)系、過酸化水素および次亜塩素酸を用い、ラジカルスカベンジャーとしてはSOD、カタラーゼ及びL-メチオニンをを用いている。

その結果(1)各種のラジカル及び活性酸素種の存在下では筋原線維 Mg^{2+} -ATPase 活性は有意に増加し、 Ca^{2+} -ATPase 活性は有意に抑制され、SH基は有意に減少したが、それぞれに特異的なスカベンジャーの添加によって保護されることを認めている。さらに(2)SH基の還元剤、DTTの添加によりラジカルによるATPaseの変化は有意に保護され、SH基の阻害試薬、DTNBまたはNEM投与により Mg^{2+} -ATPase活性は有意に増加し、 Ca^{2+} -ATPase 活性は有意に抑制されることを認めている。

以上の結果から考察を加えて申請者は次のように結論をまとめている。

- 1) 活性酸素ラジカルが筋原線維のATPase活性に影響を及ぼすSH基を酸化すると考えられる。
- 2) それにより筋原線維の Mg^{2+} -ATPase活性が増加し、同筋原線維の Ca^{2+} -ATPase活性が抑制される。
- 3) 以上より虚血再灌流時の活性酸素ラジカルによる心収縮機能不全の一つの機序として筋原線維ATPase活性とSH基の関与が示唆された。

本論文関連事項として審査委員から次の質問が出された。

- 1) 筋原線維の精製法の信頼性
- 2) キサンチンデハイドロゲナーゼからキサンチンオキシダーゼへの変換機序
- 3) OHラジカルの生体内のスカベンジャー
- 4) 過酸化水素、次亜塩素酸のラジカル種との関係およびその働き
- 5) 各種ラジカルとスカベンジャーの投与量の関係
- 6) Mg^{2+} -ATPaseの機能
- 7) Ca^{2+} -ATPase活性とSH基および Ca^{2+} ポンプとの関係
- 8) DTNB及びDTTの投与方法
- 9) SH基酸化の可逆性、不可逆性の差
- 10) 温度変化によるSH基の反応の違い
- 11) 一重項酸素を発生させる方法とそれを用いた実験系
- 12) 活性酸素ラジカルとオキシダントの用語としての使い分け

これらの質問に対して、申請者から概ね適切な回答がなされた。

本論文は虚血心筋への再灌流時にみられる心収縮機能障害について、その原因の解明に寄与するもので、虚血性心疾患の治療法や心臓手術方法の今後の発展の基になる意義ある研究と認めた。

以上の結果から審査委員会は本論文が医学博士の学位を授与するに十分な内容を有するものであると全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	原 田 幸 雄			
	副査	教授	市 山 新	副査	教授	藤 瀬 裕
	副査	助教授	植 松 俊 彦	副査	助教授	小 林 明