



Title	心筋症ハムスターにおけるミトコンドリア creatine kinase 活性の異常について
Author(s)	松尾, 尚志
Citation	北海道大学. 博士(医学) 乙第3885号
Issue Date	1991-03-25
DOI	10.11501/3052856
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51147
Type	theses (doctoral)
File Information	000000237995.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

心筋症ハムスターにおけるミトコンドリア
creatine kinase活性の異常について

北海道大学医学部循環器内科

松尾尚志

①

心筋症ハムスターにおけるミトコンドリア
creatine kinase活性の異常について

北海道大学医学部循環器内科

松尾尚志

Abnormalities in Mitochondrial
Creatine Kinase activity in
Cardiomyopathic Hamsters

Hisashi Matsuo

Department of Cardiovascular Medicine,
Hokkaido University, School of Medicine,
Sapporo 060, Japan.

I、 緒 言

心筋症の心機能障害をエネルギー代謝の面から解明するための様々な研究がなされている。^{1)~5)} これらの研究には遺伝的心筋症モデルである Syrian ハムスターが用いられ、細胞内高エネルギー磷酸レベルの低下、^{1),2)} ミトコンドリア内に脂肪酸をとりこむ carnitine 輸送系の異常^{3)~5)}が明かとなった。また、ヒト心筋症では、ATPを産生する電子伝達系の異常が報告されている。^{6),7)} これらはいずれもエネルギー産生系の異常を示唆している。

近年、Khuchuaらは、心筋症ハムスターである CHF14.6 (BI014.6から派生した系)で心筋の creatine kinase 系に変化がおり、ミトコンドリア CKが減少すると報告している。⁸⁾

creatine kinase系は細胞内で高エネルギー磷酸の運搬に関与している。すなわちミトコンドリアで産生された ATPは、ATP-ADP translocaseによりミトコンドリアの膜間腔(内膜と外膜の間の腔)に運ばれる。ここでミトコ

ンドリア内膜の外側面に位置するミトコンドリアCKにより creatine 磷酸に変えられ、この形でエネルギー消費系である細胞質内へ運搬される。細胞質内に運搬された creatine 磷酸は筋原線維のM帯に位置する cytoplasmic CK (CK-MM) により再度 ATP に変えられ、筋の収縮に用いられる。⁹⁾¹⁰⁾ ミトコンドリアCKはこの creatine 磷酸回路の中で重要な位置を占めていると考えられる。したがってミトコンドリアCKの異常は、エネルギー産生系からエネルギー消費系へのATP輸送障害をひきおこし、細胞質内でATPの減少をもたらすと考えられる。また、細胞質内でのATP減少は、心機能の障害につながる事が推測される。

このため、ミトコンドリアCKを検討することは心筋症のエネルギー代謝異常を把握するうえで重要と考えられる。しかし、心筋症ハムスターでミトコンドリアCKの異常を週齢をおって検討した報告はない。

本研究の目的は心筋症のモデル動物である

心筋症ハムスター (BI014.6とBI053.58) の心室筋でミトコンドリアCK、cytoplasmic CKのアイソザイムパターン分析および活性を測定し、心筋症における心機能障害との関連性を検討することである。

II、対象および方法

1、対象

肥大型心筋症ハムスターとしてBI014.6を、拡張型心筋症ハムスターとしてBI053.58を用いた。BI014.6は筋ジストロフィーハムスターのBI01.50から兄妹交配により継代分離された肥大型心筋症ハムスターである。心室壁、心室中隔の肥厚を特徴とするが、第22~28週齢以後には次第に心拡大をおこして行く。^{11)~14)} BI053.58は、BI014.6から突然変異により生まれた系で、心肥大をおこすことなく、心室壁の菲薄化と心内腔の拡張を特徴としている。^{15),16)}

BI014.6は第5週齢、第20週齢、第50週齢、第62週齢を用いた。BI053.58は第5週齢、第20週齢を用いた。正常コントロールとして、同

一週齢のF1 β ハムスター（BI014.6と近交系の正常ゴールデンハムスター）を用いた。¹⁵⁾これらのハムスターは日本チャールズリバー社より入手した。

2、ミトコンドリア分画の分離とCKの抽出

Pentobarbital 0.2g/kg \cdot BWを腹腔内に投与し、ハムスターを麻酔後、心臓を摘出した。冷生理食塩水で血液を洗浄後、細片にし、心室筋130-140mgからミトコンドリア分画を分離した。損傷の少ないミトコンドリア分画を得るため、0.3M sucrose, 10mM Na-HEPES (pH7.2) 0.2mM EDTA, 0.1%BSA (100mg/ml) を用いてホモジナイズした後、600xg (4 $^{\circ}$ C) で10分間遠心、上清を8,000xg (4 $^{\circ}$ C) 15分間遠心し沈渣を得た。次に沈渣を同上の緩衝液に再度懸濁させ8,000xg (4 $^{\circ}$ C) 15分間遠心し2回洗浄して、得られた沈渣をミトコンドリア分画として用いた。¹⁷⁾ ミトコンドリア分画の収量はF1 β 、BI014.6、BI053.58で差はなかった。

得られたミトコンドリア分画を0.1M 燐酸カ

リウム (pH8.0)、0.5mM dithiothreitolに懸濁させ、4°Cで1時間放置しミトコンドリアCKを抽出した。その後15,000xg (4°C) 15分間遠心し、その上清をミトコンドリア分画CK活性の測定に用いた。⁸⁾

3、心室筋からのCK抽出

心室筋からのCKの抽出はHallらの方法に準じて行った。¹⁸⁾ 心室筋を細片にし、50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) 1mM EDTA, 1mM β -mercapt oethanol (100mg/2ml) 中でガラスホモジナイザー (Yazawa7740、岩城ガラス社製) を用いてホモジナイズした。まずホモジネイトを600xg (4°C) で10分間遠心後、その上清を0°Cで30分間放置した。その後20,000xg (4°C) で30分間遠心し、得られた上清を心室筋CK活性の測定、電気泳動の試料として用いた。

4、CK活性の測定

CK活性はRosalkiらの方法に準じ、モノテストCK-NAC (ベーリンガー・マンハイム社) を用い、NADPH法で測定した。¹⁹⁾ (37°C)

5. 電気泳動とCKアイソザイムの分離

電気泳動はセルロースアセテート膜 (Sepraphore III, Gelman社) を用い、250V定圧で60分間、氷冷下でおこなった。泳動緩衝液は60mM Tris-barbital (pH8.8) 50 μ M dithiothreitol, 0.1%BSAを用いた。¹⁸⁾

電気泳動後、セルロースアセテート膜を50mM Imidazole-HCl (pH7.0) 1mM MgCl \cdot 6H $_2$ O, 100 μ M ADP, 30mM creatine phosphate, 15mM AMP, 0.02%BSA液に2分間浸し、その後37°Cで10分間インキュベートした。次に、Luciferin-Luciferaseをセルロースアセテート膜に塗布しATPを発光させ、発光パターンをArgus100 (浜松フोटニックス社製) を用いて観察した。

