



Depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} -pump activity by oxygen free radicals.

メタデータ	言語: Japanese 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: 金子, 雅則 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1374

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	医博論第 97号	学位授与年月日	平成 3年 2月 8日
氏名	金子雅則		
論文題目	Depression of heart sarcolemmal Ca ²⁺ -pump activity by oxygen free radicals. (活性酸素ラジカルによる心筋細胞膜 Ca ²⁺ -ポンプ活性の抑制)		

医学博士 金子雅則

論文題目

Depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} -pump activity by oxygen free radicals.
(活性酸素ラジカルによる心筋細胞膜 Ca^{2+} -ポンプ活性の抑制)

論文の内容の要旨

心筋の虚血、再灌流障害へのフリーラジカルの関与が考えられているが、フリーラジカル細胞障害機序はまだ充分解明されていない。一方、心筋の虚血、再灌流障害においては細胞内 Ca^{2+} -overload が重大な役割を演じていると考えられている。そこで、細胞質の Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す働きをもつ心筋細胞膜 Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -dependent ATPase (Ca^{2+} -stimulated ATPase) 活性に及ぼすフリーラジカルの影響について検討した。また、フリーラジカルの細胞膜障害の指標として細胞膜過酸化脂質を測定した。

<方法>

- (1) 体重200-250gの雄S-Dラットを用い心筋細胞膜を蔗糖密度勾配法にて分離した。蛋白濃度はLowry法にて測定した。
- (2) Mg^{2+} -ATPase活性の測定は心筋細胞膜 (20-40 μg) を、140mM KCl/10 mM MOPS-Tris (pH7.4)/2 mM MgCl_2 /5 mM NaN_3 /0.2mM EGTA溶液中で5分間、37°Cでプレインキュベーションし、4 mM ATP-Tris (pH7.4) を添加後5分間反応させ、12%TCA 溶液にて反応を停止させた。遊離されたPiをTauskyらの方法にて測定した。Total ATPase (Ca^{2+} -stimulated ATPase+ Mg^{2+} -ATPase)活性は、140mM KCl/10mM MOPS-Tris (pH7.4)/2mM MgCl_2 /5mM NaN_3 /10 μM free Ca^{2+} 溶液中で測定した。Total ATPase活性と Mg^{2+} -ATPase 活性の差を Ca^{2+} -stimulated ATPase活性とした。
- (3) ATP-dependent Ca^{2+} accumulationの測定は、心筋細胞膜 (100 μg) を140mM KCl/10mM MOPS-Tris (pH7.4)/2mM MgCl_2 /10 μM $^{45}\text{CaCl}_2$ -EGTA 溶液中で5分間37°Cでプレインキュベーションし、4 mM ATP-Tris(pH7.4)を添加後5分間反応させ、反応液をミリポアフィルターにてろ過した。3mlの140mM KCl/10mM MOPS-Tris (pH7.4)/1mM LaCl_3 溶液で2度フィルターを洗浄し、乾燥後フィルター上の放射活性を測定した。
- (4) 膜過酸化脂質の測定はBuegeらの方法を用いた。
- (5) フリーラジカル産生系として、キサンチン+キサンチンオキシダーゼ (スーパーオキシドラジカル産生系)、過酸化水素、過酸化水素+ Fe^{2+} (ハイドロキシルラジカル産生系)を用いた。

<結果>

- (1) キサンチン+キサンチンオキシダーゼ存在下において、 Ca^{2+} -stimulated ATPase活性およびATP-dependent Ca^{2+} accumulation活性はともに有意に低下した。(P<0.05) この低下は反応時間依存性であり、反応1分後においてすでに有意な変化が認められた。また、SOD (スーパーオキシドジスムターゼ)の添加により酵素活性の低下は有意に抑制された。(P<0.05)
- (2) 過酸化水素は濃度依存性に Ca^{2+} -ポンプ活性 (ATP-dependent Ca^{2+} accumulationと Ca^{2+} -stimulated ATPase活性)を有意に低下させた。(P<0.05) この低下は、カタラーゼの添加により有意に保護された。(P<0.05)
- (3) 過酸化水素+ Fe^{2+} 存在下において、 Ca^{2+} -ポンプ活性は有意に低下した。(P<0.05) マンニトールはこの低下を有意に抑制した。(P<0.05)
- (4) キサンチン+キサンチンオキシダーゼ、過酸化水素、および過酸化水素+ Fe^{2+} 存在下において、心筋細胞膜の過酸化脂質は有意に増加した。(P<0.05)

<考案>

心筋の虚血-再灌流時に過剰に産生されるフリーラジカルは、細胞質の Ca^{2+} -overload を起こすことが報告されている。その機序として、1)細胞膜脂質の過酸化によって Ca^{2+} に対する透過性が亢進し、細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が増加すること、2)細胞膜の Na^+ - K^+ ATPase活性が抑制され細胞内の Na^+ 濃度が増加すること(細胞内 Na^+ の増加は、 Na^+ / Ca^{2+} exchange機構による細胞内への Ca^{2+} の流入増加、あるいは、細胞

