



## EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON STIMULATORY GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN IN RAT HEART

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: 増田, 尚道 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1444">http://hdl.handle.net/10271/1444</a>

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 167号	学位授与年月日	平成 6年 2月14日
氏名	増田尚道		
論文題目	EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON STIMULATORY GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN IN RAT HEART (ラット心筋刺激性 GTP 結合蛋白に及ぼす過酸化水素の影響)		

医学博士 増田尚道

論文題目

EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON STIMULATORY GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN IN RAT HEART

(ラット心筋刺激性 GTP 結合蛋白に及ぼす過酸化水素の影響)

### 論文の内容の要旨

活性酸素は種々の病的状態での細胞傷害に関与していると考えられている。活性酸素は心筋の収縮力に影響を及ぼすが、その機序は充分解明されていない。一方、心臓内の cAMP は心筋の収縮を調節しており、 $\beta$ アドレナリン受容体 ( $\beta$ 受容体)、刺激性 GTP 結合蛋白 (Gs)、アデニレートシクラーゼ (AC) から構成される  $\beta$ -receptor system より生産される。

今までに活性酸素が、 $\beta$ 受容体密度 (Bmax)、親和性 (Kd) や AC 活性に影響を及ぼすことが報告されているが、Gs 活性への影響はほとんど研究されていない。そこで、活性酸素の一種である過酸化水素が、Gs 活性と  $\beta$ -receptor system のカップリングに及ぼす影響をラット心筋において検討した。

【方法】雄 Sprague - Dawley ラット (体重200~300 g) より、Williams の方法を用い心筋膜を分離した。活性酸素としては、0.1, 1, 10 mM の過酸化水素を使用した。心筋膜と過酸化水素を反応温度30°C、AC 活性測定では5, 10, 30, 60分、それ以外の測定では10, 60分反応させ以下の測定を行った。①  $\beta$ 受容体の測定は [ $^3$ H] dihydroalprenolol( [ $^3$ H] DHA) を使用しラジオレセプターアッセイ (RRA) 法によって、心筋膜の Bmax と Kd 値を求めた。② Gs 活性は過酸化水素と反応させた心筋膜の Gs を、先天的に Gs が欠損している細胞である S 49マウスリンパ腫細胞 (cyc<sup>-</sup>) の細胞膜と混和し再構成した。再構成した膜に [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP を含んだ反応液を加えた後、膜の Gs を NaF で刺激し Salomon らの方法を用い産生した cAMP 量を測定した。③ AC 活性は過酸化水素と反応させた心筋膜の AC を forskolin で刺激し産生した cAMP を、Gs 活性測定の時と同様の方法で測定した。④カップリングは過酸化水素で反応させた心筋膜を GTP, GTP + isoproterenol, guanylimidodiphosphate (Gpp (NH) p), Gpp (NH) p + isoproterenol, forskolin でそれぞれ刺激し産生した cAMP を測定して検討した。(Gpp (NH) p : GTP と同様に Gs を刺激することにより cAMP を産生する)

【結果】① [ $^3$ H] DHA 結合の Bmax はいずれの濃度の過酸化水素でも変化しなかった。しかし、Kd 値は反応時間10分で、1, 10 mM 過酸化水素により上昇 (control 0.71 $\pm$ 0.13 mM, 1 mM 過酸化水素 1.11 $\pm$ 0.16, 10 mM 0.90 $\pm$ 0.13; p < 0.05) を示し、 $\beta$ 受容体に対する親和性が低下することを認めた。さらに、反応時間60分でも Kd 値は1, 10 mM 過酸化水素で有意に上昇した。② Gs 活性はいずれの反応時間、いずれの濃度の過酸化水素でも変化を認めなかった (control 556.4 $\pm$ 32.8 pmol cAMP/mg protein/min, 0.1 mM 過酸化水素563.5 $\pm$ 28.7, 1 mM 540.5 $\pm$ 26.2, 10 mM 541.6 $\pm$ 23.8 : 反応時間10分)。③ AC 活性は、10 mM 過酸化水素と5分の反応ですでに有意な活性の低下を認めた (control 277.1 $\pm$ 19.2 pmol cAMP/mg protein/min, 10 mM 過酸化水素230.3 $\pm$ 14.9; p < 0.05)。この10 mM 過酸化水素による活性低下は反応時間10, 30, 60分でも同様に認められた。④心筋膜を10 mM 過酸化水素で10分反応させ GTP, GTP + isoproterenol, Gpp (NH) p, Gpp (NH) p + isoproterenol, forskolin で刺激した時の cAMP 産生量は、それぞれ19.4, 19.3, 21.3, 20.1, 18.1%

