

論 文 要 旨

論 文 題 目

ペルオキシナイトライト誘導性ミトコンドリア膜透過性遷移孔における膜結合性グルタチオン
トランスフェラーゼの役割：ジスルフィド結合を介した蛋白複合体の形成

氏 名 今泉 直樹

要 旨

我々は以前にミトコンドリア膜結合性グルタチオントランスフェラーゼ(mtMGST1)がチオール基の修飾を介して活性化され、ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)孔に寄与している事を示した。本研究では酸化剤であるペルオキシナイトライト(PON)が誘導する MPT 孔の開口における mtMGST1 の役割を明らかにすることを目的とした。PON はミトコンドリアと同様にマイトプラスト (マトリックスを含むミトコンドリア内膜) の膨化を誘導した。この膨化は adenine nucleotide translocator (ANT)の ligand である ADP で強く抑制され、シクロスポリン A や GST 阻害剤の tannic acid や S-hexylglutathione によって部分的に抑制され、ジスルフィド結合還元剤であるジチオスレイトール(DTT)により阻止された。PON によるマイトプラストの膨化後、蛋白のウェスタンブロット解析を行うと mtMGST1 (モノマー), ANT (48 kDa), および cyclophilin D (CypD, 30 kDa)を含む高分子蛋白(HMP)が明確に同定された。この HMP の形成の程度は膨化の抑制に伴って減少し、DTT を作用させた後では検出されなかった。この PON によるマイトプラストの HMP 形成や膨化はカルシウムキレート剤や抗酸化物によっても抑制された。これらの結果は HMP が mtMGST1, ANT, CypD を含むジスルフィド結合性蛋白複合体であり、PON 誘導による膨化において MPT 孔として機能することを示唆している。また、このとき PON によって放出されるカルシウムは HMP 形成に重要な役割を行担していると思われる。

Abstract

Title

The role of a membrane-bound glutathione transferase in the peroxynitrite-induced mitochondrial permeability transition pore: Formation of a disulfide-linked protein complex

Name Naoki Imaizumi

Abstract

We have previously shown that the mitochondrial membrane-bound glutathione transferase (mtMGST1) is activated via thiol modifications and contributes to the mitochondrial permeability transition (MPT) pore. In the present study we aimed to confirm the role of mtMGST1 in the oxidant peroxynitrite (PON)-induced MPT pore opening. PON induced the swelling of mitoplasts (inner membranes including the matrix) as well as of the mitochondria. The swelling was markedly suppressed by ADP [an adenine nucleotide translocator (ANT) ligand] and partially suppressed by cyclosporin A or by GST inhibitors (tannic acid, S-hexylglutathione). Dithiothreitol (DTT), a disulfide bond-reducing reagent, prevented the swelling. Western blot analyses of mitoplast proteins after PON-induced swelling positively identified the high molecular weight protein (HMP) including mtMGST1 (monomer), ANT (48 kDa), and cyclophilin D (CypD, 30 kDa). The HMP level was decreased according to suppression of the swelling and undetectable after DTT treatment. The HMP formation and swelling were also suppressed by a Ca^{2+} chelating agent and antioxidants. These results suggest that the HMP is a disulfide-linked protein complex involving mtMGST1, ANT, CypD and function as a MPT pore in PON-induced swelling, in which the Ca^{2+} released by PON might play an important role in the complex formation.

(様式第5-3号)

