

## 心筋トロポニンの $\text{Ca}^{2+}$ 結合に及ぼす oxygen free radicals の影響

### Effects of oxygen free radicals on $\text{Ca}^{2+}$ binding to cardiac troponin

浜松医科大学 第三内科 \*光子医学研究センター

\*\*南通医学院病理生理学 (中華人民共和国)

金子 雅則・鈴木 秀樹・増田 尚道

\*\*袁 国祥・\*林 秀晴・小林 明

山崎 昇

Third Department of Internal Medicine, and \*Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine. \*\*Department of Pathophysiology, Nantong Medical College. Masanori Kaneko, Hideki Suzuki, Hisamichi Masuda, \*\*Guoxiang Yuan, \*Hideharu Hayashi, Akira Kobayashi, and Noboru Yamazaki.

#### 〔はじめに〕

心筋の収縮はアクチンとミオシンの相互作用によって生じ、この相互作用は細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度とトロポニンによって調節されている。トロポニンは、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位であるトロポニンC、アクトミオシンATPase 活性を抑制しているトロポニンI、および、トロポミオシンとの結合部位であるトロポニンT、の3つのサブユニットからなっている。牛心筋のトロポニンCには、2つの high affinity site ( $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Mg}^{2+}$  と結合) と1つの low affinity site ( $\text{Ca}^{2+}$  specific site) の2種類の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位があり、この  $\text{Ca}^{2+}$  specific site が心筋の収縮、弛緩の調節に関与していることが知られている。 $\text{Ca}^{2+}$  specific site に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合していない状態では、トロポニンIがアクチンとミオシンの interaction を抑制している。細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇にともない  $\text{Ca}^{2+}$  specific site に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると、トロポニンIとアクチンの結合はずれアクチンとミオシンの interaction が可能となり心筋の収縮が生じる。したがって、トロポニンCの  $\text{Ca}^{2+}$  結合能の変化は心機能に重大な影響をおよぼすと考えられる。一方、近年、心筋の虚血-再灌流障害を含めた種々の病態において、活性酸素ラジカルの細胞障害性の関与が注目されている。そこで、今回、心筋トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす活性酸素ラジカルの影響について検討した。

#### 〔対象、および、方法〕

牛の心室筋を用いて Tsukui and Ebashi らの方法<sup>1)</sup>によりトロポニンを分離した後、混入した  $\text{Ca}^{2+}$  を透析により除去した。得られた心筋トロポニンの純度は SDS-polyacrylamide gel electrophoresis にて検討した。トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合は、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性電極を用いた Iida and Potter らの方法<sup>2)</sup>にて測定し

た。活性酸素ラジカル産生系としては、xanthine (X) + xanthine oxidase (XO)系と過酸化水素を、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。XO はその溶液に含まれる EDTA を除去するために、10mM Tris-HCl, pH7.4 溶液で 4℃ 下で24時間透析した。