6. ミトコンドリアCKの精製

ミトコンドリアCKはSaksらの方法に準じて、rat心室筋から部分精製した。^{17),20)} rat心室筋 (7g) から前述した方法で得たミトコンドリア分画を、蒸留水を加えホモジナイズ後、40,000xgで60分間遠心し、沈渣から0.1MNa $_2$ HPO $_4$ (pH8

.0) 3mM β -mercaptoethanolでミトコンドリアCKを抽出した。40,000xgで60分間遠心後、上清を ammonium sulfateで分画した。30-40%塩濃度での沈渣を5mM Tris-succinate (pH8.0) 1mM EDTA, 1mM β -mercaptoethanolに懸濁し、5mM Tris-succinate (pH8.0) 1mM EDTA, 3mM β -mercaptoethanol緩衝液で透析した。さらに DEAE-Sephacelカラムを用い、NaCl 0-0.2Mのグラジエントシステムにて溶出し、得られた試料をミトコンドリアCKとして使用した。

Fig 1に DEAE-Sephacelのクロマトパターンを示す。NaCl濃度 0.11~0.12MにピークをもつCK活性が認められた。精製率は11.7倍であった。 (Table 1)

ミトコンドリアCKの電気泳動ではコントロールCK-MM (筋型CK) の陰極側に単一ピークのCK活性が認められた。このピークはハムスター心室筋の陰極側のピークと一致した。 (Fig 2)

7. その他

蛋白質量はLowry法を用いて測定した。

ADP, AMP, creatine phosphate, コントロールのCK-MMはSigma社製を用いた。Luciferin-LuciferaseはLKB社のATP Monitoring Reagentを用いた。

統計処理はun-paired t検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

III、結 果

1、臨床像、体重、心重量

BI014.6では第5週齢、第20週齢では症状を認めなかった。第50週齢、第62週齢では全例で浮腫と行動緩慢化を認め心不全症状を認めた。体重はTable 2に示すごとく、全週齢でF1 β より低値であった。心重量は第20週齢ではF1 β と有意差はなかったが、第50週齢から高値を示した。そのため心重量/体重比は全週齢BI014.6が高値であった。肉眼的に心臓は、第20週齢で心室壁の肥厚を認めた。第50週齢、第62週齢では心室壁の肥厚にくわえ、内腔の

拡大を認めた。

BI053.58では両週齢とも浮腫などの症状は認めなかった。体重はTable 2のごとく、両週齢でF1βより低値、心重量は第5週齢で低値、心重量/体重比ではF1βと有意差はなかった。肉眼的に心臓は第20週齢で内腔の拡大と心室壁の菲薄化を認めた。

2. BI014.6のミトコンドリア分画CK活性

F1βから分離したミトコンドリア分画のCK活性は、第5週齢と比較して、第20週齢以後で増加を示した。

BI014.6から分離したミトコンドリア分画のCK活性は、各週齢とも変化を認めなかった。

同一週齢のF1βとBI014.6の比較では、第20週齢でF1βのミトコンドリア分画CK活性は 3.22 ± 0.38 (IU/mg.mit.protein) だったのに対し、BI014.6では 2.54 ± 0.30 であり、BI014.6で有意にミトコンドリア分画CK活性が低下していた。(Fig 3) 第50週齢、第62週齢でも、BI014.6のミトコンドリア分画CK活性は有意に

低下していた。

3、 BI053.58のミトコンドリア分画CK活性

BI053.58から分離したミトコンドリア分画CK活性は第5週齢と第20週齢で差は認めなかった。同一週齢のF1 β との比較では、第20週齢でBI053.58のミトコンドリア分画CK活性は有意に低下していた。(F1 β , 3.22 ± 0.38 : BI053.58, 1.89 ± 0.40) (Fig 4)

4、 BI014.6の心室筋CK活性

BI014.6およびF1 β の心室筋CK活性は、第5週齢、第20週齢と比べ、第50週齢、第62週齢で低下を示した。

同一週齢のF1 β とBI014.6を比較すると、第5週齢では有意な差は認めなかった。しかし、第20週齢では、F1 β で 19.04 ± 1.16 (IU/mg \cdot protein)だったのに対し、BI014.6では 16.04 ± 1.20 で、BI014.6の心室筋CK活性はF1 β に比し有意な低下を示した。第50週齢、第62週齢でも同様の低下を示した。(Fig 5)

5、 BI053.58の心室筋CK活性

BI053.58の心室筋CK活性は、第5週齢と比較し、第20週齢で有意な低下を示した。

同一週齢のF1 β とBI053.58を比較すると、第5週齢では有意な変化は認めなかったが、第20週齢ではF1 β の 19.06 ± 1.16 (IU/mg·protein)に対し、BI053.58では 12.06 ± 0.79 であり、BI053.58の心室筋CK活性はF1 β に比し有意な低下を示した。 (Fig 6)

6、BI014.6の心室筋CKアイソザイムパターン
F1 β ,BI014.6の心室筋CKアイソザイムパターンを Table 3に示す。

F1 β のアイソザイムパターンでは、ミトコンドリアCK活性の比率は第50週齢以後で有意な増加を示した。CK-BB (脳型CK) 活性比,CK-MB (心筋型CK) 活性比は第62週齢で減少を示した。CK-MM (筋型CK) 活性比は第62週齢で増加を示した。

BI014.6ではF1 β に認められた高週齢でのミトコンドリアCK活性比、CK-MM活性比の増加、CK-BB,CK-MB活性比の減少は認められなかった。

同一週齢の F1 β と BI014.6 を比較すると、第5週齢、第20週齢では有意な差を認めなかった。しかし、第50週齢では BI014.6 の CK-BB 活性比は F1 β と比べ高値、ミトコンドリア CK 活性比は低値であった。さらに第62週齢では CK-BB 活性比の高値、ミトコンドリア CK 活性比の低値に加えて、CK-MB 活性比の高値を認めた。

7、BI053.58 の心室 CK アイソザイムパターン
BI053.58 の心室 CK アイソザイムパターンでは、第5週齢と第20週齢の間で変化は認めなかった。

同一週齢の F1 β との比較では、両週齢とも BI053.58 で CK-BB 活性比の著明な増加とミトコンドリア CK 活性比の減少を認めた。その程度は BI014.6 と比して顕著であった。(Table 3)

IV、考 案

今回著者は、心筋症ハムスターの心室筋において、ATP 輸送障害の指標となるミトコンドリア CK 活性および CK アイソザイムパターンを測定し、心筋症における心機能障害のひとつ

の要因として、ミトコンドリアCK異常が関与するかどうかを検討した。

コントロールであるF1 β では、心室筋CK活性は第50週齢以後で低下、ミトコンドリア分画のCK活性は第20週齢以後で増加した。CKアイソザイムパターンは、第5週齢ではミトコンドリアCK活性比は低値、CK-BB活性比は高値であったが、その後高週齢になるとミトコンドリアCK活性比の増加、CK-BB活性比の減少を認めた。これに対し肥大型心筋症モデルであるBI014.6では、心室筋CK活性は同様の低下を認めたものの、ミトコンドリア分画のCK活性ではF1 β のような第20週齢以後の増加は認めなかった。またCKアイソザイムパターンでも週齢による変化は認めず、幼弱な時期のパターンのまま経過した。このためBI014.6では第20週齢からミトコンドリア分画のCK活性、心室筋CK活性がF1 β より低下していた。しかし、cytoplasmic CKのBBアイソザイム活性比の増加はこの時期には認められなかった。第50週

