



Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 袁, 国祥 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1410

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 133号	学位授与年月日	平成 4年12月18日
氏名	袁 国 祥		
論文題目	Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals (活性酸素ラジカルによる心筋ミトコンドリアのクレアチンキナーゼ活性の減少)		

医学博士 袁 国 祥

論文題目

Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals
(活性酵素ラジカルによる心筋ミトコンドリアのクレアチンキナーゼ活性の減少)

論文の内容の要旨

[はじめに]

近年、心筋の虚血-再灌流障害等の種々の病態において活性酵素ラジカルの関与が注目されているが、活性酵素ラジカルによる細胞障害の機序についてはいまだ不明の点が多い。心筋ミトコンドリアの creatine kinase (CK) は心筋細胞内のエネルギー輸送に関与しており、その障害は心機能に影響を及ぼすと考えられる。そこで、活性酵素ラジカルの心筋ミトコンドリアの CK 活性とこの酵素に重要な SH 基に及ぼす影響について検討した。

[方法]

1. 体重200 - 250g雄性 Sprague-Dawley ラットを用い心筋ミトコンドリアを Sordahl らの方法にて分離した。蛋白濃度は Lowry 法にて測定した。
2. ミトコンドリアの CK 活性は Hess らの NADPH 法にて測定し、International Unit/mg mitochondrial protein で示した。
3. ミトコンドリアの SH 基は5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用い、Boyne らの方法にて測定した。
4. フリーラジカル産生系として、xanthine (X) + xanthine oxidase (XO) と、過酸化水素を、またラジカルスカベンジャーとして superoxide dismutase (SOD) と catalase を用いた。さらに SH 基を抑制する N-ethyl-maleimide (NEM) と SH 基の還元剤である dithiothreitol (DTT) と cysteine を用いた。

[結果]

1. xanthine、xanthine oxidase 単独では CK 活性と SH 基に変化を認めなかったが、X と XO を同時に加えるとミトコンドリアの CK 活性は濃度依存性及び反応時間依存性に抑制され (X+XO 群 0.52 ± 0.07 vs. 対照群 1.42 ± 0.05 IU/mg protein、 $p < 0.05$) SH 基も有意に減少した (X+XO 群 4.61 ± 0.06 vs. 対照群 5.82 ± 0.08 mol/ 10^5 g protein、 $p < 0.05$)。これらの変化は SOD の添加によりいずれも有意に保護された。
2. ミトコンドリアの CK 活性と SH 基は0.001、0.01mM の過酸化水素では変化を認めなかったが、0.1、1 mM の過酸化水素により有意に低下した (CK 活性: 0.1mM 群 1.21 ± 0.02 、1 mM 群 0.97 ± 0.03 vs. 対照群 1.42 ± 0.03 IU/mg protein、 $p < 0.05$; SH 基: 0.1mM 群 4.92 ± 0.06 、1 mM 群 4.33 ± 0.08 vs. 対照群 6.08 ± 0.06 mol/ 10^5 g protein、 $p < 0.05$)。これらの変化は catalase の添加によりいずれも有意に保護された。

3. DTT、cysteine の添加により X+XO と過酸化水素による CK 活性の変化は有意に保護された。
4. CK 活性は NEM により濃度依存性及び反応時間依存性に抑制され、この抑制は DTT、cysteine の添加により有意に保護された。

[考察及び結論]

我々は活性酸素ラジカルが心筋ミトコンドリアの CK 活性を濃度依存性、反応時間依存性に抑制すること、またミトコンドリアの SH 基を減少することを認めた。フリーラジカルによるミトコンドリアの CK 活性の抑制はミトコンドリアと収縮蛋白系との energy shuttle の破綻をきたし、心機能障害をもたらす可能性が示唆された。また、活性酸素ラジカルにより心筋ミトコンドリアの CK 活性の抑制はミトコンドリア膜の SH 基の酸化に関与することが明らかになった。

