HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Protein kinase A catalytic subunit alters cardiac mitochondrial redox state and membrane potential via the formation of reactive oxygen species

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長坂, 士郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/343

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　４８６号	学位授与年月日	平成１９年　３月１４日
氏　　名	長　坂　士　郎		
論文題目	Protein kinase A catalytic subunit alters cardiac mitochondrial redox state and membrane potential via the formation of reactive oxygen species (Protein kinase A catalytic subunit は活性酸素種の形成を介して心臓ミトコンドリアの酸化還元状態と膜電位を変化させる)		

博士(医学)　長 坂 士 郎

論 文 題 目

Protein kinase A catalytic subunit alters cardiac mitochondrial redox state and membrane potential via the formation of reactive oxygen species

(Protein kinase A catalytic subunitは活性酸素種の形成を介して心臓ミトコンドリアの酸化還元状態と膜電位を変化させる)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

βアドレナリン刺激は、細胞内セカンドメッセンジャーであるcyclic AMP依存性protein kinase A (PKA) を介して、細胞内の機能性蛋白をリン酸化することで生物活性を発揮する。最近、ミトコンドリア膜上においてPKA anchoring proteins やPKAによりリン酸化されると考えられる蛋白構造が同定され、PKAがミトコンドリア機能を直接的に修飾する可能性が示唆されている。しかし、βアドレナリン刺激時のPKAとミトコンドリア代謝との関連についての詳細は不明である。

〔材料ならびに方法〕

実験材料にはサポニンで膜除去 (permeabilize) したラット心筋細胞を使用した。共焦点レーザー顕微鏡を用い、PKAcatalytic subunit (PKA_{cat}; 50 unit/ml) を投与時のミトコンドリア代謝の変化を、(1) ミトコンドリア酸化還元状態はflavin adenine dinucleotide (FAD) の自家蛍光、(2) ミトコンドリア膜電位は蛍光色素tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 20 nmol/L) の蛍光強度、(3) 活性酸素種の産生は蛍光色素2'7'-dichlorofluorescin diacetate (DCF: 10 μmol/L) の蛍光強度を測定することで観察した。

〔結果〕

(1) PKA_{cat} (50 unit/ml) によりFAD自家蛍光はコントロールの56.6 ± 7.9 % (P<0.01) 上昇し、その効果はPKA_{cat}の抑制薬 (PKI; 20 μmol/L) の同時投与により抑制された。PKA_{cat} によるFAD自家蛍光の上昇効果は細胞質のCa^{2+}の有無に影響されなかった。(2) PKA_{cat} (50 unit/ml) によりTMRE蛍光はコントロールの48.1 ± 9.5 % (P<0.01) にまで低下したことより、ミトコンドリア膜電位が脱分極したことが示された。その効果はPKI (20 μmol/L) の同時投与により抑制された。PKA_{cat}によるTMRE蛍光の減少効果は細胞質のCa^{2+}の有無に影響されなかった。(3) PKA_{cat} (50 unit/ml) によりDCF蛍光はコントロールの10.5 ± 3.3倍 (P<0.01) に上昇した。活性酸素種のスカベンジャーであるTrolox (100 μmol/L) の同時投与はPKA_{cat}によるDCFの上昇を抑制した。(4) PKA_{cat}によるFAD自家蛍光の上昇およびTMREの低下は、Trolox (100 μmol/L) の同時投与により抑制された。(5) PKA_{cat}によるTMRE低下は、ミトコンドリア内膜に存在するinner membrane anion channel (IMAC) の抑制薬である4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS: 1 μmol/L)で抑制されたが、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の抑制薬であるcyclosporin A (100 nmol/L) では抑制されなかった。