外への Ca^{2+} の汲み出し低下によって細胞質の Ca^{2+} -overloadを生じると考えられている。) 3)筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase活性の抑制により細胞質 Ca^{2+} の筋小胞体への取り込みが低下すること、等が考えられている。しかし今日まで、細胞質 Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す働きを持つ心筋細胞膜 Ca^{2+} -stimulated ATPase活性に及ぼすフリーラジカルの影響についての報告はなされていない。今回、我々は、フリーラジカルが心筋細胞膜の Ca^{2+} -stimulated ATPase活性を濃度依存性、反応時間依存性に抑制することを示した。この結果から、心筋の虚血-再灌流時において過剰に産生されたフリーラジカルが細胞膜の Ca^{2+} -stimulated ATPase活性を抑制し、細胞質の Ca^{2+} -overloadをきたす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

心筋の虚血-再灌流障害に酸素フリーラジカルが関与すると言われており、実際に虚血心の再灌流により酸素フリーラジカルが増加することがEPRを用いて測定されている。一方、細胞質 Ca^{2+} のoverloadが心筋の虚血-再灌流障害の原因として極めて重要であることが一般に認められている。細胞質 Ca^{2+} 濃度は通常形質膜 Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -stimulated ATPase) 等による細胞外への Ca^{2+} の汲み出し、あるいは細胞小器官(小胞体等)への汲み上げにより極めて低濃度(10^{-7}M 程度)に保たれている。したがって、酸素ラジカルはこれら Ca^{2+} の汲み出し、汲み上げ機構に障害を与えているという可能性が考えられる。

本研究では、ラット心室から分離したザルコレンマ小胞(筋細胞を被う膜標品)の Ca^{2+} -stimulated ATPase活性と ^{45}Ca 取り込み活性に対するスーパーオキシド($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)および過酸化水素(H_2O_2)の影響が検討された。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により、 $\cdot\text{OH}$ は H_2O_2 と Fe^{2+} からフェントン反応によりin situで発生させた。その結果、これら3種の活性酸素種により Ca^{2+} -stimulated ATPase活性、 ^{45}Ca 取り込み活性がいずれも顕著に阻害されること、およびフリーラジカルによる細胞膜障害の指標として測定された細胞膜過酸化脂質量が有意に増加することが観察された。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ の中では $\cdot\text{OH}$ の影響が最も顕著であった。以上の結果から、心筋の虚血-再灌流障害において、過剰に産生された酸素フリーラジカルが細胞膜の Ca^{2+} -stimulated ATPase活性を障害し、細胞質 Ca^{2+} のoverloadを来すという可能性が示された。

以上の申請者の発表に対して、実験結果が明確であるばかりでなく、用いたザルコレンマ標品の純度を各種細胞小器官、特に筋小胞体のマーカー酵素の混入の度合いを測定することで確認し、更に観察された効果が用いた活性酸素種によるものであることをそれぞれに特異的なスカベンジャーを用いて確認するなど、神経の行き届いたすぐれた研究と高く評価された。

この研究と関連して以下の質問がなされた。

- (1) 心筋の虚血-再灌流実験において、再灌流時のみならず虚血時にも酸素フリーラジカル濃度が上昇傾向にあることの理由。
- (2) 2mM Mg^{2+} - $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ 存在下でのATPase活性と 2mM Mg^{2+} のみ加えた時のATPase活性の差を Ca^{2+} -stimulated ATPase活性としている。この Mg^{2+} -ATPaseの素性と細胞内分布。
- (3) Ca^{2+} -stimulated ATPaseの酵素分子としての性質、細胞内局在部位、活性制御機構。特に Mg^{2+} がどのような機構で活性に関与するのか。
- (4) キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系、 H_2O_2 - Fe^{2+} 系でそれぞれ $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ を発生させた時、酸素フリーラジカルは細胞の外から細胞を攻撃するのか、細胞の中でもこれらフリーラジカルが発生するのか。
- (5) 酸素フリーラジカルや H_2O_2 による Ca^{2+} -stimulated ATPase障害の機構。
- (6) 酸素フリーラジカルや H_2O_2 により引き起こされる Ca^{2+} ovreloadの原因として、ザルコレンマ Ca^{2+} -stimulated ATPaseの障害以外に考えられる機構。

これらの質問に対して申請者は適切に回答し、また未解決の点については慎重で配慮の行き届いた考察を行った。

以上により本研究は学位授与に値すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山新			
	副査	教授	中島光好	副査	教授	馬場正三
	副査	教授	南方陽	副査	教授	山崎昇