



Effects of Long-Chain Acyl Carnitine on Membrane Fluidity of Human Erythrocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 裕司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/919

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 66号	学位授与年月日	昭和63年 3月25日
氏名	渡邊裕司		
論文題目	Effects of Long-Chain Acyl Carnitine on Membrane Fluidity of Human Erythrocytes (長鎖アシルカルニチンの赤血球膜流動性におよぼす影響)		

Effects of Long-Chain Acyl Carnitine on Membrane Fluidity of Human Erythrocytes

(長鎖アシルカルニチンの赤血球膜流動性におよぼす影響)

論文の内容の要旨

心筋虚血時、長鎖アシルカルニチン及びCaの心筋細胞内蓄積はすでによく知られており、長鎖アシルカルニチンのlipid amphiphile(両親媒性物質)としてのdetergent作用が虚血細胞障害の一因として注目されているが、その機序はいまだ明らかにされたとはいえない。本研究ではelectron spin resonance(ESR)スピンラベル法を用い、長鎖アシルカルニチンの一つであるpalmitoyl carnitine(PC)の赤血球膜流動性に及ぼす影響と、それに対するcalcium負荷の効果について検討した。

[方法] スピンラベル法は、不対電子スピンを持った安定有機ラジカルをプローブとして生体膜に結合させ、プローブ周辺の膜動態を観察する方法である。本研究では5-doxyl stearic acid(DSA)を用い、ヒト赤血球膜にラベルした。

- (1) PC投与群: PC(30, 100, 150 μ M)をラベル赤血球に投与し、ESRシグナルの変化を経時的(5, 10, 20, 30, 45, 60, 90分)に観察した。
- (2) Ca負荷群: Ca(1, 2.8 mM)をラベル赤血球に投与し、上記の時間経過におけるESRシグナルを観察した。またCa 2.8 mMとPC 100 μ Mの同時投与における影響を検討した。
- (3) ESRシグナルの解析: ESRシグナルの観察は、JEOL JES-FE2XGスペクトロメーターを用い、出力8 mW、磁場3280 \pm 50 Gauss、変調100 KHz、2.0 Gauss、応答時間0.1秒、掃引時間8分、温度37.0°Cの条件にて行った。膜流動性の指標としてOrder parameter SをGaffneyの方法に従い算出した。

[結果] (1) PC投与により、incubate 5分でOrder parameter Sは低下したがその後徐々にOrder parameter Sは上昇し100 μ Mでは30分で、150 μ Mでは20分でピークに達し、その後再びOrder parameter Sは低下するという三相性の変化を示した。

(2) Ca負荷により、1 mMでは有意な変化を認めなかったが、2.8 mMではOrder parameter Sは有意に上昇した。Ca(2.8 mM)とPC(100 μ M)の同時投与によりPC単独投与に比しOrder parameter Sの上昇が有意に増強した。

[考察] 生体膜は細胞内外のbarrierとして種々の代謝物質に対する選択的輸送能を有し、膜に存在するホルモンレセプターや膜酵素系の活性化の場として代謝上極めて重要な役割を持っている。これらの膜機能はその膜流動性の変化により、大きな影響を受けることが考えられる。生体膜はflip-flop, lateral diffusion及びアシル鎖の屈曲運動などを行い、流動的な構造をなしている。Order parameter Sは、このような膜リン脂質アシル鎖の足振り運動の大きさを表すパラメーターとして使用され、値の大きい程足振り運動は小さく、膜流動性が低下していることを示す。PC投与による初期の膜流動性の上昇はlipid amphiphileとしてのdetergent作用によるものであることが推測されたが、その後の膜流動性低下は1)細胞内に増加してくる遊離Caによる脂質状態の変化、2)裏打ち蛋白のリン酸化低下などによってもたらされるprotein-lipid interactionの変化、3)脂質成分の変化などによる二次的な構造変化であることが示唆される。またそれに引きつづく膜流動性の上昇は、その後溶血が認められることより膜構造の非可逆的な破壊を意味するものと考えられる。なおCa負荷によりPCによる膜流動性の低下が有意に増強したことよりCaがPCによる膜障害を増悪させる可能性が考えられた。

[総括] 虚血心筋細胞障害における重要な要因として、長鎖アシルカルニチンによる膜流動性低下の関与が考えられ、心筋内Ca濃度の上昇がこの膜障害をさらに増強する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者のグループはこれまで心筋虚血時に細胞内に蓄積する長鎖アシルカルニチンの一つである palmitoyl Carnitine が虚血障害の一因を成していることを電気生理学的、生化学的に検討してきた。Acyl-CoAはミトコンドリア内膜を通過できないため、Carnitineと結合し、Acyl-Carnitineとなり内膜を通過する。ミトコンドリア内では再度Acyl-CoAとなり、 β 酸化をうけ、TCAサイクルに入り、最終的には電子伝達系により酸化が完成し、ATPが産生される。虚血時には O_2 低下により β 酸化、電子伝達系が抑制されるため、Acyl Carnitineが細胞内に増加し、これがミトコンドリア膜、細胞膜を障害すると思われる。しかし一方、Acyl Carnitineが膜を直接障害することは、心筋について示されていない。申請者はElectron Spin Resonance (ESR) スピンラベル法を用いて、長鎖アシルカルニチンの一つである Palmitoyl Carnitine の赤血球膜流動性に及ぼす影響と、それに対する Calcium 負荷の効果について、Order Parameter S を指標として比較することにより検討した。

Palmitoyl Carnitine を 100 μ M、150 μ M 投与すると Order Parameter S は時間的に三相性に変化した。第一相は 5 分をピークに出現し Order Parameter S の減少、すなわち膜流動性増加の時期である。膜流動性はその後徐々に減少し、30 分位で膜流動性低下のピークを認め、赤血球は Echinocytes の形態をとる。さらに時間が経過すると膜流動性は再度上昇し、赤血球は溶血等の不可逆的变化を示すようになる。この際、 Ca^{2+} を投与すると第二相の膜流動性減少が早期に出現する。このことは Ca^{2+} 濃度の上昇が Palmitoyl Carnitine による膜障害を増強させる可能性を示している。

このように ESR スピンラベル法を用い、心筋虚血時の Palmitoyl Carnitine による膜障害の可能性が直接的に示された優れた発表であった。その後、この論文に関連して次のような質問がなされた。

- (1) 膜流動性変化の機序
- (2) Palmitoyl Carnitine が心筋虚血時増加する機序
- (3) ATP のミトコンドリア膜透過性
- (4) 赤血球膜と心筋細胞膜の異同
- (5) この研究の臨床応用とその意義
- (6) Free Radicals の心筋障害における関与と意義
- (7) Reperfusion Injury の機序
- (8) CPK, LDH 等の Reperfusion Injury に及ぼす影響

以上の質問に対する申請者の応答はおおむね正しく、また論文内容も学位論文としての独創性、重要性を充分に有していると評価された。

論文審査担当者	主査	教授	高田	明和			
	副査	教授	阪口	周吉	副査	教授	中島光好
	副査	助教授	太田	英彦	副査	助教授	平光忠久