齢ではミトコンドリア分画のCK活性の低下と同時に cytoplasmic CKのBBアイソザイム活性比の増加が認められ、第62週齢でも同様の結果が認められた。つまり、BI014.6では生後早期にはCK系に変化はないが、心肥大の進行とともに、ミトコンドリア分画CK活性の低下がおこり、それに続発して、非代償性心不全をおこす時期には cytoplasmic CKがBBアイソザイムへシフトしてくると考えられた。ミトコンドリア分画CK活性の低下が、細胞質内高エネルギー磷酸レベル低下の一因となり、cytoplasmic CKが creatine 磷酸に対して親和性のより高いBBアイソザイムへシフトする可能性が示唆された。²¹⁾

拡張型心筋症モデルであるBI053.58では第5週齢からCKアイソザイムパターンで、ミトコンドリアCK活性比の減少とCK-BBへのシフトが観察された。また、ミトコンドリア分画のCK活性、心室筋CK活性では、有意差はないものの減少傾向を認め、BI053.58では生後早期か

らCK系に異常がおこり、高エネルギー磷酸輸送が障害されている可能性が示唆された。心拡大を示す第20週齡では、明かなミトコンドリア分画CK活性の減少とCK-BB活性比の増加が認められた。

心筋症ハムスターで、細胞内高エネルギー磷酸レベルが低下しているという報告は多くなされている。Sievers、Wikman-Coffeltらは180-250日のUM-X7.1 (BI014.6から派生した系)で細胞内ATPレベル、creatine phosphateレベルが低下していると報告している。^{1),2)} また、Whitmerらは、BI014.6では6カ月で、BI053.58では3、6カ月で細胞内高エネルギー磷酸レベルが低下していると報告している。³⁾

細胞内で高エネルギー磷酸が低下する原因としては、ミトコンドリアにおけるATP産生の低下、ミトコンドリアからのATP輸送障害が考えられる。

Whitmer、Hoppelらは、脂肪酸をミトコンドリア内にとりこむcarnitine系に異常があり、

この結果、ATP産生が低下し、細胞内高エネルギーリン酸レベルが低下すると推測している。^{3), ~ 5)}
Whitmerらは、心筋症ハムスターにL-carnitineを投与し、細胞内高エネルギーリン酸レベルの低下が抑制されたと報告している。⁴⁾

また、小澤らはヒト拡張型心筋症でミトコンドリアDNAの多重欠損を報告し、これにもとづく電子伝達系の欠損がATP産生低下につながると述べている。^{6), 7)}

これに対して、Khuchuaらは、第28週齢のCHF14.6でミトコンドリア呼吸率、cytochrome-aa3量は正常であるが、ミトコンドリアCK量が減少していたと報告し、ミトコンドリアでのATPの産生は正常であり、ミトコンドリアから細胞質内へのATP輸送に障害があると推測している。⁸⁾

また、Vekslerらは第25~30週齢のCHF14.6のミトコンドリアで、呼吸調節比(RCI)は正常であったが、creatineによる呼吸刺激は低下していたと報告し、ミトコンドリアCKの機

能異常を示唆している。²²⁾

このように、心筋症においてATP産生障害があるのかどうかには結論はだされていない。

今回の著者の検討は、ミトコンドリアでのATP産生に関しては検討していない。しかし、ミトコンドリアCKに異常が存在するという点で、Khuchua、Vekslerらの報告を支持している。このため、心筋症ハムスターの細胞内高エネルギー磷酸低下の一因として、ミトコンドリアCKの異常にもとづく細胞内高エネルギー磷酸輸送障害が関与していると推測された。

carnitine系も電子伝達系もミトコンドリアCKと同様にミトコンドリア内膜に存在している。ミトコンドリア内膜に障害をあたえる共通の原因が、ATPの産生系、輸送系の両方に障害をひきおこし、細胞質内の高エネルギー磷酸の低下、そして心機能の低下をひきおこしていることも考えられる。²³⁾ 今後、ミトコンドリアでのATP産生系、ミトコンドリアからのATP輸送系の両方の側面から詳細な検討が必要

と考えられる。

また、近年、Schulzeらは、ヒトの拡張型心筋症、心筋炎の原因としてATP-ADP translocaseにたいする自己抗体の重要性を報告している。^{24),25)} ATP-ADP translocaseはミトコンドリア内膜でミトコンドリアCKと接して存在し、高エネルギー磷酸輸送をおこなっている。²⁶⁾ 今後、ATP-ADP translocaseとミトコンドリアCKを関連づけた検討も必要と考えられる。

一方、Ingwallらは、SHRの肥大心筋でミトコンドリアCK活性の減少とCKアイソザイムのB-subunitへのシフトを報告している。^{27),28)} したがってこれらのCK系の変化は、心筋症に特異的なものではなく、肥大心にも共通した変化と考えられる。

BI053.58に関しては、生後早期のエネルギー代謝についての報告は少ない。前述のようにWhitmerらは3カ月のBI053.58で細胞内高エネルギー磷酸レベルが低下していたと報告している。³⁾ 今回の著者の結果は、BI053.58では

Whitmerらの検討よりも早期にCK系の異常があり、エネルギー代謝異常が存在することを証明した。

また Malhotraらは BI053.58の myosinの isoenzymeパターンを検討し、第16週よりV2, V3の isoenzymeが有意に増加したと報告している。²⁹⁾しかし、それ以前では有意な変化はなく、今回著者が示したミトコンドリアCKの異常などのエネルギー代謝異常に続発して、myosin isoenzymeの変化などの収縮蛋白系の変化がおこっていると考えられた。

今回の検討でBI014.6では第20週齢から、BI053.58では生後早期からミトコンドリアCKに異常の存在することが示された。このミトコンドリアCKの異常が細胞内へのATP輸送を低下させ、細胞内高エネルギー磷酸レベルを低下させる一因となっていると考えられた。

V、 結 論

心筋症ハムスター (BI014.6, BI053.58) を用い、心室筋のミトコンドリア分画CK活性、

cytoplasmic CK活性比を検討し、以下の結論を得た。

1) BI014.6では第20週齡からミトコンドリア分画のCK活性が低下し、それに続発してcytoplasmic CKのCK-BBへのシフトがおこると考えられた。

2) BI053.58では生後早期からミトコンドリア分画CK活性、cytoplasmic CKのアイソザイムパターンの異常が存在した。

3) これらのCKシステムの異常が、細胞内高エネルギー磷酸輸送の障害をおこし、心機能の低下をひきおこすひとつの原因になると考えられた。

VI. 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました北海道大学循環器内科、安田寿一教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導いただきましたエーザイ東京研究所、別所基明先生、御助言いただきました北海道大学循環器内科、小林毅講師、野村憲和助手、

