

# Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)開閉観察系の構築

金澤 温子、行方 衣由紀、田中 光  
東邦大・薬・薬物

## 研究背景

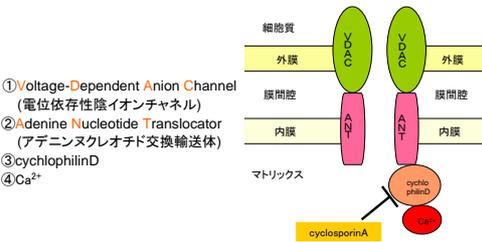
心臓は日々休むことなく動き続ける臓器である為、エネルギー需要は高く、効率的なATP産生を行うミトコンドリアは重要な役割を担っている。よって、心筋虚血・再灌流障害などにおけるミトコンドリアの機能保護は心機能保護に繋がると考えられている。

ミトコンドリア膜にはmitochondrial permeability transition pore(mPTP)が存在し、虚血・再灌流障害に関与すると報告されているが、詳細は明らかではない。

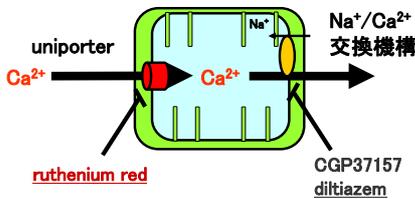
## 目的

蛍光プローブを用いた画像解析法によりmPTP開閉観察系を構築する。

## mitochondrial permeability transition pore(mPTP)の構成要素



## ミトコンドリアCa<sup>2+</sup> 動態



## 実験方法

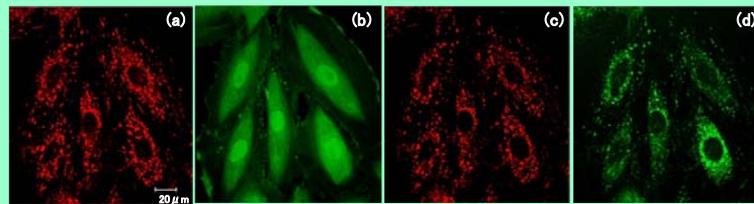
- ①ラット心室筋細胞株(H9c2)にcalcein-AM 0.5 μMを37°C避光下で15分間ロードした
- ②5分間ジギトニン(20mg/ml)処置を行い膜透過性細胞とした
- ③細胞内液(Ca<sup>2+</sup>-free)にCa<sup>2+</sup>300nMを負荷し、それぞれの薬剤によるcalcein蛍光変化の経時変化を解析した

\* 流出したcalceinを消光させる為、細胞内液にCo<sup>2+</sup>を加えた  
\* 蛍光画像の取得・経時変化解析にはAquacosmosを用いた

細胞内液(単位/mM) 灌流速度 5~10ml/min  
KCl 50 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3  
Potassium aspartate 80 Glucose 5.8  
sodium pyruvate 4 EGTA 3  
HEPES 20 (pH7.3 with KOH)

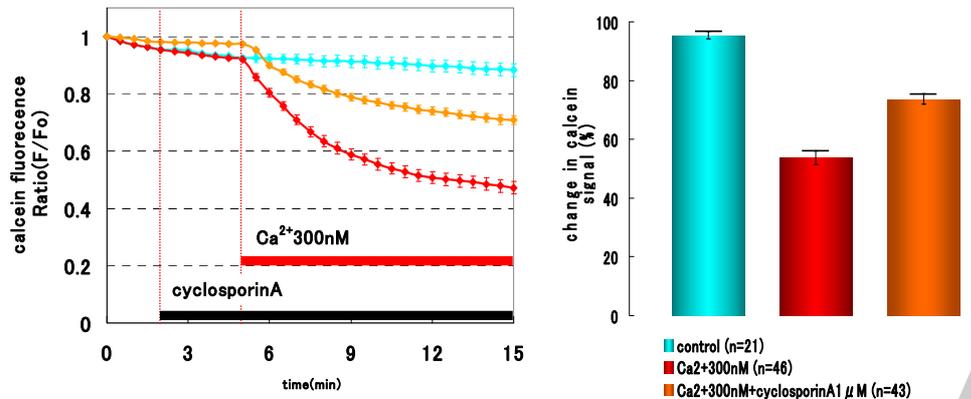
## 結論

- calceinを用いたmPTP開閉観察系を確立した。(結果①、②)
- ミトコンドリア内Ca<sup>2+</sup>負荷が増大する程、mPTPが開口しやすくなることが明らかになった。(結果③、④)



## 結果 I mPTP開閉観察系の構築

- ①Ca<sup>2+</sup>負荷によりcalcein蛍光強度が46±2.3%減少した。
- ②cyclosporinA (mPTP開口阻害剤)によりcalcein蛍光減少が23±1.7%に抑制された。



## 結果 II mPTP開閉とミトコンドリアCa<sup>2+</sup> 動態の関係

- ③ruthenium red (Ca<sup>2+</sup>uniporter阻害剤)により、ミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>流入が抑制され、ミトコンドリア内Ca<sup>2+</sup>濃度が低下する\*<sup>1</sup>。その結果、calcein蛍光減少が26±2.6%に抑制された。
- ④diltiazem(ミトコンドリアNCX阻害剤)により、ミトコンドリアからのCa<sup>2+</sup>排出が抑制され、ミトコンドリア内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する\*<sup>2</sup>。その結果、calcein蛍光減少が61±4.9%に促進された。

