

食塩過剰摂取による心疾患リスク増加における心筋ミトコンドリア品質の役割

西村 明幸^{1, 2}

¹ 自然科学研究機構生理学研究所心循環シグナル研究部門,

² 生命創成探究センター心循環ダイナミズム創発研究グループ

概要

エネルギー産生器官であるミトコンドリアの機能維持(品質管理)は細胞恒常性を維持する上で重要であり, その機能破綻は, 心疾患を始め, 様々な疾患で確認されている。報告者はこれまでに虚血や環境化学物質曝露などによって心筋ミトコンドリアの過剰分裂が引き起こされることが心筋の機能低下の引き金になること, ミトコンドリアの過剰分裂はミトコンドリア分裂促進因子 Drp1 が病態特異的にアクチン結合タンパク質 Filamin と複合体を形成することで引き起こされることを明らかにしてきた。さらに, 超硫黄分子と呼ばれるレドックス活性の高い硫黄代謝物が Drp1-Filamin 複合体形成を制御しており, 虚血ストレスや環境親電子物質曝露による心筋細胞での超硫黄分子の減少が Drp1-Filamin 複合体形成を促進することでミトコンドリア機能を低下させることを見出している。

不全患者における減塩の重要性は広く認識されている。高食塩摂取は血圧上昇とは別に直接的に心筋細胞の収縮・拡張機能を阻害するとされているがその詳細なメカニズムは不明である。一方, 食塩感受性高血圧症ラットでは心筋ミトコンドリアの形態異常が確認されていることから, 塩分負荷と心筋ミトコンドリア品質異常の関連が予想された。

本研究では, 超硫黄代謝を軸とした Drp1-Filamin 複合体制御から心筋ミトコンドリアの品質・機能に対する高食塩ストレスの影響について検討を行った。単離心筋細胞を低酸素ストレスに曝した場合にはミトコンドリア膜電位の脱分極を介して超硫黄分子から硫化水素への異化反応が起こるのに対して, 高 NaCl 培地で処置した場合には, 逆にミトコンドリア膜電位の過分極が見られ, 硫化水素から超硫黄分子への同化反応が促進された。高 NaCl 培地によるこのような応答変化は同様の浸透圧を有するソルビトール培地でも確認されたことから, ナトリウムイオンや塩化物イオンではなく高浸透圧ストレスが要因となることを見出した。Drp1-Filamin 複合体形成やミトコンドリア形態も高 NaCl 培地では変化が見られなかったがミトコンドリアのエネルギー産生能は低下していたことから, 高浸透圧ストレスは低酸素ストレスなどとは別のメカニズムでミトコンドリア機能を調節していると予想され, そのメカニズムを明らかにすることが今後の課題である。

1. 研究目的

エネルギー産生器官であるミトコンドリアの機能維持(品質管理)は細胞恒常性を維持する上で重要であり, その機能破綻は, 様々な疾患で確認されている。また, 血行力学的負荷や神経過興奮等によって生じる心筋細胞の早期老化現象は心機能を低下させる原因となる。報告者は, 心筋早期老化の発症メカニズムに着手し, 心筋ミトコンドリアの過剰分裂が老化誘導の引き金になること, ミトコンドリア分裂促進因子 Drp1 が病態特異的にアクチン結

合蛋白質 Filamin と複合体を形成することがミトコンドリア過剰分裂の原因になることをこれまでに報告している¹⁾。また, 虚血や環境化学物質(メチル水銀やタバコ煙)曝露によって起こる心疾患リスクにも Drp1-Filamin 複合体形成を介した心筋ミトコンドリアの過剰分裂が関与すること^{2, 3)}, Drp1-Filamin 複合体形成に超硫黄分子を介した硫黄レドックスシステムが関与することも見出している^{2, 4)}。超硫黄分子は, 硫黄原子が直鎖状に複数連結した構造(硫黄カテナーション)を分子内に有する分子の総称である(R-

S_(n)SH, R-SS_(n)S-R)。近年、超硫黄鎖を安定的にラベル化する試薬の開発と質量分析技術の発展によって、超硫黄分子は生体内に豊富に存在することが明らかとなった⁵⁾。通常、チオール基は求核性を示すが、超硫黄分子の硫黄カテネーション部分では電子の偏りが生じるために、超硫黄分子は求核性と求電子性を併せ持つユニークな性質を示す。この特性を生かし、超硫黄分子はミトコンドリア電子伝達系での電子受容を始め、抗酸化活性や膜電位形成など様々な生命現象に関与することが報告されている⁶⁾。硫黄カテネーションはシステインやグルタチオンなどの低分子だけでなくタンパク質システイン側鎖にも取り込まれ、これをタンパク質超硫黄化と呼ぶ。タンパク質超硫黄化は翻訳時にシステイン(Cys-SH)の代わりにシステインパースルフィド(Cys-SSH)やシステイントリスルフィド(Cys-SSSH)が取り込まれ、その後、硫黄が付いたり外れたりすることでタンパク質の構造や機能を調節する修飾として働く。