川口秀明助手に感謝の意を表します。

抄 録

creatine kinase (CK) 系は細胞内で高エネルギーリン酸の運搬に関与している。ミトコンドリアで産生されたATPはミトコンドリアCKにより creatine 麟酸に変えられエネルギー消費系である細胞質内へ運搬される。ミトコンドリアCKの異常はATP輸送障害をひきおこし、細胞質内でATPの減少をもたらす。このことが心機能障害につながることを推測される。今回、われわれは心筋症ハムスター (BI014.6, BI053.58) の心室筋を用い、BI014.6では第5, 20, 50, 62週齢で、BI053.58では第5, 20週齢で creatine kinase システムを検討した。その結果、肥大型心筋症モデルであるBI014.6では第20週齢からミトコンドリア分画CK活性の低下が存在し、第50週齢以後では cytoplasmic CK のCK-BBへのシフトが認められた。また、拡張型心筋症モデルであるBI053.58では、生後早期からミトコンドリアCK活性の異常と cytoplasmic CK のCK-BBへのシフトが認められた。こ

のように、心筋症ハムスターではミトコンドリアCKの異常が存在し、細胞内高エネルギー燐酸輸送が障害されていると考えられた。これが、心筋症ハムスターの心機能障害をおこす一因と推定された。

Reference

- 1) Sievers, R., Parmley, W. W. and Wikman-Coffelt, J.: Energy level at systole vs. diastole in normal hamster hearts vs. myopathic hamster hearts. *Circ. Res.* 53: 759-766, 1983.
- 2) Wikman-Coffelt, J., Sievers, R., Parmley, W. W. and Jasmin, G.: Verapamil preserves adenine nucleotide pool in cardiomyopathic Syrian hamster. *Heart Circ. Physiol.* 19: H22-28, 1986.
- 3) Whitmer, J. T.: Energy metabolism and mechanical function in perfused hearts of Syrian hamsters with dilated or hypertrophic cardiomyopathy. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 18: 307-317, 1986.
- 4) Whitmer, J. T.: L-Carnitine treatment improves cardiac performance and restores high-energy phosphate pools in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ. Res.* 61: 396-408, 1987.
- 5) Hoppel, C. L., Tandler, B., Parland, W., Turkaly, J. S. and Albers L. D.: Hamster cardiomyopathy. *J. Biolog. Chem.* 257: 1540-1548, 1982.
- 6) Tanaka, M., Sato, W., Ohno, K. and Ozawa, T.: Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 156-163, 1989.
- 7) Tanaka-Yamamoto, T., Tanaka, M., Ohno, K., Sato, W., Horai, S. and Ozawa, T.: Specific amplification of deleted Mitochondrial DNA from a myopathic patient and analysis of deleted region with S1 nuclease. *Biochim. Biophys. Acta.*

- 1009: 151-155, 1989.
- 8) Khuchua, Z. A., Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A. V., Grishin, M. N. and Saks, V. A.: Alterations in the creatine kinase system in the myocardium of cardiomyopathic hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 748-757, 1989.
 - 9) Jacobs, W. E.: Respiratory control and the integration of heart high-energy phosphate metabolism by mitochondrial creatine kinase. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 707-725, 1985.
 - 10) Saks, V. A., Chernousova, G. B., Smirnov, Iu. I. and Chazov, E. I.: Study of energy transport mechanism in myocardial cells. *Circ. Res.* 34: III138-III149, 1974.
 - 11) Bajusz, E.: Hereditary cardiomyopathy: A new disease model. *Am. Heart J.* 77: 686-696, 1969.
 - 12) Gertz, E. W.: Cardiomyopathic Syrian hamster: A possible model of human disease. *Progr. exp. Tumor Res.* 16: 242-260, 1972.
 - 13) Strobeck, J. E., Factor, S. M., Bhan, A., Sole, M., Fein, F. and Sonnenblick, E. H.: Hereditary and acquired cardiomyopathies in experimental animals: mechanical, biochemical, and structural features. *Annals New York Academy of Sciences*: 59-88, 1979.
 - 14) 大西俊造ら: 特発性心筋症ハムスター, 心臓代謝実験法. 永野充編. 333-337, 医歯薬出版株式会社, 1988.
 - 15) Feldman, A. M., Tena, R. G., Kessler, P. D., Weisman, H. F.,

- Schulman, S. P., Blumenthal, R. S., Jackson, D. G. and Dop, C. V.: Diminished β -adrenergic receptor responsiveness and cardiac dilation in hearts of myopathic Syrian hamsters (BIO53.58) are associated with a functional abnormality of the G stimulatory protein. *Circulation* 81: 1341-1352, 1990.
- 16) Factor, S. M., Minase, T., Cho, S., Dominitz, R. and Sonnenblick, E. H.: Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: A preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation* 66: 342-354, 1982.
- 17) Saks, V. A., Kuznetsov, A. V. and Kupriyanov, V. V.: Creatine kinase of rat heart mitochondria. *J. Biolog. Chem.* 260: 7757-7764, 1985.
- 18) Hall, N., DeLuca, M.: Electrophoretic separation and quantitation of creatine kinase isozymes. *Analy. Biochem.* 76: 561-567, 1976.
- 19) Rosalki, S. B.: An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J. Lab. and Clin. Med.* 69: 696-705, 1967.
- 20) Roberts, R. and Grace, A. M.: Purification of mitochondrial creatine kinase. *J. Biolog. Chem.* 255: 2870-2877, 1980.
- 21) Szasz, G., Gruber, W.: Creatine kinase in serum: 4. differences in substrate affinity among the isoenzymes. *Clin. Chem.* 24: 245-249, 1978.
- 22) Veksler, V. I., Ventura-Clapier, R., Lechene, P. and Vassort, G.: Functional state of myofibrils, mitochondria and bound

- creatine kinase in skinned ventricular fibers of cardiomyopathic hamsters. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20: 329-342, 1988.
- 23) Katz, A. M., Freston, J. W., Messineo, F. C. and Herbette, L. G.: Membrane damage and the pathogenesis of cardiomyopathies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17 (suppl 2): 11-20, 1985.
- 24) Schulze, K., Becker, B. F. and Schultheiss, H. P.: Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ. Res.* 64: 179-192, 1989.
- 25) Schulze, K., Becker, B. F. and Schultheiss, H. P.: Antibodies to ADP-ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, impair cardiac function. *Circulation* 81: 959-969, 1990.
- 26) Saks, V. A., Khuchua, Z. A. and Kuznetsov, A. V.: Specific inhibition of ATP-ADP translocase in cardiac mitoplasts by antibodies against mitochondrial creatine kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 891: 138-144, 1987.
- 27) Bittl, J. A. and Ingwall, J. S.: Intracellular high-energy phosphate transfer in normal and hypertrophied myocardium. *Circulation* 75 (suppl I): I96-I101, 1987.
- 28) Ingwall, J. S., Kramer, M. F. and Grossman, W.: The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N. Engl. J. Med.* 313: 1050-1054, 1985.

29) Malhotra, A., Karell, M. and Scheuer, J.: Multiple cardiac contractile protein abnormalities in myopathic Syrian hamsters (BIO53.58). J. Mol. Cell. Cardiol. 17: 95-107, 1985.

