

氏 名	城 日 加 里
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2958 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Calcium - mediated coupling between mitochondrial substrate dehydrogenation and cardiac workload in single guinea - pig ventricular myocytes (単一モルモット心室筋細胞における、ミトコンドリアの基質脱水素化と心筋仕事量との間のカルシウムを介する連関)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 森 治 紀 教 授 野 田 亮 教 授 金 子 武 嗣

論 文 内 容 の 要 旨

心筋細胞における ATP 合成の主たる源はミトコンドリア酸化的リン酸化反応である。生理的条件下において、心筋細胞の ATP 合成速度は ATP 需要に見合うように自動的に調節されるが、調節メカニズムは完全には解明されていない。心筋仕事量が増加し ATP 需要が高まると、ATP 消費の増加により細胞質 ADP と無機リン酸 (Pi) が増加し、ミトコンドリア ATP 合成酵素による ATP 合成が促進されるメカニズムが提唱されている (フィードバックコントロール)。しかし、最近の実験的及び理論的研究によると、in vivo 実験での心臓仕事量を変化させたときの中間代謝物濃度の安定性を説明するには、フィードバックコントロールのみでは充分でない。一方で、単離ミトコンドリアを用いた実験から、マトリックス Ca^{2+} が、脱水素酵素や ATP 合成酵素を活性化することが報告され、 Ca^{2+} がミトコンドリア機能調節の一因子であることが提唱されているが、単離心筋細胞を用いた実験では明らかな証拠は見いだされていない。本論文においては、心筋細胞におけるミトコンドリア機能調節メカニズムを定量的に明らかにすることを目的に、心室筋細胞を様々な刺激頻度で収縮させたときのミトコンドリア Ca^{2+} (Rhod-2 を用いて測定) または NADH 自家蛍光を細胞収縮と共に測定した。

モルモット単離心室筋細胞において、刺激頻度を 0.1 から 3.3 Hz へと段階的に変化し、細胞収縮の頻度と振幅を増加させると、刺激頻度依存性に NADH 蛍光は増加した。刺激頻度を 0.1 から 3.3 Hz へと急激に変えた場合、Rhod-2 を用いて測定したミトコンドリア Ca^{2+} は、遅い時間経過 (半飽和時間 ($t_{1/2}$) 約 12 秒) で増加し (平均でコントロールの 200%), 0.1 Hz に戻すと同様の時間経過でコントロールレベルに回復した ($t_{1/2}$ = 約 12 秒)。ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポート阻害剤の Ru360 投与により、ミトコンドリア Ca^{2+} の増加は抑制された。NADH 蛍光は、3.3 Hz で刺激すると最初コントロールの約 83% まで減少し、その後 155% まで増加した。刺激頻度を 0.1 Hz に戻すと、NADH 蛍光は一過性上昇の後にコントロールレベルに回復した。3.3 Hz 刺激における NADH 蛍光の増加は Ru360 投与により有意に抑制された。

一方、サポニン処理した透過性心筋細胞において、Pi と ADP は濃度依存性に NADH 蛍光を低下させ、半飽和濃度はそれぞれ 0.08 mM, 0.1 mM であった。Pi と ADP の生理的濃度 (3~5 mM と 0.04~0.09 mM) を考慮すると、高頻度刺激時の一過性 NADH 蛍光の低下は ADP によるフィードバックコントロールによることが示唆された。

以上の実験結果から、ADP によるフィードバックコントロールと Ca^{2+} による脱水素酵素活性化の両者によりミトコンドリア機能は調節されると結論された。すなわち、高頻度刺激時には、ADP 増加が一過性のミトコンドリア NADH 低下を引き起こし、遅れて増加するマトリックス Ca^{2+} により脱水素酵素が活性化され、NADH が増加する。オフセット時の一過性 NADH 増加は、脱水素酵素の脱活性化がゆっくりと進むことに起因すると考えられる。この仮説の妥当性は、ミトコンドリア酸化的リン酸化反応を実装した心筋細胞興奮-収縮連関モデル (Kyoto Model) を用いた解析により支持された。さらに、シミュレーション解析から、ATP 合成の駆動力のうち約 23% が Ca^{2+} による脱水素酵素の活性化により、残り約 77% がフィードバックコントロールに基づくと予測された。

論文審査の結果の要旨

心筋ミトコンドリアにおける ATP 合成の調節メカニズムを定量的に明らかにするため、モルモット単離心室筋細胞のミトコンドリア Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}_{\text{m}}$: Rhod-2 を用いて測定) 又は NADH 自家蛍光を細胞収縮と共に測定し、以下の実験結果を得ている。刺激頻度を 0.1 から 3.3 Hz へ増加すると、 $\text{Ca}^{2+}_{\text{m}}$ は前値の約 200% に増加し ($t_{1/2}$ = 約 12 秒), NADH は約 83% に減少後、155% まで増加 ($t_{1/2}$ = 約 20 秒) した。0.1 Hz に戻すと NADH は一過性の上昇後、回復した。高頻度刺激時の $\text{Ca}^{2+}_{\text{m}}$ と NADH の増加は、ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポータ阻害剤 (Ru360) で抑制された。細胞膜を化学的に穿孔し外液に ADP を与えると NADH は減少した。以上より ADP によるフィードバック調節と Ca^{2+} によるミトコンドリア脱水素酵素活性化の相補的作用により仕事量変化に伴って ATP 合成が調節されると結論された。即ち、高頻度刺激時、ADP 増加が NADH を低下させるが、遅れて増加する $\text{Ca}^{2+}_{\text{m}}$ が脱水素酵素を活性化し NADH が増加する。この仮説の妥当性は、酸化的リン酸化反応を実装した心筋細胞コンピュータモデルを用いた解析により支持され、ATP 合成の駆動力の約 23% が Ca^{2+} の脱水素酵素活性化によると予測された。

以上の研究は、心筋細胞のエネルギー代謝調節メカニズムの解明に貢献し、心臓生理学発展に多いに寄与する。

従って本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 18 年 1 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。