平成 24 年 5 月 16 日

琉球大学大学院

保健学研究科後期課程委員会 殿

論文審査委員

主査 氏 名 田中 康春

副査 氏 名 金城 貴夫

副査 氏 名 栗田 久多佳



学位（博士）論文審査及び学力確認の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び学力確認を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	氏名 今泉 直樹	生年月日	
現住所			
成績評価	学位論文 (合格) 不合格	学力確認 (合格) 不合格	
論文題目	ペルオキシナイトライト誘導性ミトコンドリア膜透過性遷移孔における膜結合性グルタチオントランスフェラーゼの役割：ジスルフィド結合を介した蛋白複合体の形成		
審査要旨（2,000字以内）			
去る5月11日、今泉直樹氏から提出された学位申請の論文について公聴会という形で審査会を開催した。尚、本審査会には、約20名の教員等が出席し、質疑に加わった。			
1) 審査結果：審議の結果、本審査会委員全員の総意として、今泉氏は保健学博士としての研究能力を有するとともに、提出された論文は本研究科保健学博士号を授与するに値する論文であるという結論を得た。（提出された論文は、Biochem. & Mol. Biol.ならびにBiophys.両分野においてともにQ2のカテゴリーに位置する学術雑誌、Arch. Biochem. Biophys. (I.F. 3.022)に掲載された）			
2) 本研究の背景と目的：肝臓は、多様な薬物を代謝して無毒化する重要な臓器である。そのための解毒代謝経路として、第一相の酸化反応経路に加え、第二相では複数の抱合反応経路が存在する。			

グルタチオントランスフェラーゼ (GST)は、第一相で代謝された親電子性化合物のグルタチオン抱合反応を担う第二相の代謝酵素である。GST は数十種類のアイソザイムが見つかっており、薬物の代謝は主に細胞質の GST 群が関与するとされているが、一方で小胞体やミトコンドリア (Mt) 膜結合性の GST 群の機能については未だ不明な点が多い。今泉氏を研究指導した安仁屋前教授は、Mt 膜結合性 GST (mtMGST1)について、酸化ストレスに応答した Mt からのシトクロム C の遊離に mtMGST1 の活性化が関係すること、また mtMGST1 が酸化ストレス依存的なミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT)に関与することを以前報告しているが、MPT 孔 (pore)の形成に関与する他の因子との関連や、Mt 外膜、内膜いずれに分布する mtMGST1 が pore 形成に関与するのかといった点については解明されていなかった。本研究は、これらの点を明らかにすることを目的としたものである。

3) 本研究成果の意義と展開性：本論文は、ラット肝臓より単離したミトコンドリア (Mt)、さらに単離 Mt から調製したマイトプラスト (外膜を取り除いたミトコンドリア構造体) を用い、酸化ストレスに応答して、内膜 mtMGST1 が MPT pore の調節因子である アデニンヌクレオチドトランスロケーター (ANT)ならびにサイクロフィリン D (CypD) とジスルフィド結合を介して構築される高分子タンパク (HMP)複合体 が MPT pore 本体となることを明らかにした点に、本研究の意義がある。現在に至るも、MPT pore の形成に関与する因子群については結論が出ていない中で、酸化ストレス依存的な MPT pore 形成が HMP 複合体形成と密接に関連すること、ならびに HMP 複合体形成の阻害が MPT pore 形成の阻害に結びつくことを、GST 阻害剤および MPT 阻害剤を用いて証明し、Mt からの Ca イオンの放出や活性酸素産生との関連性も見いだした。さらに、HMP 複合体に、ANT, CypD とともに内膜 MGST1 が含まれていることを免疫化学的に証明したことは、特に評価しうる点である。

過剰な薬物投与は、酸化ストレス誘導性肝細胞死を誘導することが知られている。本研究は、過剰薬物摂取等による肝障害の発生機構を解明する上で、酸化ストレスをキーワードとして重要な知見を与えるものである。又、脳や心臓における虚血再灌流性障害では、酸化ストレスの発現にともなう神経細胞や心筋細胞死の増加による梗塞部位の拡大が問題となっている。最近の研究では、この虚血再灌流性障害においても、酸化ストレスによる MPT pore の開口と Ca イオンの放出が細胞死に関係するとされている。従って、本研究で得られた知見が、他の MPT pore 形成をともなう細胞障害にも適用されるとするならば、本研究成果の意義はさらに大きなものになると期待され、mtGST1 が治療標的の一つになりうる可能性も示唆している。

以上の結果から、今泉直樹氏から学位申請された本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。