Summary

The creatine kinase system is related to intracellular high-energy phosphate transfer. Mitochondrial creatine kinase catalyzes the transfer of high-energy phosphate between creatine and ATP generated in mitochondria. Creatine phosphate generated in this process is transferred to myofibril. Mitochondrial creatine kinase abnormalities cause the decrease of ATP level in cytoplasm through the disorder of ATP transfer. If such decrease happens in myocardium the depressed cardiac function is suspected. I studied the time course of alterations of the creatine kinase system in BI014.6 (the model of hypertrophic cardiomyopathy) at 5 weeks, 20 weeks, 50 weeks, and 62 weeks of age, and in BI053.58 (the model of dilated cardiomyopathy) at 5 weeks and 20 weeks of age. In BI014.6, creatine kinase activity of myocardium and isolated mitochondria was decreased in 20, 50, 62-week-old hamsters. The share of mitochondrial creatine kinase in the total tissue enzyme activity was decreased, and the share of BB form was increased in 50, 62-week-old hamsters. In BI053.58, creatine kinase activity of myocardium and isolated mitochondria was decreased in 20-week-old hamsters. The share of mitochondrial creatine kinase was increased, and BB form was decreased in 5, 20-week-old hamsters. The experiments suggest alterations in the creatine kinase system occur at 20 weeks of age in BI014.6 and at neonatal phase in BI053.58. These alterations of creatine kinase system may contribute to depressed cardiac function in cardiomyopathy.

Key words : Mitochondrial creatine kinase, Cardiomyopathy,
Creatine kinase, Hamster

Figure Legends

- Fig 1 The elution profile from DEAE-Sephacel
- Fig 2 Electrophoretic pattern of mitochondrial CK
- Fig 3 CK activity of mitochondria in F1 β and BIO14.6
- Fig 4 CK activity of mitochondria in F1 β and BIO53.58
- Fig 5 CK activity of myocardium in F1 β and BIO14.6
- Fig 6 CK activity of myocardium in F1 β and BIO53.58

Table 1 Purification of mitochondrial CK

Fraction	CK activity (IU/mg · protein)	Purification (fold)
40,000 g Supernatant	2.37	1
Ammonium Sulfate (30~40%)	13.06	5.5
DEAE-Sephacel	27.68	11.7

Table 2 Characteristics of normal and myopathic hamsters

Group	N	Body Weight (g)	Heart Weight (mg)	HW/BW (mg/g)
5W.F1 β	5	84.2 \pm 4.0	252.6 \pm 9.4	3.01 \pm 0.16
5WBIO 14.6	5	55.6 \pm 4.8*	198.6 \pm 14.0*	3.58 \pm 0.16*
5WBIO 53.58	5	64.8 \pm 12.9*	208.2 \pm 9.1*	3.36 \pm 0.59
20W.F1 β	5	132.0 \pm 7.2	373.2 \pm 24.7	2.83 \pm 0.07
20WBIO 14.6	5	104.0 \pm 13.7*	385.0 \pm 29.7	3.73 \pm 0.23*
20WBIO 53.58	5	117.6 \pm 7.1*	384.4 \pm 30.4	3.27 \pm 0.21
50W.F1 β	5	157.2 \pm 15.8	452.2 \pm 39.5	2.89 \pm 0.15
50WBIO 14.6	5	117.4 \pm 12.0*	546.6 \pm 50.1*	4.70 \pm 0.64*
62W.F1 β	5	167.2 \pm 7.7	469.0 \pm 24.4	2.80 \pm 0.07
62WBIO 14.6	4	120.0 \pm 9.2*	661.5 \pm 62.3*	5.52 \pm 0.44*

* p<0.05 vs. F1 β

Table 3 Creatine Kinase isoenzymes distribution in F1 β , BIO 14.6 and BIO 53.58

Group	BB (%)	MB (%)	MM (%)	MIT (%)
5W. F1 β	7.06 \pm 1.70	27.94 \pm 5.44	59.62 \pm 6.30	5.40 \pm 1.47
5W. BIO 14.6	8.72 \pm 1.10	31.96 \pm 5.58	55.18 \pm 5.60	4.12 \pm 1.57
5W. BIO 53.58	19.68 \pm 2.54	24.26 \pm 3.94	53.16 \pm 3.09	2.86 \pm 0.53
20W. F1 β	7.98 \pm 1.21	26.20 \pm 4.84	57.22 \pm 2.91	8.58 \pm 3.43
20W. BIO 14.6	8.12 \pm 2.01	26.94 \pm 4.96	58.36 \pm 6.13	6.60 \pm 2.30
20W. BIO 53.58	14.52 \pm 3.00	24.84 \pm 4.39	57.88 \pm 6.66	2.72 \pm 0.64
50W. F1 β	7.00 \pm 1.01	21.20 \pm 6.26	55.04 \pm 1.66	15.80 \pm 4.09
50W. BIO 14.6	10.06 \pm 1.42	28.38 \pm 4.22	55.00 \pm 2.82	6.54 \pm 1.86
62W. F1 β	4.46 \pm 0.68	17.18 \pm 0.89	64.56 \pm 3.00	13.78 \pm 2.97
62W. BIO 14.6	10.88 \pm 2.78	24.23 \pm 2.06	59.70 \pm 4.90	5.23 \pm 2.40

($p < 0.05$)

Fig 1

DEAE-Sephacel® (Pharmacia)
column size $\phi 22\text{mm} \times 70\text{mm}$
flow rate 2ml/min
fraction size 1ml/tube

