

糖尿病が心筋筋小胞体Ca²⁺-ATPaseと筋原線維タンパク質の機能 および酸化修飾に及ぼす影響

倉谷麻衣

広島大学大学院総合科学研究科

Effects of diabetes on function and oxidative modification of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myofibrillar proteins

Mai KURATANI

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

I 章 緒言

糖尿病は、血中グルコース濃度が高い状態が持続し、そのために体に生ずる様々な異常の総称である。糖尿病の合併症の一つである糖尿病性心筋症は、心不全のリスクを高める一要因であると考えられており、その症状によって、初期、中期および後期の3つの段階に分けられる。初期段階では、心臓の弛緩機能に変化がみられることがあるが、血液駆出機能は正常である。中期段階では、弛緩機能に明らかな異常がみられ、血液駆出機能については僅かな減少が観察されることがある。後期段階では、弛緩機能と血液駆出機能のどちらにおいても、明らかな異常がみられる。

心筋細胞において、筋原線維ATPase (myofibrillar ATPase: my-ATPase) 活性は最大収縮速度の、筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum: SR) Ca²⁺-ATPase活性は弛緩速度の規定因子である。糖尿病に罹患することによってこれらの酵素の機能が低下することが、心筋細胞の収縮・弛緩機能に異常をもたらす大きな要因であると考えられている。糖尿病を罹患した個体の心筋では、活性酸素種 (reactive

oxygen species: ROS) の産生が増大することが認められている。my-ATPaseおよびSR Ca²⁺-ATPaseは、酸化に対して感受性が高いタンパク質であり、糖尿病に伴って発生するROSによって、これらの構造が酸化修飾を受けることが、この2つの酵素の活性低下の素因となることが推察される。

高血糖状態が継続しても、その期間が短ければ、血中グルコース濃度を低下させる処置を施すことによって、心臓の機能の低下を遅らせることができるが、長期間継続すると、低下した機能を完全に回復させるのは難しいことが認められている。したがって、糖尿病に起因するSR Ca²⁺-ATPase活性やmy-ATPase活性低下の原因が、糖尿病性心筋症の罹患期間によって異なることが推察される。これらの知見から本研究では、糖尿病性心筋症の異なる段階に焦点を当て、my-ATPaseおよびSR Ca²⁺-ATPaseが酸化修飾を受けることが、これらの酵素の機能低下に寄与するか否かを検討することを目的とし、以下に示す3つの実験を行った。実験1では、糖尿病が心筋の収縮・弛緩機能および筋全体における酸化・還元状態に及ぼす影響を、実験2では、糖尿病が筋原線維の機能および酸化・

還元状態に及ぼす影響を、実験3では、糖尿病がSR Ca^{2+} -ATPaseの機能および酸化・還元状態に及ぼす影響を検討した。

II章 文献研究

先行研究から得られた知見を、1) 糖尿病、2) 心筋の機能と構造、および3) 糖尿病による心筋の変化に分類し、総説した。

III章 糖尿病が心筋の収縮・弛緩機能および酸化・還元状態に及ぼす影響 (実験1)

実験1では、糖尿病が心筋全体の酸化・還元状態に及ぼす影響を検討することを目的とした。Wistar系ラットにstreptozotocin (STZ) を投与し、1型糖尿病を誘発した。投与2週間後および6週間後に、左心室を摘出し、実験に用いた。乳頭筋の張力立ち上がり速度には、STZ投与から6週目で低下が、張力減少速度には、2週目以降で低下が認められた。過酸化脂質量には、STZ投与から2週目以降で増加が観察され、糖尿病の進行とともにさらに増加することが認められた。カルボニル量には、変化は認められなかった。また、還元型グルタチオン量には、STZ投与後6週目で増加が観察された。以上のことより、糖尿病の経過とともに、心筋細胞全体では、脂質の過酸化が徐々に進行すること、および抗酸化機能の亢進が誘起されることが示唆された。また、タンパク質に対しては、著しい酸化的修飾は生じないものと考えられる。

IV章 糖尿病が心筋筋原線維の機能および酸化・還元状態に及ぼす影響 (実験2)

実験2では、糖尿病が筋原線維タンパク質の機能および酸化・還元状態に及ぼす影響について検討することを目的とした。Wistar系ラットにSTZを投与し、1型糖尿病を誘発した。投与2週間後および6週間後に、左心室を摘出し、実験に用い