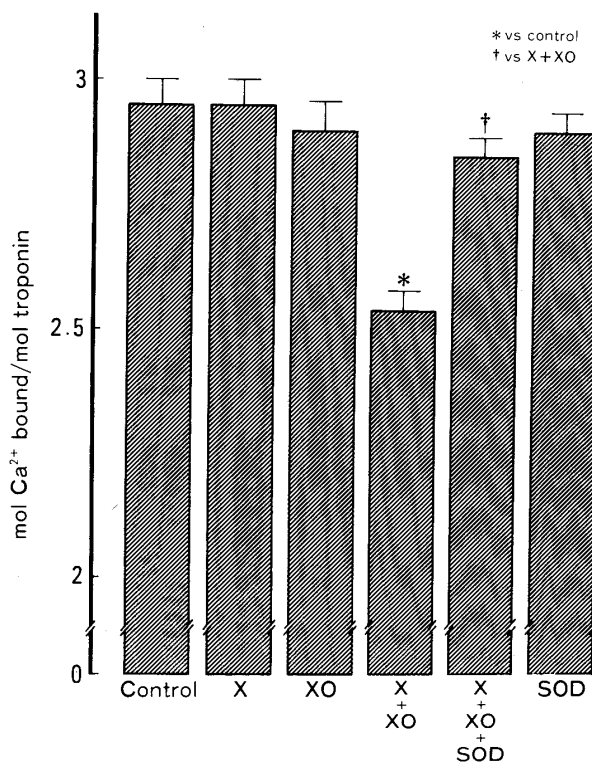


Figure 1:  
Effects of xanthine plus xanthine oxidase on  $\text{Ca}^{2+}$  binding to troponin

予備実験において、トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合曲線は  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  以上の free  $\text{Ca}^{2+}$  存在下において飽和されたことから、この濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  をもちいて測定をおこなった。結果は mean  $\pm$  SE で示した。統計学的検討には Duncan's multiple range test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 【結果】

活性酸素ラジカルの心筋トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす影響：

Figure 1 に xanthine + xanthine oxidase のトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす影響について検討した結果を示す。トロポニン (10mg protein/tube) を  $37^\circ\text{C}$  で10分間、xanthine + xanthine oxidase 系と preincubation した後、 $\text{Ca}^{2+}$  結合を測定した。Xanthine

Table 1: Incubation time-dependent effects of xanthine plus xanthine oxidase on  $\text{Ca}^{2+}$  binding to troponin

Incubation time	$\text{Ca}^{2+}$ binding (mol $\text{Ca}^{2+}$ bound/mol troponin)	
	Control	X+XO
10 min.	$2.95 \pm 0.05$	$2.54 \pm 0.04^*$
20 min.	$2.88 \pm 0.06$	$2.40 \pm 0.05^*$
30 min.	$2.84 \pm 0.08$	$2.27 \pm 0.07^{*\dagger}$

\* vs control

† vs X+XO (10 min. incubation)

Table 2: Effects of hydrogen peroxide on Ca binding to troponin

Concentration of $\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)	$\text{Ca}^{2+}$ binding (mol $\text{Ca}^{2+}$ bound/mol troponin)	
	-catalase	+catalase
Control	$2.96 \pm 0.06$	$2.93 \pm 0.05$
0.01	$2.97 \pm 0.03$	$2.90 \pm 0.07$
0.1	$2.79 \pm 0.07$	$2.93 \pm 0.04$
1.0	$2.58 \pm 0.05^*$	$2.91 \pm 0.03^\dagger$
10	$2.34 \pm 0.07^*$	$2.78 \pm 0.09^\dagger$

\* vs control

† vs without catalase

(6mM), xanthine oxidase (0.09 U/ml), および SOD (160  $\mu\text{g/ml}$ ) 単独ではトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合には有意な変化は認めなかったが、xanthine + xanthine oxidase 群では  $2.54 \pm 0.04 \text{mol Ca}^{2+} \text{ bound/mol troponin}$  とコントロール群の  $2.95 \pm 0.05 \text{mol Ca}^{2+} \text{ bound/mol troponin}$  に比し有意に低値を示した。この、xanthine + xanthine oxidase によるトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合の抑制は SOD の添加により  $2.85 \pm 0.04 \text{mol Ca}^{2+} \text{ bound/mol troponin}$  と

有意に保護された。次に、xanthine + xanthine oxidase の  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす影響の反応時間依存性について検討した。(Table 1) トロポニンを xanthine