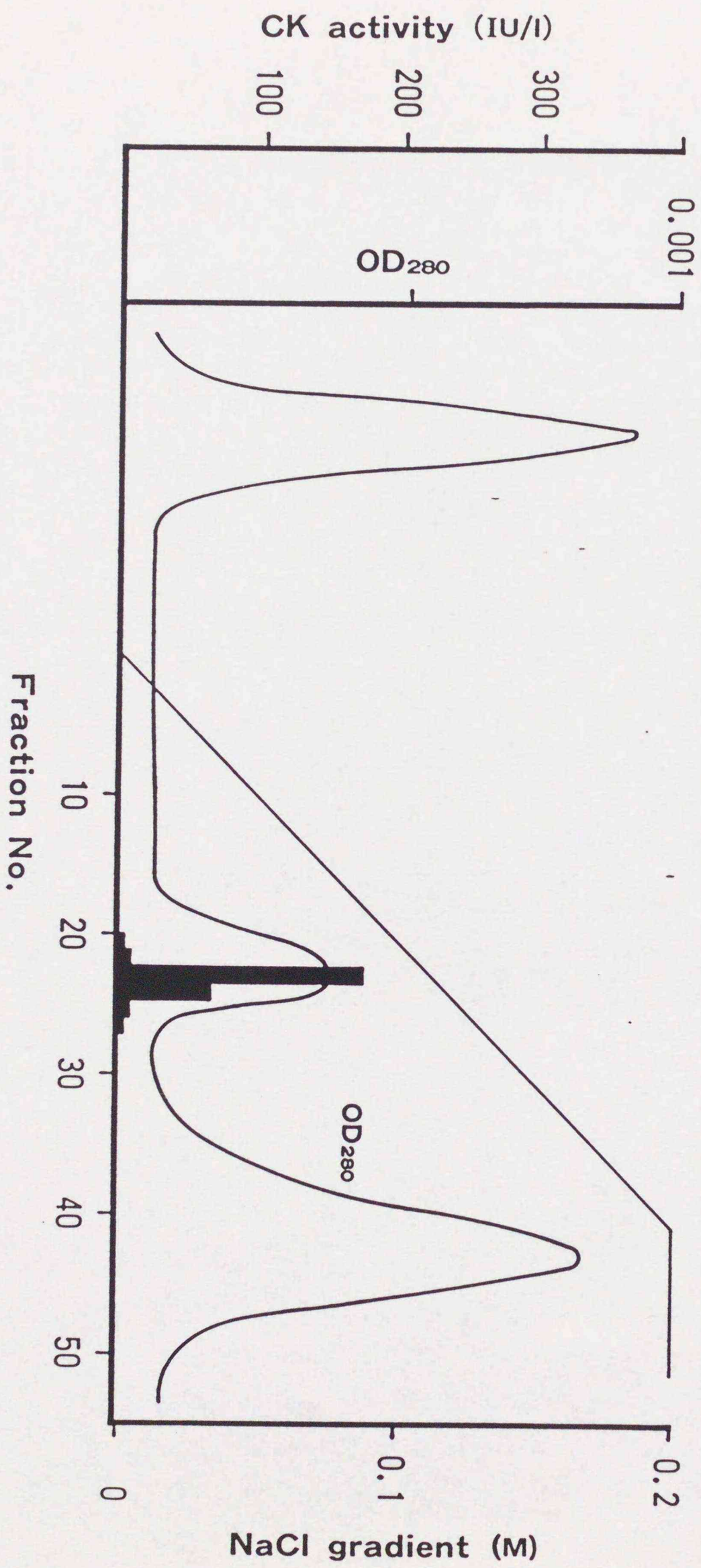


Fig. 2 Electrophoretic pattern of purified mitochondria

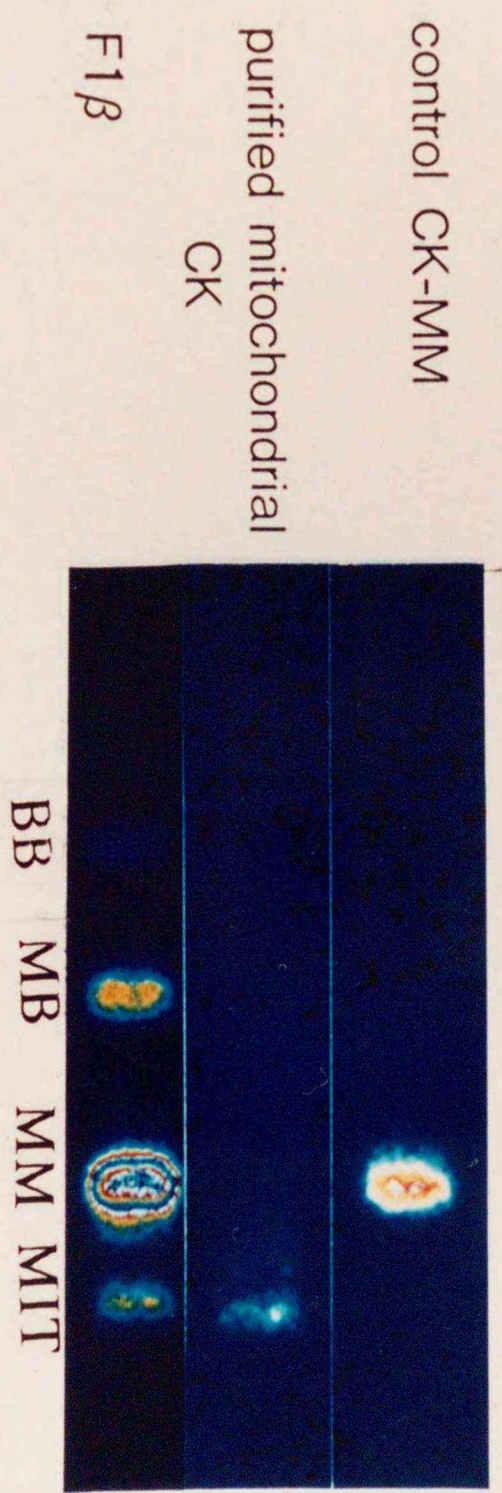