〔考察〕

本実験では、膜除去された心筋細胞を用いることにより、細胞内構造を保った状態で正確に細胞質の

Ca^{2+}やATP濃度を制御することが可能である。このことは、PKAのミトコンドリアへの直接作用を観察する際に、Ca^{2+}やATP濃度の影響を排除することが出来る点において有効であると考えられる。またβアドレナリン刺激によりPKA以外の細胞内シグナリングカスケードを活性化することが知られているが、膜除去された細胞を用いた実験ではそれらの影響も排除することで、PKAのミトコンドリアへの直接作用を観察できるのも特徴である。心筋細胞内におけるPKAの生理的濃度は確立されていないが、パッチクランプ法による予備実験で、本実験と同等の濃度（50 unit/ml）のPKA_{cat}を細胞内に灌流すると、β刺激剤であるイソプロテレノール（1 μM）の投与時と同等程度の電位依存性Ca^{2+}電流の増加が認められた。

従来からβアドレナリン刺激時の活性酸素種増加が心筋における細胞障害の原因の１つと考えられていたが、活性酸素種の起源としてはカテコラミンの自己酸化やPKA以外の細胞内カスケードの影響などが報告されていた。本研究によりPKA_{cat}が直接ミトコンドリア内で活性酸素種を増加させ、活性酸素種のスカベンジャーによりその産生が抑制されることをはじめて明らかにした。

活性酸素種によるミトコンドリア膜電位の脱分極（TMRE蛍光強度の減少）の機構として、ミトコンドリア膜透過性遷移孔、ミトコンドリア内膜の変性、IMACの関与などが報告されている。本研究において、PKA_{cat}によるミトコンドリア膜電位の脱分極がIMACの抑制薬であるDIDSで抑制され、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の抑制薬であるcyclosporin Aでは抑制されなかったことから、活性酸素種によるミトコンドリア膜電位の脱分極にはIMACが関与していると考えられた。ミトコンドリア膜電位を変化させうるその他の機構として、FoF_1-ATPase、ミトコンドリアCa^{2+}依存性 K^+チャネル、脱共役蛋白などの報告があるが、FoF_1-ATPaseの抑制剤やCa^{2+}除去溶液を用いた実験の結果から、本実験系ではいずれの関与も小さいと考えられた。

細胞障害とPKA_{cat}との関連については、高濃度のPKA_{cat}では活性酸素種の増加によるミトコンドリア膜電位脱分極の程度は大きく、細胞障害をきたす可能性が考えられた。一方、低濃度のPKA_{cat}ではミトコンドリア膜電位の脱分極はほとんど認めず、活性酸素種の増加も微小であった。少量の活性酸素種は細胞保護的な役割を担うとの報告が散見され、低濃度のPKA_{cat}はミトコンドリア機能を損なうことなく、心筋を保護するように働いている可能性が示唆された。

〔結論〕

PKA_{cat}は、膜除去されたラット心筋細胞のミトコンドリアにおいて、濃度依存性に活性酸素種産生の増加をもたらし、それによりミトコンドリア膜電位の脱分極とミトコンドリア酸化還元状態の亢進を惹起した。PKA_{cat}により増加した活性酸素種は、IMACを介してミトコンドリア膜電位を脱分極させると考えられた。PKA_{cat}によるミトコンドリア代謝状態の変化は、心不全などβアドレナリンの過剰刺激をきたす病態時における、心機能低下の機構の1つである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

βアドレナリン受容体刺激は、cyclic AMP依存性protein kinase A（PKA）を介して、細胞内の機能性蛋白をリン酸化することで生物活性を発揮することが知られている。ところが最近、ミトコンドリア膜上においてPKA anchoring proteins やPKAによりリン酸化されると考えられる蛋白構造が同定され、PKAがミトコンドリア機能を直接的に修飾する可能性が示唆されるようになった。しかし、βアドレナリン受容体刺激時のPKAとミトコンドリア代謝との関連についての詳細は不明である。そこで申請者は、膜除去

された心筋細胞を用いることにより、細胞質内のCa^{2+}やATP濃度、細胞内シグナリングカスケードの影響を排除して、PKAのミトコンドリアへの直接作用を観察した。

材料にはサポニンで膜除去（permeabilize）したラット心筋細胞を使用し、細胞内構造を保った状態で実験を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用い、PKA catalytic subunit（PKA_{cat}; 50 unit/ml）を投与時のミトコンドリア代謝の変化を、(1) ミトコンドリア酸化還元状態はflavin adenine dinucleotide（FAD）の自家蛍光、(2) ミトコンドリア膜電位は蛍光色素tetramethylrhodamine ethyl ester（TMRE: 20 nmol/L）の蛍光強度、(3) 活性酸素種の産生は蛍光色素2'7'-dichlorofluorescin diacetate（DCF: 10 μmol/L）の蛍光強度を測定することで観察した。

