

博士(医学) 大谷 速人

論文題目

Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in rat ventricular myocytes

(ラット心室筋細胞における一酸化窒素のミトコンドリア膜透過性遷移孔とチオール基を介した反応に対する効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

一酸化窒素 (NO)は、生理的条件下の心筋細胞機能の調節機構において重要な役割を果たしている。一方、NO は心筋梗塞や心不全などの病的状態において増加し、細胞保護と細胞障害という機能的な二面性を有することが報告されている。ミトコンドリアはアポトーシスなどの細胞障害において重要な細胞内小器官であるが、NO がミトコンドリア機能、特にミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)に及ぼす効果とその機序を検討した報告は少ない。

〔材料ならびに方法〕

雄 Sprague-Dawley ラット (7~10 週齢、体重 250-350g)の心筋細胞を、コラゲナーゼを用いて単離し、続いてサポニン溶液 (0.05 mg/ml)により化学的に細胞膜除去処理をした。室温で細胞内溶液 (組成: 50 KCl, 80 K-aspartate, 4 Na-pyruvate, 20 HEPES, 3 MgCl₂·6H₂O, 2 Na₂ATP, 3 EGTA ; 単位 mM、[Ca²⁺] =177 nM)で持続灌流した。ミトコンドリアの機能として、ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)の測定には tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 10 nM)を、mPTP 開口の評価には calcein (1 μ M)を用い、NO のドナーである spermine NONOate (NONOate: 0.5-500 μ M)を投与時の蛍光強度の変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

〔結果〕

(1) 高濃度の NONOate (500 μ M)の投与により、 $\Delta\Psi_m$ は脱分極した。この反応は NO の scavenger である carboxy-PTIO の投与、または mPTP の阻害薬である cyclosporine A により抑制された。このことから、NO による mPTP の開口により $\Delta\Psi_m$ が脱分極したと考えられた。また、低濃度 (0.5-50 μ M)の NO は $\Delta\Psi_m$ に影響を与えなかった。

(2) 高濃度の NONOate の投与により、calcein の蛍光強度が低下したことより、mPTP の開口が示唆された。この反応は carboxy-PTIO や cyclosporine A により抑制された。また、低濃度の NONOate の投与では、calcein の蛍光強度は変化しなかった。

(3) 低濃度 NO による mPTP の保護効果を検討した。mPTP の開口薬である atractyloside の投与により mPTP は開口して、 $\Delta\Psi_m$ は脱分極したが、低濃度 NONOate の投与により、atractyloside による mPTP の開口と $\Delta\Psi_m$ の脱分極はいずれも抑制された。

(4) NO はスーパーオキシドと反応して ONOO⁻を産生し、強力な酸化反応を起こす。ONOO⁻の選択的阻害薬である Mn-TBAP を同時投与すると、高濃度の NO による mPTP 開口

を抑制できたが、低濃度の NO による mPTP 開口抑制は影響を受けなかった。これらの結果より、高濃度の NO による mPTP 開口には ONOO⁻の産生が関与することが示唆された。

(5) NO はチオール基を酸化することにより機能を変化させる。チオール基をアルキル化する N-ethylmaleimide (NEM)を同時投与すると、高濃度 NO および低濃度 NO による mPTP への効果は共に抑制された。これにより NO の mPTP に対する効果は、チオール基を介することが示唆された。

(6) NO はチオール基を酸化して、ジスルフィド結合 (SS 結合) を起こす。SS 結合を還元する dithiothreitol (DTT)を同時投与すると、高濃度 NO による mPTP 開口を部分的に抑制したが、低濃度 NO による mPTP 開口抑制効果は変化しなかった。このことより、高濃度 NO による mPTP 開口効果には、ジスルフィド結合が関与することが示唆された。

(7) NO はチオール基をニトロシル化する。ニトロシル化を還元するアスコルビン酸を同時投与すると、低濃度 NO による mPTP 開口抑制効果を軽減したが、高濃度 NO による mPTP 開口効果は変化しなかった。このことから低濃度 NO による mPTP への効果には、ニトロシル化が関与することが示唆された。

〔考察〕

本研究では、NO は細胞膜除去心筋細胞において、mPTP に対して二つの効果を示した。高濃度 NO による mPTP の開口効果と、低濃度 NO による mPTP 開口の抑制効果である。これらの効果には、いずれもチオール基の関与が示唆された。NO の mPTP に対する効果発現の機序としては、cGMP 依存性の経路と cGMP 非依存性に分けられる。本研究では細胞膜除去心筋細胞を使用しており、細胞質の情報伝達分子が存在しないため cGMP 依存性経路の関与は少ないと考えられる。cGMP 非依存性の経路は、主に酸化還元反応によるものであり、代表的な生体内標的分子として蛋白質のシステイン残基におけるチオール基がある。高濃度および低濃度の NO による mPTP への効果は、いずれも NEM の投与により抑制され、チオール基が関与していた。NO によるチオール基の可逆的な修飾として、SS 結合生成とニトロシル化がある。高濃度 NO による mPTP 開口は、Mn-TBAP、DTT の投与により抑制されたことより、ONOO⁻による SS 結合が関与すると考えられた。一方、低濃度 NO の mPTP 開口抑制効果は、アスコルビン酸により抑制されたことより、ニトロシル化が関与していると考えられた。

〔結論〕

NO は濃度依存性に mPTP の開口と抑制を制御し、 $\Delta\Psi_m$ を調節する。病理的状态では NO の過剰な発現が起こり、mPTP を開口して $\Delta\Psi_m$ を脱分極させるが、これは ONOO⁻産生とジスルフィド結合が関与する。一方、生理的濃度の NO は、標的蛋白質をニトロシル化することにより mPTP 開口を抑制する。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素(NO)は、細胞保護と細胞障害という二面性を有すること、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)が開口することで、アポトーシスが引き起こされることが報告されている。そこで、申請者は心筋細胞において、NOがmPTPの開口にどのような影響を与えるかを検討した。

雄 Sprague-Dawley ラットの心筋細胞を、コラゲナーゼを用いて単離し、続いてサポニン溶液により化学的に細胞膜除去処理をした。NOのドナーである spermine NONOate (NONOate) によるミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)とmPTP開口への影響をそれぞれの蛍光試薬の強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

高濃度のNONOate(500 μ M)の投与により、mPTPは開口し、 $\Delta\Psi_m$ は脱分極した。一方、低濃度 (0.5-50 μ M)では、mPTPは開口せず、 $\Delta\Psi_m$ は脱分極しなかった。また、低濃度NOによるmPTPの保護効果を検討したところ、それは atractyloside によるmPTPの開口と $\Delta\Psi_m$ の脱分極をいずれも抑制した。NOによるmPTPの開口に対する作用のメカニズムを検討したところ、高濃度NOによるmPTP開口には ONOO⁻の産生が関与することが示唆された。また、高濃度NOによるmPTP開口には、チオール基が酸化されておこるジスルフィド結合が関与し、低濃度NOによるmPTPの開口抑制には、チオール基のニトロシル化が関与することが示唆された。

申請者は、心筋細胞におけるmPTPの開口に対して、NOは濃度の違いにより二面性を有していることを示した。

審査委員会では、心筋細胞のmPTPの開口において、高濃度と低濃度のNOが異なる作用を有していることを初めて証明したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与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 梅村 和夫
副査 渡邊 裕司 副査 山本 清二