Fig 3

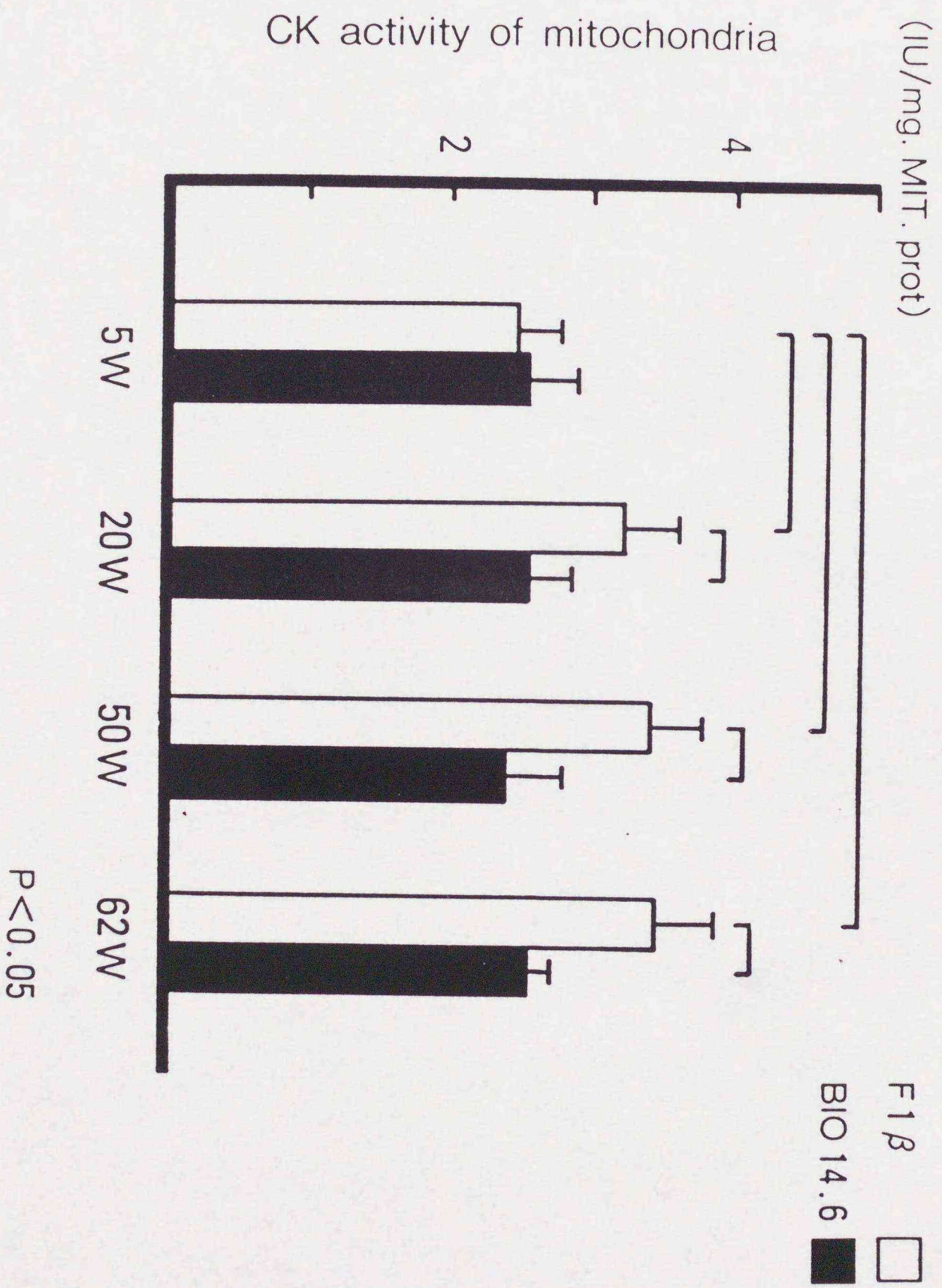


Fig 4

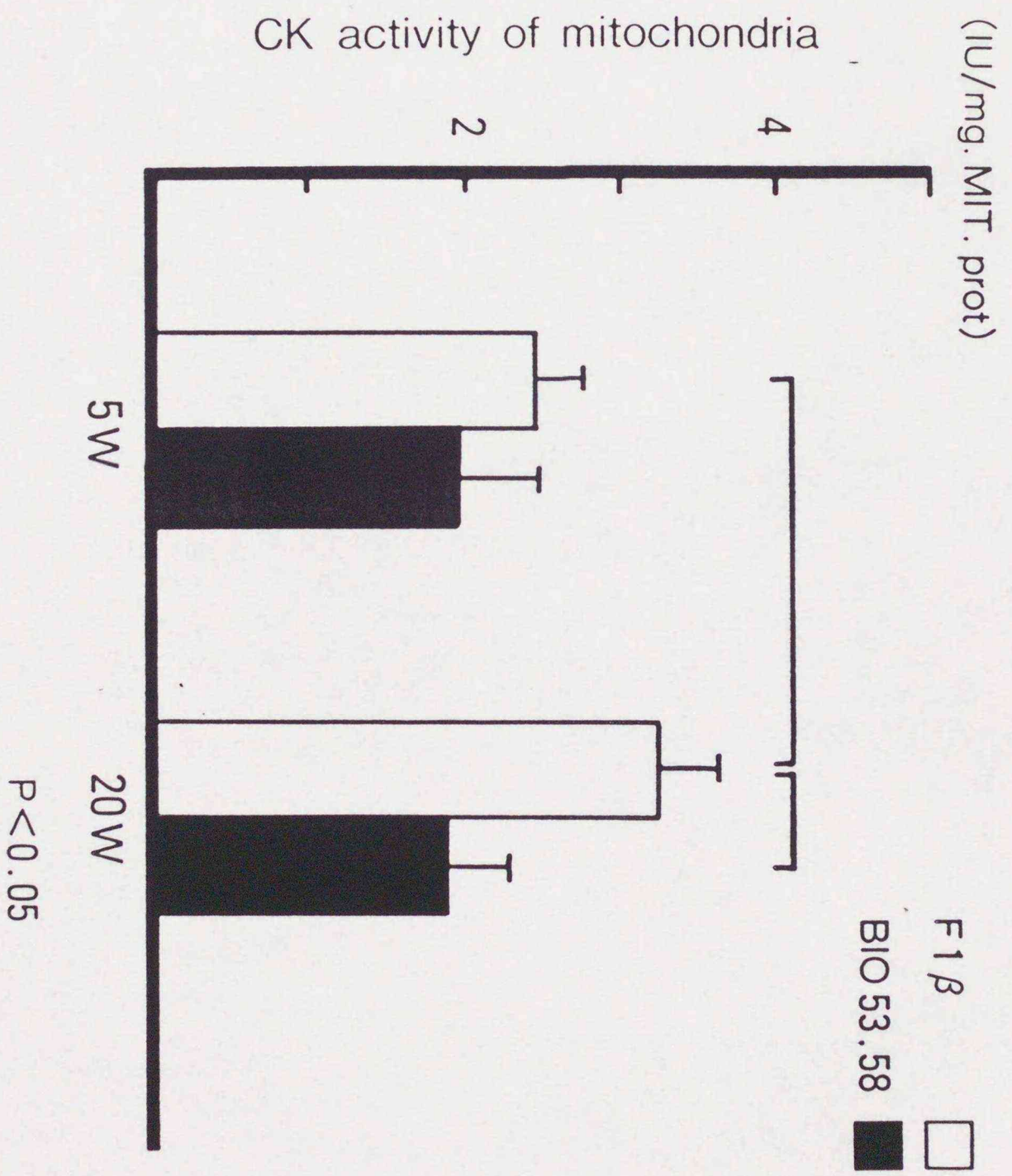


Fig 5

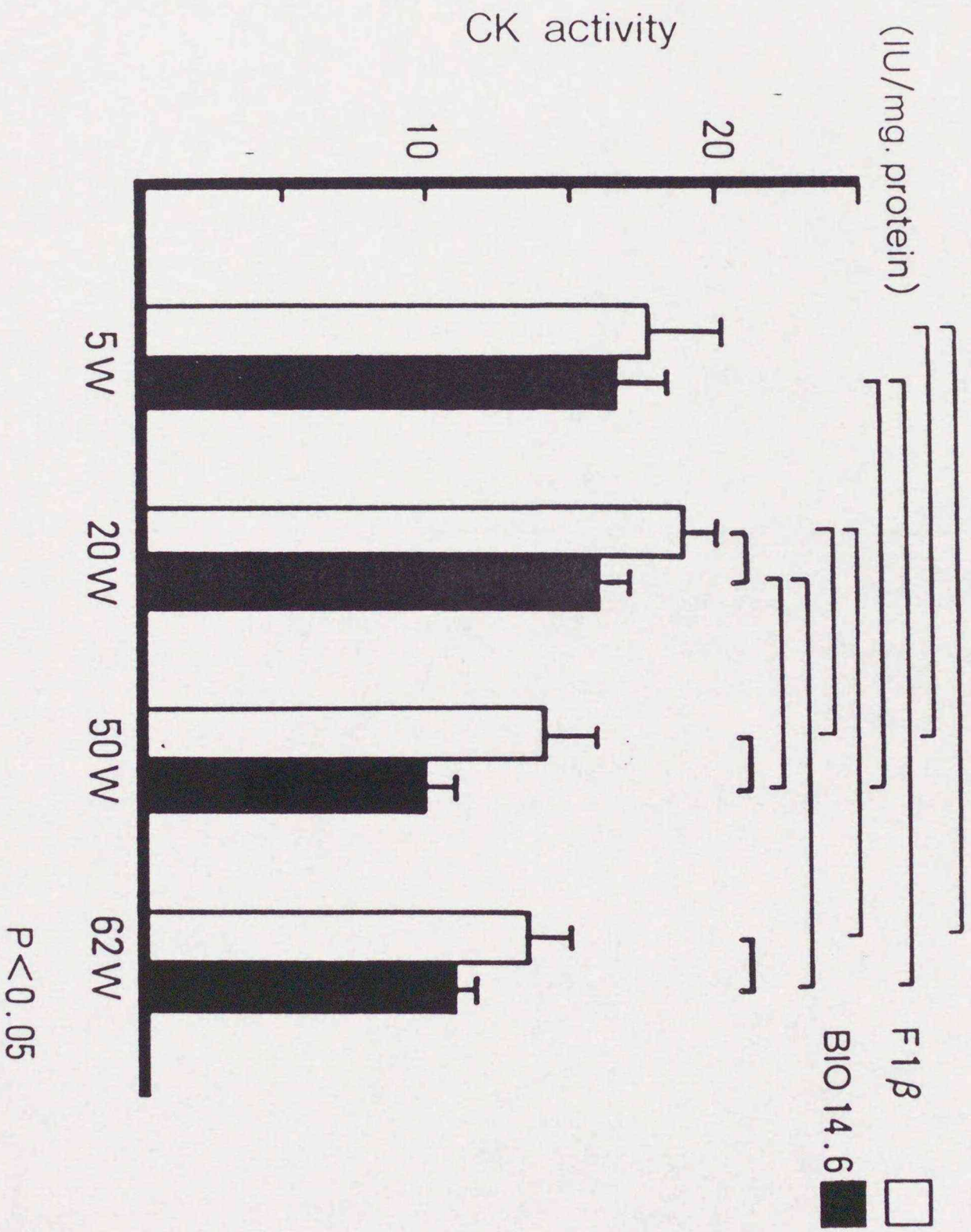