(1) PKA catalytic subunit（PKA_{cat}; 50 unit/ml）によりFAD自家蛍光はコントロールの56.6 ± 7.9 %（P<0.01）上昇し、その効果はPKA_{cat}の抑制薬（PKI; 20 μmol/L）の同時投与により抑制された。PKA_{cat} によるFAD自家蛍光の上昇効果は細胞質のCa^{2+}の有無に影響されなかった。(2) PKA_{cat}（50 unit/ml）によりTMRE蛍光はコントロールの48.1 ± 9.5 %（P<0.01）にまで低下したことより、ミトコンドリア膜電位が脱分極したことが示された。その効果はPKI（20 μmol/L）の同時投与により抑制された。PKA_{cat}によるTMRE蛍光の減少効果は細胞質のCa^{2+}の有無に影響されなかった。(3) PKA_{cat}（50 unit/ml）によりDCF蛍光はコントロールの10.5 ± 3.3倍（P<0.01）に上昇した。活性酸素種のスカベンジャーであるTrolox（100 μmol/L）の同時投与はPKA_{cat}によるDCFの上昇を抑制した。(4) PKA_{cat}によるFAD自家蛍光の上昇およびTMREの低下は、Trolox（100 μmol/L）の同時投与により抑制された。(5) PKA_{cat}によるTMRE低下は、ミトコンドリア内膜に存在するinner membrane anion channel（IMAC）の抑制薬である4,4'–diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid（DIDS: 1 μmol/L）で抑制されたが、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の抑制薬であるcyclosporin A（100 μmol/L）では抑制されなかった。

以上の様に、申請者はPKA_{cat}が濃度依存性に活性酸素種産生を促進し、ミトコンドリア膜電位の脱分極とミトコンドリア酸化還元状態の亢進を惹起すること、この活性酸素種によるミトコンドリア膜電位の脱分極がIMACを介しておこる可能性を見出した。そしてPKAによるミトコンドリア代謝状態の変化は、心不全などβアドレナリン受容体の過剰刺激をきたす病態における、心機能低下の機構の1つである可能性があることを示唆した。

審査委員会では、申請者がPKA_{cat}が直接ミトコンドリア内で活性酸素種を増加させ、活性酸素種のスカベンジャーによりその産生が抑制されることをはじめて明らかにした点、また活性酸素種によるミトコンドリア膜電位の脱分極の機構として、IMACが関与している可能性を見出した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

1）室温（22 ℃）で実験を行った妥当性
2）AKAPのミトコンドリア膜以外での局在はどうか
3）サポニンによって形成された孔を透過する物質はどのようなものか
4）AKAPと調節蛋白との相互作用はあるのか
5）DCFの蛍光強度が活性酸素種によって変化するメカニズムと選択性
6）Ca^{2+}存在下ではPKA_{cat}によるFAD増加の回復過程が遅れるのではないか
7）Troloxは定常状態の活性酸素種の産生を抑制したか、その作用は選択的か
8）DIDSはIMAC以外にも多くのCl^-チャネルや交換輸送に作用するのではないか
9）PKA_{cat}によるFAD増加とミトコンドリア膜電位変化の時間経過の関係

10）単離したものとskinned fiber中のミトコンドリアでPKAによる活性酸素種生成に対する効果が逆になる理由についての考察は

11）PKIはβアゴニスト刺激による活性酸素種の産生も抑制するか

12）細胞質のCa^{2+}濃度をさらに上げるとPKA_{cat}の作用も変化した可能性はないか

13）カテコラミンが持続的に高い状態はインビボでも実際に起こりえる現象か

14）exchange protein directly activated by cAMP（EPAC）の作用は全く考慮しなくてもよいのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　　主査　福　田　敦　夫

副査　梅　村　和　夫　　副査　最　上　秀　夫