活性酸素ラジカルによる心収縮機能不全の機序の一つとして、ラジカルが膜結合酵素蛋白の SH 基を酸化し、ミトコンドリアの CK 活性を抑制することにより心筋内エネルギー利用に障害をきたすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、心筋の虚血—再灌流障害等の種々の病態において活性酸素ラジカルの関与が注目されているが、活性酸素ラジカルによる細胞障害の機序についてはなお不明な点が多い。心筋ミトコンドリアの creatine kinase (CK) は心筋細胞内のエネルギー輸送に関与しており、その障害は心機能に影響を及ぼすと考えられる。申請者は活性酸素ラジカルが心筋ミトコンドリアの CK 活性と、この酵素の活性化に重要な SH 基に及ぼす影響を in vitro で検討した。

方法としては体重200 - 250g 雄性SDラットを用い、Sordahlらの方法により分離した心筋ミトコンドリアの CK 活性を、Hessらの NADPH 法により測定し、International Unit/mg mitochondrial protein で示した。蛋白濃度は Lowry 法にて測定した。ミトコンドリアの SH 基は 5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用い、Boyne らの方法により測定した。活性酸素産生系として、xanthine (X) + xanthine oxidase (XO) と、過酸化水素を、また活性酸素ラジカル消去剤として SOD と catalase を用いた。さらに SH 基を抑制する N-ethylmaleimide (NEM) と SH 基の還元剤である dithiothreitol (DTT) と cysteine を用いた。

その結果、ミトコンドリアの CK 活性は xanthine plus xanthine oxidase により濃度依存性及び反応時間依存性に抑制され、SH 基も有意に減少した。これらの変化は SOD 添加によりいずれも有意に保護された。ミトコンドリアの CK 活性と SH 基は 0.1、1.0 mM の過酸化水素によりいずれも有意に低下した。これらの変化は catalase の添加によりいずれも有意に保護された。DTT または cysteine の添加により X+XO または過酸化水素による CK 活性の変化は有意に保護された。CK 活性は NEM により濃度依存性及び反応時間依存性に抑制され、この抑制は DTT または cysteine の添加により有意に保護された。

以上の結果より、活性酸素ラジカルによるミトコンドリアの CK 活性の抑制はミトコンドリアと収縮蛋白系との energy shuttle の破綻をきたし、心機能障害をもたらす可能性が示唆された。また、活性酸素ラジ

カルによる心筋ミトコンドリアのCK活性の抑制は、ミトコンドリア膜のSH基の酸化に関与していることが明らかにされた。

以上の結果は活性酸素ラジカルによる心機能不全の機序の一つとして、活性酸素が膜結合蛋白のSH基を酸化し、ミトコンドリアのCK活性を抑制することにより心筋内エネルギー利用に障害をきたすことを示唆するもので、心筋における再灌流障害の予防法、治療法の今後の発展の基になる意義ある研究と高く評価された。

本研究に対し以下の点について質疑がなされた。

- 1) ミトコンドリアCKの存在部位について
- 2) 本研究に用いられた O_2^- と過酸化水素の量と生体内の病的条件下で生じる量との関係について
- 3) cytosolic ATPよりmyofibrilのCKによるATPをmyosin ATPaseが優先的に利用することについての文献的考察
- 4) 過酸化水素のミトコンドリア内 Ca^{++} 代謝に対する影響について
- 5) 再灌流心筋内ミトコンドリアCK活性低下の機序について
- 6) 再灌流障害を防止するためにcatalaseを使用した理由
- 7) 再灌流時のフリーラジカルの産生について
- 8) 内因性と外因性ラジカルによるミトコンドリアCK反応性の差

以上の点について質疑がなされたが、申請者のそれに対する答えはほぼ適確であり、博士（医学）学位の授与に値すると審査員全員一致で決定した。

論文審査担当者	主査	教授	中野	稔			
	副査	教授	市山	新	副査	教授	平光忠久
	副査	教授	原田	幸雄	副査	助教授	林秀晴