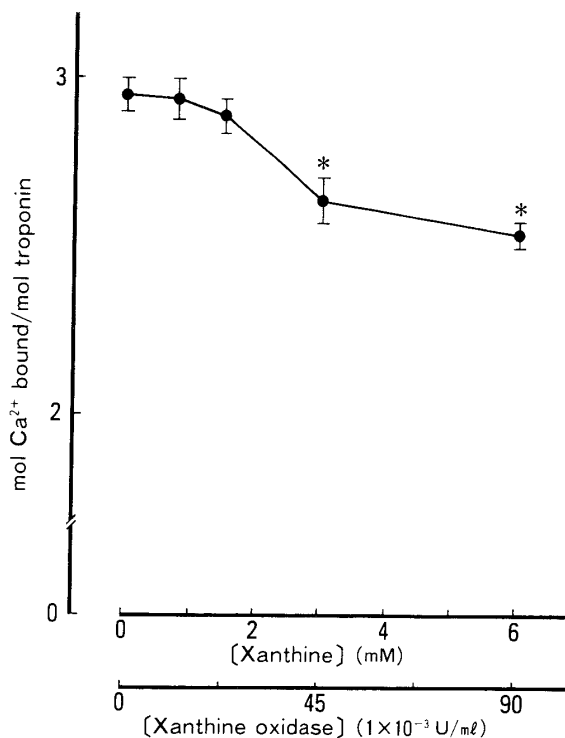


Figure 2: Dose-dependent effects of xanthine plus xanthine oxidase on  $\text{Ca}^{2+}$  binding to troponin

+ xanthine oxidase 存在下、および、非存在下(コントロール群)で、 $37^\circ\text{C}$ 、10、20、および、30分間 preincubate した。Table 1 に示したごとくトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合は xanthine + xanthine oxidase により反応時間依存性に抑制された。濃度依存性について検討した結果 (Figure 2) では、 $37^\circ\text{C}$ 、10分間の pre-incubation の条件下で、xanthine 3 mM, xanthine oxidase 0.045 U/ml 以上の濃度でトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合は有意に抑制された。

過酸化水素は、それ自体はラジカルではないが、組織障害性を有する活性酸素の一つである。種々の濃度の過酸化水素のトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす影響についても検討した。(Table 2) トロポニンを過酸化水素と  $37^\circ\text{C}$  で10分間 preincubate した後  $\text{Ca}^{2+}$  結合を測定した。0.01、および、0.1 mM の過酸化水素では  $\text{Ca}^{2+}$  結合に有意な変化は認められなかったが、1、および、10 mM の過酸化水素ではト

トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合は有意に抑制された。この抑制は、過酸化水素のスカベンジャーである catalase の添加により有意に保護された。

活性酸素ラジカルのトロポニンの sulfhydryl-groups (SH 基) に及ぼす影響：

活性酸素ラジカルにより心筋トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合が抑制されることを示したが、その機序について検討するために、ラジカルのトロポニンの SH 基に及ぼす影響について検討した。(Figure 3) Xanthine (6 mM), xanthineoxidase (0.09 U/ml), および, SOD (160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 単独 (37°C, 10分間反応) では、トロポニンの SH 基濃度に有意な変化は認めなかったが、xanthine + xanthine oxidase 群では  $2.98 \pm 0.10 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  とコントロール群の  $5.15 \pm 0.31 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  に比し有意に低値を示した。また、xanthine + xanthine oxidase による SH 基の減少は SOD の添加により有意に保護された。こうした結果は、活性酸素ラジカルにより心筋トロポニンの SH 基が oxidation を受けることを示唆している。しかしながら、SH 基の inhibitor である N-ethylmaleimide (NEM) のトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に及ぼす影響について検討した結果 (Figure 4) では、10mM までの NEM ではトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合に有意な変化は認められなかった。

[総括]

摘出動物心筋を活性酸素ラジカル産生系で灌流す

ると心筋の収縮不全が生じることが知られている。この活性酸素ラジカルによる心筋細胞障害の機序に関しては種々の研究がなされている。細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$ -pump や  $\text{Na}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系の抑制による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞外への汲み出し機構の障害と、筋小胞体 (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -pump 活性の抑制による細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  の SR への uptake の低下により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  overload が生じ、この  $\text{Ca}^{2+}$  overload が活性酸素ラジカルによる心筋機能障害の一因であろうと考えられている。今回、我々は、活性酸素ラジカルにより心筋トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合が障害されることを示した。また、従来から、活性酸素ラジカルによる膜結合酵素活性抑制の機序として、酵素蛋白の sulfhydryl groups (SH 基) の oxidation の重要性を報告してきたが、トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合の抑制の機序としては、トロポニン構成アミノ酸の修飾による可能性が考えられた。