の産生量の低下を認めたと、各群間に有意な差はなく、また反応時間60分でも同様な結果であった。10 mM 過酸化水素との反応では $\beta$ 受容体数とGs活性に変化がなく、AC活性が18.1%低下していることより、これらの間のカップリングは変化しないことがわかった。

【結論】活性酸素の心筋 $\beta$ -receptor systemに及ぼす影響について検討し以下の結果を得た。過酸化水素投与により、1)  $\beta$ 受容体のKd値が増加、2) AC活性が低下するが、3)  $\beta$ 受容体のBmax、Gs活性、 $\beta$ -receptor systemのカップリングには変化を及ぼさないことを認めた。以上より、活性酸素は、 $\beta$ 受容体の親和性と、AC活性を低下させることにより心機能に影響を及ぼすことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

活性酸素種は種々病的状態での細胞傷害に関与しているという根拠により、申請者らの研究班はこれまでに、心筋収縮の調節に関与しているcAMPの産生系である $\beta$ -receptor systemに対する活性酸素の影響を調べてきた。この $\beta$ -receptor systemは $\beta$ 受容体、刺激性GTP結合蛋白(Gs)、アデニレートシクラーゼ(AC)から構成される。これまで活性酸素は、 $\beta$ 受容体密度(Bmax)、親和性(Kd)やAC活性に影響を及ぼすことが報告されているが、Gs活性への影響は研究されていない。申請者は本研究において、活性酸素の一種である過酸化水素が、ラット心筋膜のGs活性と $\beta$ -receptor systemのカップリングに及ぼす影響を主として調べようとした。

この研究での特色は心筋膜のGs活性の測定に工夫をした点にある。従来の方法では、活性酸素と反応した $\beta$ -receptor系のGsを直接刺激して産生したcAMP量を測定していたが、この方法ではアデニレートシクラーゼも活性酸素の影響を受けるので、cAMPの産生量にも影響が生じる。申請者はこの影響を除外する為に、心筋膜からのGsのみを過酸化水素と反応させた後に、これを先天的にGsが欠損している細胞であるS49マウスリンパ腫細胞(cyc<sup>-</sup>)の細胞膜と混和して再構成をした系でのcAMPを測定するという斬新な方法を用いている。

この研究ではラットの心筋膜と種々の濃度の過酸化水素を時間別に反応させて次の実験項目の検討をおこなった。1) ラジオレセプターアッセイ法によって、 $\beta$ 受容体密度と親和性を調べた。2) Gs活性を、先に述べた再構成系でNaF刺激により産生するcAMP量を測定することにより調べた。3) AC活性をforskolin刺激により産生するcAMP量を測定することにより調べた。4)  $\beta$ -receptor, Gs, AC間のカップリングに及ぼす影響をGTP, GTP+isoproterenol, guanylimidodiphosphate [Gpp (NH) p], Gpp (NH) p + isoproterenol, およびforskolin刺激によりそれぞれ産生するcAMP量を測定して検討した。

この研究の結果、次のことが分かった。過酸化水素投与により、1)  $\beta$ 受容体の親和性が低下したこと、2) アデニレートシクラーゼ活性が低下したこと、3)  $\beta$ 受容体の密度、Gs活性、 $\beta$ -receptor systemのカップリングには変化を来さないこと、である。このことから申請者は活性酸素の一種である過酸化水素は $\beta$ 受容体の親和性とAC活性を低下させることにより心機能に影響を及ぼすことが示唆されたと考えている。

本論文の審査過程で次のような質疑がなされた。

- 1) S49マウスリンパ腫細胞の細胞膜との再構成系の機能(AC活性)に対する心筋膜Gsの濃度の影響は検討されているか。
- 2) 過酸化水素を選んだ理由、そして用いた濃度を選択した理由。

- 3) Kd 変動の意義について。
- 4) 過酸化水素は鉄などの金属が存在しない時にどのような機構で影響するのか。
- 5) EDTA 添加の検討はなされているか。
- 6) cardiac membrane の量と AC 活性との相関関係は調べてあるか。
- 7) この場合のカップリングの本態は何か。
- 8) 過酸化水素の AC 活性阻害は直接的なものか。
- 9) カタラーゼは cardiac membrane 標品中に存在するか。
- 10) Gs の活性は AC 活性で間接的に測定しているが、これは Gs の活性をどの程度反映しているか。
- 11) 過酸化水素の膜の脂肪への影響はどうか。
- 12) 虚血・再灌流障害と本研究との関係。

以上の質疑に対する申請者の応答は概ね適切と認められ、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 市 山 新 副査 教授 中 島 光 好

副査 助教授 鮫 島 道 和 副査 助教授 菱 田 明