

京都大学	博士（医学）	氏 名	井 口 守 丈
論文題目	Direct monitoring of mitochondrial calcium levels in cultured cardiac myocytes using a novel fluorescent indicator protein, GCaMP2-mt (新たな蛍光蛋白である GCaMP2-mt による、培養心筋細胞でのミトコンドリアカルシウムの直接測定)		
(論文内容の要旨)			
心筋の虚血再灌流傷害の過程で、ミトコンドリア透過性遷移孔が開くことでミトコンドリア膜電位が消失し、心筋細胞死を引き起こすことが知られている。ミトコンドリアカルシウムはミトコンドリア透過性遷移孔の重要な調節因子であると考えられているが、ミトコンドリアカルシウムレベルを直接測定することは、これまでに報告されているカルシウム蛍光プローブではミトコンドリア選択性の問題や、蛍光強度の問題があり困難であった。本研究では新たに開発されたカルシウム蛍光蛋白である GCaMP2 をもとに、ミトコンドリア特異的に発現する GCaMP2-mt を作製し、酸化ストレス刺激下での心筋細胞におけるミトコンドリアカルシウム動態とミトコンドリア透過性遷移孔の開閉や心筋細胞死との関係を検討した。GCaMP2-mt は、GCaMP2 に Cytochrome c oxidase の subunit VIII をリーダー配列として付加し作製した。この遺伝子配列を含む組換えアデノウイルスを感染させることで、HeLa 細胞・新生児ラット心室筋細胞に GCaMP2-mt を発現させた。GCaMP2-mt の発現は、HeLa 細胞・心筋細胞のどちらにおいても、ミトコンドリアの膜電位を蛍光標識する TMRE の発現と一致しており、ミトコンドリアに局在していると考えられた。細胞膜透過性細胞でカルシウム滴定を行ったところ Kd は約 120 ～ 185 nM であった。ヒスタミン刺激に対する GCaMP2-mt の反応も良好で、この反応は脱共役剤で抑制されたため、GCaMP2-mt の反応はミトコンドリアカルシウムの反応によるものであることが確認された。この GCaMP2-mt を用いて、心筋細胞に過酸化水素を投与した際のミトコンドリアカルシウムの変化を検討したところ、ミトコンドリアカルシウムは過酸化水素投与約 20 分はほぼ一定のレベルを保っており（第 1 相）、その後、突如急激な上昇（第 2 相）を示し、それに続いてミトコンドリア膜電位が消失するまで緩やかな上昇を続けた（第 3 相）。細胞質カルシウムを蛍光する Rhod4 と GCaMP2-mt を同時に測定した結果、ミトコンドリアカルシウムの上昇は細胞質カルシウムの上昇と並行しており、ミトコンドリアと細胞質のカルシウムレベルには有意な正の相関が認められた。ミトコンドリアへのカルシウム流入を担うミトコンドリアカルシウムユニポートの阻害薬であるルテニウムレッドは第 3 相の反応は抑制したが、第 2 相の反応は抑制しなかった。一方、ユニポートの活性化剤であるスぺルミンは第 3 相の反応を促進し、第 3 相はユニポート依存性の経路、第 2 相はユニポート非依存性の経路を介している可能性が示唆された。さらに、TMRE との同時測定で、ミトコンドリアカルシウムと膜電位の変化の関係を検討した結果、第 2 相の反応はミトコンドリア膜電位の消失する細胞と消失しない細胞で差が無かったが、第 3 相のミトコンドリアカルシウムの増加が、膜電位の消失する細胞では膜電位の消失しない細胞より有意に高く、両者の間にはカットオフが認められた。このことから、ミトコンドリア膜電位の消失・透過性遷移孔の開閉にはミトコンドリアカルシウムユニポート依存性である第 3 相の反応が重要であると考えられた。以上の結果より、新たに開発した GCaMP2-mt はミトコンドリアカルシウムの測定に有用であり、これを用いることで心筋細胞死のより詳細な病態解明につながると考えられた。			

(論文審査の結果の要旨)			
ミトコンドリアカルシウムはミトコンドリア透過性遷移孔の重要な調節因子であると考えられているが、ミトコンドリアカルシウムレベルを直接測定することは、これまでに報告されているカルシウム蛍光プローブでは困難であった。本研究ではミトコンドリア特異的に発現するカルシウム蛍光蛋白である GCaMP2-mt を作製し、酸化ストレス刺激下での心筋細胞におけるミトコンドリアカルシウム動態とミトコンドリア透過性遷移孔の開閉や心筋細胞死との関係を検討した。 GCaMP2-mt の発現は、ミトコンドリアに局在しているのを確認した。心筋細胞に過酸化水素を投与した際、ミトコンドリアカルシウムは 20 分程一定の値を保った後（第1相）、急激な上昇を示し（第2相）、その後、ミトコンドリア膜電位が消失するまで緩やかに上昇した（第3相）。ミトコンドリアカルシウムの変化は細胞質カルシウムの変化と並行していた。ミトコンドリア膜電位の消失とミトコンドリアカルシウムの変化の関係を検討した結果、膜電位の消失する細胞では第3相のミトコンドリアカルシウムの増加が有意に高く、ミトコンドリア膜電位の消失・透過性遷移孔の開閉には第3相の反応が重要であると考えられた。 以上の結果より、新たに開発した GCaMP2-mt はミトコンドリアカルシウムの測定に有用であり、これを用いることで心筋細胞死のより詳細な病態解明につながると考えられた。			
以上の研究はミトコンドリアカルシウム動態の解明に貢献し心筋細胞死の病態解明に寄与するところが多い。 したがって、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23年4月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			