活性酸素ラジカルによる心筋機能障害の成因として、ラジカルによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の変化とともに、心筋収縮調節蛋白であるトロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合能の低下が関与している可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) R. Tsukui, S. Ebashi. J. Biochem. 1973;73; 1119.
- 2) S. Iida, J. D. Potter. J. Biochem. 1986; 99; 1765.

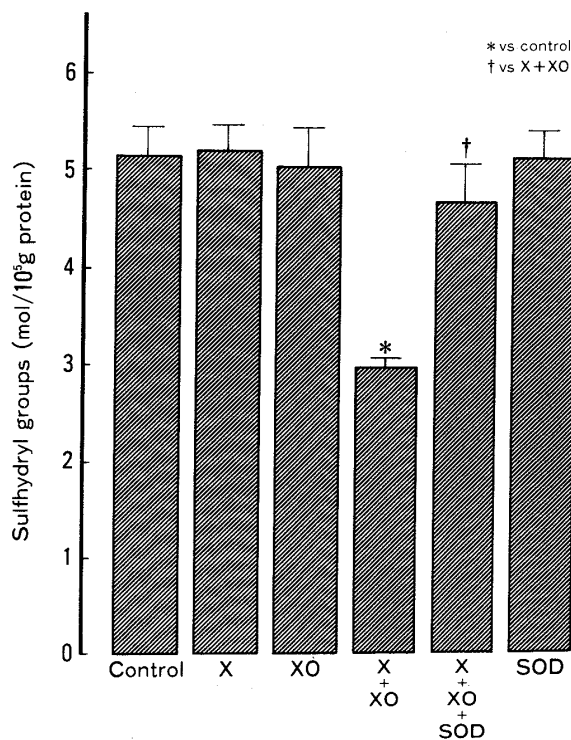


Figure 3 : Effects of xanthine plus xanthine oxidase on sulfhydryl groups of troponin

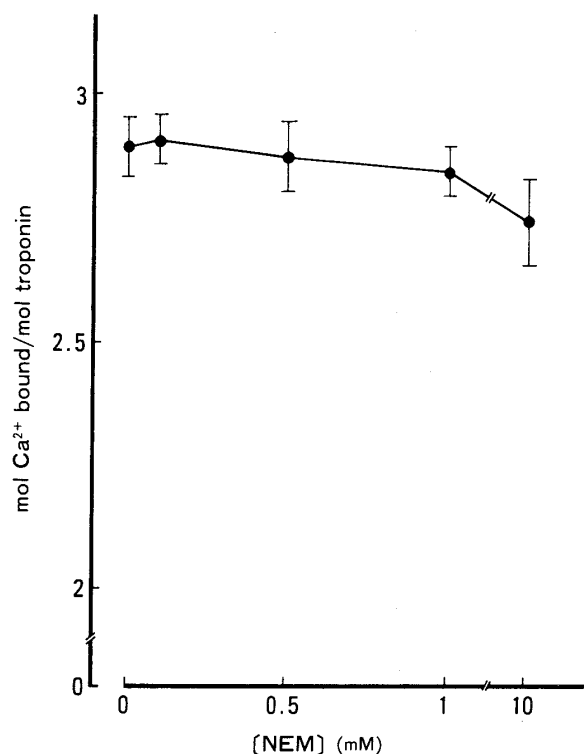


Figure 4 : Effects of N-ethylmaleimide on  $\text{Ca}^{2+}$  binding to troponin