た。my-ATPase活性には、STZ投与後2週目以降で低下が観察された。反応液中にdithiothreitol (DTT) を添加したことによって、酵素活性に変化は認められなかった。ミオシン重鎖 (myosin heavy chain: MHC) およびアクチンタンパク量には、6週目で減少が観察された。筋原線維全体に含まれるカルボニル量には、STZ投与から6週目で低下が認められた。MHCに含まれるカルボニル量には、2週目以降で低下が観察された。一方、筋原線維全体に含まれるニトロチロシン量には変化がみられなかった。V₃型アイソミオシンの割合は、STZ投与後2週目以降で増加が観察され、糖尿病の進行とともにさらに増大することが認められた。以上のことから、糖尿病性心筋症の初期～中期段階では、アイソミオシンの分布がV₁優位からV₃優位に変化することが、また後期段階では、それに加え、MHCおよびアクチンの量が減少することが、糖尿病性心筋症にみられるmy-ATPase活性の低下の素因であることが示された。また、筋原線維タンパク質が酸化あるいは窒素化を受けることが、my-ATPase活性低下の原因ではないことが明らかとなった。

V章 糖尿病が心筋筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseの機能および酸化・還元状態に及ぼす影響 (実験3)

実験3では、糖尿病が心筋SR Ca^{2+} -ATPaseの機能および酸化・還元状態に及ぼす影響について検討することを目的とした。Wistar系ラットにSTZを投与し、1型糖尿病を誘発した。投与2週間後および6週間後に、左心室を摘出し、実験に用いた。SR Ca^{2+} -ATPase活性には、STZ投与後2週目以降で低下が、また2週目では、DTTの添加によって酵素活性が増大することが認められた。ミクロソーム内全体に含まれるカルボニル量には、STZ投与後2週目以降で増大が観察された。SR Ca^{2+} -ATPaseに含まれるニトロチロシン量には、6週目で増加が観察された。以上のことから、糖尿病心筋におけるSR Ca^{2+} -ATPaseの機能低下は、糖尿病性心筋症の初期～中期段階では、sulfhydryl (SH) 基がdisulfide (S-S) 結合を形成することが、それに対し

後期段階では、ペルオキシナイトライトによって修飾を受けることが原因となることが示唆された。

VI章 討論

実験1では、糖尿病が全筋の酸化・還元状態に及ぼす影響を検討し、脂質の過酸化は進行するが、タンパク質の酸化は検出されないことが示された。実験2および3では、局所的なタンパク質の酸化・還元状態について検討したところ、カルボニル量はミクロソームでは増大するのに対し、筋原線維では逆に減少することが認められた。筋原線維は、細胞内に豊富に存在するタンパク質であり、心筋細胞全体の45~60%を占める。このことから、筋原線維以外の多くのタンパク質では酸化が亢進したが、筋原線維タンパク質では還元が生じたため、全筋としては相殺されたことが推察される。

my-ATPaseおよびSR Ca²⁺-ATPaseには、酸化に対して感受性が高いSH基が存在し、これらが酸化されてS-S結合が形成されると、両酵素の活性が低下することが、*in vitro*の実験において報告されている。実験1では、糖尿病誘発から2週間目で、脂質の過酸化が亢進することが観察され、この知見からは、この時期既に、筋細胞内の小器官は酸化ストレスに曝されていることが示唆される。そこで、実験2ではmy-ATPaseについて、実験3ではSR Ca²⁺-ATPaseについて、「糖尿病心筋において、両酵素の機能が低下するのは、酵素タンパク質が

酸化修飾を受けるためである」という仮説を検討した。その結果、糖尿病誘発から2週間後における活性の低下は、my-ATPase活性では、酸化修飾を受けることが成因ではないこと、それに対して、SR Ca²⁺-ATPaseでは、S-S結合が形成されるためであることが明らかとなった。糖尿病によるSR Ca²⁺-ATPase活性の低下に、SH基が関与していることを認めたのは、本研究が最初である。

2週間目とは異なり糖尿病誘発から6週間目では、糖尿病によって低下したSR Ca²⁺-ATPase活性はDTTによって増加しなかった。また、酵素タンパク質に量的な減少もみられず、この時期に観察された変化は、酵素に含まれるニトロチロシン量の増加であった。SR Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺輸送ドメインに隣接するチロシンが窒素化されると、酵素活性が低下することが報告されていることから、6週目にみられたSR Ca²⁺-ATPase活性の低下には、窒素化が関与していることが示唆される。my-ATPaseについては、糖尿病誘発から2週間目では、アイソミオシン間の量的変化以外には、活性の低下を招来すると考えられる要因に変化はみられず、アイソミオシンの組成の変化が活性低下の主要因である可能性が高い。しかしながら、6週間目では、MHCとアクチンの両方に量的な低下が観察され、アイソミオシンの分布の変化に加え、この現象が活性低下の原因の1つであると考えられる。