

Title	単離心筋細胞における細胞内calpain活性とのCa濃度の同時測定
Author(s)	佐伯, 英次郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40742
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	佐伯英次郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13734号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	単離心筋細胞における細胞内 calpain 活性と Ca 濃度の同時測定
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 堀 正二 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

虚血再灌流時の細胞内 Ca 過負荷が再灌流障害に重要な役割を担っていることが知られており、この過程に calpain が関与している可能性が示されている。

しかし、in vitro の実験では μ -calpain の活性化に必要な Ca 濃度は数 μ M 以上と細胞内 Ca 濃度として極めて高いこと、calpain の阻害蛋白である calpastatin が心筋では十分量存在し calpain 活性を抑制していると考えられることなど、calpain の病態への関与に否定的な考えもある。そこで、心筋細胞において細胞内 Ca 濃度上昇に伴って calpain が活性化されるか検討するために、Ca 濃度と calpain 活性を in vivo にて同時に測定する系を開発し、細胞内での Ca 変動に伴う calpain 活性動態を調べた。

【方法】

calpain 活性は、t-butoxycarbonyl-Leu-Met-7-amino-4-chlorimethyl-coumarin (Boc-Leu-Met CMAC) を用いて計測した。Boc-Leu-Met-CMAC は、細胞膜を透過後 thiol 化により細胞内に留まり、calpain 特異的に Met と CMAC の結合が切断されて MAC となると強い蛍光を発する。細胞内 Ca 濃度は MAC と蛍光特性が異なる fura red を用いて計測した。成熟モルモットの心臓から心室筋細胞を単離し、fura red は AM 体 (10 μ M) を用いて導入し、Boc-Leu-Met CMAC (10nM) は直接負荷後、蛍光が安定するまで約30分間灌流した。細胞内 Ca 過負荷は、Tylode 液中の Na を choline で置換した液 (Na free 液) により灌流して誘発させた。

360nm (fura red 用) と 430nm (Boc-Leu-Met-CMAC 用) の 2 種の単波長光を 2 秒ごとに各々 1 秒間細胞に照射し、発生した蛍光を集光後、510nm の dichroic reflector で 2 つに分離した。透過光は fura red の蛍光測定領域である 520-560nm でフィルター後 photomultiplier A (PM-A) で計測し、反射光は MAC の蛍光測定領域である 465-495 nm でフィルター後 photomultiplier B (PM-B) で計測した。

【成績】

fura red のみ負荷した細胞において、灌流液を Na free 液に置換したところ、430nm 励起に対する PM-A の計測値 (I430) は、液置換後 1350 \pm 1446 秒 (N=3) から上昇を開始し、さらに 1403 \pm 1247 秒後、対照時の 139 \pm 23% にま

で増加した。一方、360nm 励起に対する PM-B での計測値 (I360) は、I430が最大となった時点でも対照時の104.6 ± 5.9%に留まっていた。一方、Boc-Leu-Met CMAC のみを負荷した細胞では、I360の値は液置換後947 ± 238秒 (n=3) から上昇を開始し、さらに592 ± 118秒後ピークとなった。この時のピーク値は対照時の111.5 ± 5.8%であった。一方 I430は I360最大時において対照時の99.9 ± 0.4%であった。以上の蛍光色素の単独導入の結果より、I430と I360の時間的变化は互いに他へ干渉しておらず、細胞内 Ca 濃度と calpain 活性が独立して測定できることが明らかとなった。

次に、calpain の活性化が細胞内 Ca 濃度の増加と一致しているかを調べるために、fura red と Boc-Leu-Met-CMAC の両者を負荷した心筋細胞で同様の実験を行った。Na free 液に置換後、まず I430の増加が認められ、引き続き I360の増加が認められた。そこで、I430が上昇を開始した時点をもとに両者の関係を検討したところ、液置換後772 ± 540秒 (n=5) でまず細胞内 Ca 濃度を示す I430が上昇を開始し、その160 ± 45秒後に calpain 活性の指標である I360が上昇を開始した。I360上昇開始時点での I430の増加は137 ± 32%であった。I430は最大179 ± 56%まで増加し、I360の最大値は138 ± 26%であった。以上の結果より、calpain は Ca 過負荷の極めて早い時期から活性化され、細胞内 Ca 濃度の増加とともにその活性も増加することが示唆された。また、細胞の形態は、calpain 活性が上昇開始した時点では rod shape であったが、その後 squair shape となり、最大値を示した時点では round shape となっていた。

【総括】

calpain 活性指示薬と細胞内 Ca 濃度指示薬を同時に単離心筋細胞に導入し、calpain 活性化に必要な Ca 濃度を in vivo で測定した。その結果、心筋細胞においては calpain は比較的低い Ca 濃度で活性化されることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

stunned myocardium における収縮不全の発生に細胞内 Ca オーバーロードが重要な役割を担っていることが知られており、その過程に calpain が関与する可能性が示されてきた。しかし、in vitro で知られる calpain の活性化に必要な Ca 濃度は、細胞内のそれに比しはるかに高く、また、心筋には、calpain の内因性阻害蛋白である calpastatin が十分量存在し、calpain の活性が完全に抑制されている可能性がある。そこで、本研究では、単離心筋細胞を用いて、細胞内 Ca 濃度と calpain 活性を同時に計測する系を開発し、心筋細胞内で calpain 活性化に必要な Ca 濃度を計測した。calpain 活性は、Boc-Leu-Met-CMAC により、Ca 濃度は、fura red により計測し、これらを同時に心筋細胞内に導入し、その励起蛍光を分離して計測した。細胞外を Na free 液で灌流し、細胞内 Ca オーバーロードを誘発したところ、Ca が増加開始して160秒遅れて Calpain が活性化された。calpain 活性化時の Ca 濃度を推定したところ、約300nM であった。本研究は、初めて細胞内において Ca 濃度と calpain 活性を同時に計測する系を開発し、細胞内での calpain の活性化に必要な Ca 濃度を明らかにした点で重要な意義があり、心筋細胞内では、in vitro の結果と異なり、はるかに低い Ca 濃度で calpain は活性化され、短時間の虚血再灌流時の Ca オーバーロードにより calpain が活性化され得ることを示した点で興味深い。以上より、本研究は、博士 (医学) の学位授与に値すると思われる。