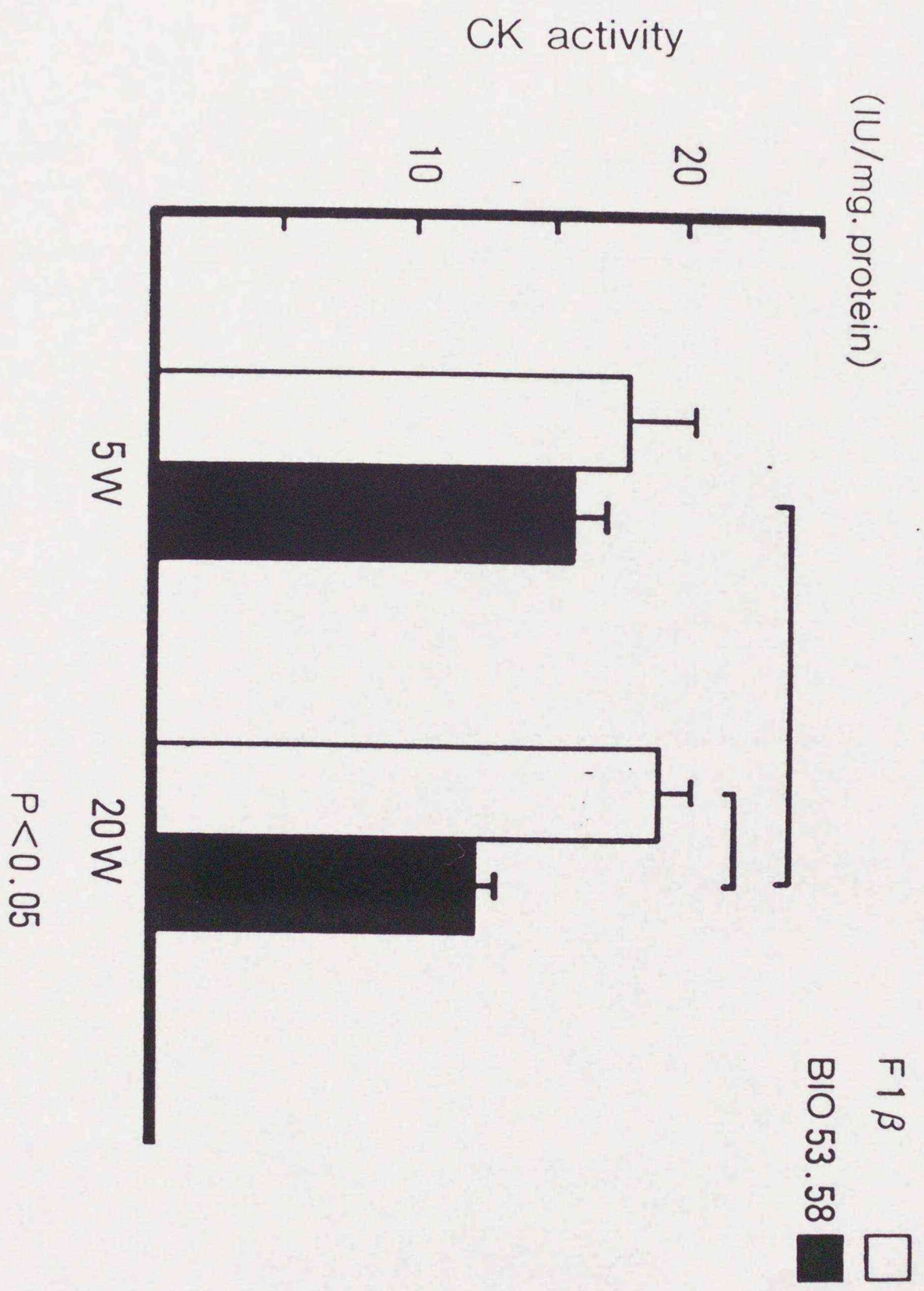


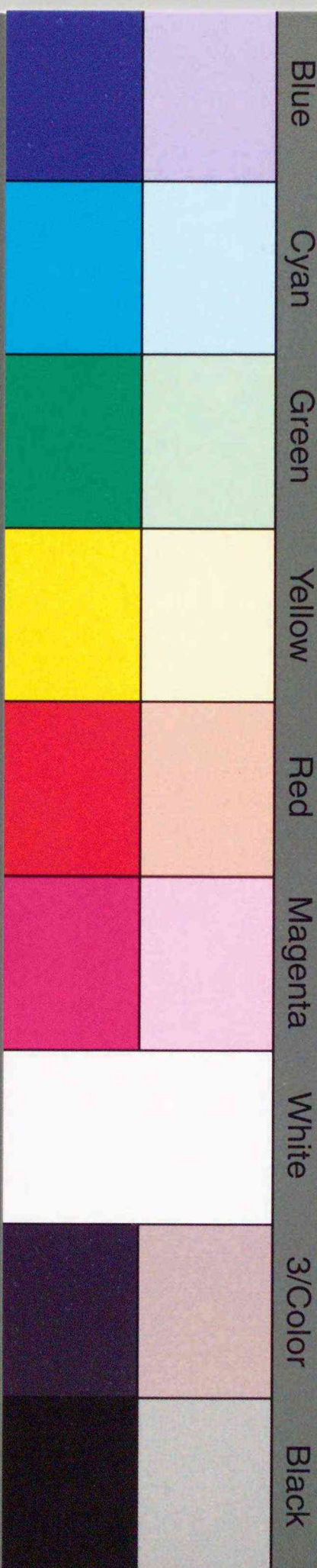
Fig 6



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