報告者は1) Drp1 の Cys⁶⁴⁴ は定常時に超硫黄化されることで Filamin との相互作用が抑制され、自身の活性を抑制していること、2) 低酸素ストレスやメチル水銀曝露によってミトコンドリア電子伝達系が阻害されるとそこから漏出した電子によって Drp1 Cys⁶⁴⁴ を含む超硫黄鎖から硫黄が外れ硫化水素へと還元代謝される(超硫黄異化反応)こと、3) 超硫黄異化反応により Drp1 Cys⁶⁴⁴ 超硫黄鎖の脱硫黄化が進むことで Drp1 は Filamin と相互作用できるようになり Drp1 の活性化が引き起こされることを見出している^{2,3,4)}。このことは、超硫黄代謝を介した Drp1-Filamin 複合体形成とそれに続くミトコンドリア品質異常が共通の心疾患リスク因子となる可能性を示している。

心不全患者における減塩の重要性は広く認識されており、動物モデルにおいても高食塩摂取によって心疾患リスクが上昇することが報告されている⁷⁾。高食塩摂取は血圧上昇とは別に、直接的に心筋細胞の収縮・拡張機能を阻害することが知られているがその詳細なメカニズムは未だ不明である。一方、食塩感受性高血圧症ラットでは心筋ミトコンドリアの形態異常が確認されていることから⁸⁾、塩分負荷と心筋ミトコンドリア品質異常の関連が予想された。そこで、本研究では、申請者がこれまでに見出した超硫黄代謝を軸とした Drp1-Filamin 複合体制御から

心筋ミトコンドリアの品質・機能に対する、高食塩ストレスの影響を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 心筋細胞の単離

SD ラットの哺乳 2 日齢(日本 SLC)もしくは C57BL6J マウスの哺乳 2 日齢(自家繁殖)に低温麻酔をかけたのち、頸部を切開し速やかに放血死させた。心臓を摘出し、心室部分のみをトリミングした後、6 等分し、組織を 0.05%トリプシン-EDTA(Thermo)に入れ 4°C で一晩前消化した。翌日、組織を PBS で洗浄し、1 mg/ml コラゲナーゼ Type2 (Worthington) 溶液に移し 37°C、15 分間振盪した。コラゲナーゼ溶液を回収し、残った組織片に関しては再度コラゲナーゼ溶液を加え 10 分間振盪させることで追加の酵素処理を行った。回収したコラゲナーゼ溶液をセルストレーナーに通し凝集物の除去を行った後、200 x g で 5 分間遠心することで細胞を回収した。回収した細胞を DMEM (10%FBS, +P/S) で再懸濁した後、10 cm ディッシュに播種し、37°C で 2 時間インキュベートすることで線維芽細胞を接着させた。上清を回収し、細胞数を調整した後に、マトリゲルコートディッシュに播種した。翌日に、DMEM (2%FBS, +P/S) に交換し、さらに 1 日培養したものを実験に使用した。

2.2 心筋細胞への高 NaCl 刺激

単離した心筋細胞を 2 日間培養後、DMEM(+P/S) に交換した後、以下の条件で 50 mM もしくは 100 mM NaCl 刺激溶液を調整した。50 mM NaCl 刺激溶液では、DMEM 192 μ l に対して 150 mM NaCl 4 μ l と 2.5 M NaCl 4 μ l を加えた。100 mM NaCl 刺激溶液では、DMEM 192 μ l に対して 2.5 M NaCl 8 μ l を加えた。コントロール溶液は DMEM 192 μ l に対して 150 mM NaCl 8 μ l を加えた。過去の知見に基づいて、浸透圧はコントロール溶液で 300 mOsm/kg H₂O、50 mM と 100 mM NaCl 刺激溶液はそれぞれ 400 と 500 mOsm/kg H₂O となる⁹⁾。NaCl 以外の高浸透圧溶液として NaCl の代わりに同濃度ソルビトールでも溶液を調整した¹⁰⁾。

2.3 硫黄代謝物イメージング

超硫黄分子と硫化水素それぞれに反応する化学蛍光プローブを用いて硫黄代謝物のイメージングを行った。単離した心筋細胞(4.5 x 10⁴ 個)を Triple well dish (Iwaki) に播種した。培養 2 日後に DMEM(+P/S) に交換し、各

種刺激を加え 18 時間培養した。ハンクス平衡塩溶液 (HBSS) で細胞を洗浄後, 超硫黄分子検出プローブ QS10 もしくは硫化水素検出プローブ SF7-AM を用いて 30 分間インキュベーションすることでプローブを細胞に取り込ませた。HBSS で洗浄後, フェノールレッド負含 DMEM で調整した刺激溶液に細胞を戻し, 蛍光顕微鏡観察 (BZ-X700, キーエンス) を行った。QS10 シグナルは CH1 (Ex: 545 nm, Em: 605 nm) と CH2 (Ex: 545 nm, Em: 700 nm) で撮影を行い, CH1/CH2 比を計算し擬似カラーで表記した。SF7-AM は Ex: 470 nm, Em: 525 nm で撮影を行った⁴⁾。

2. 4 ミトコンドリア形態解析

単離した心筋細胞 (4×10^4 個) を Triple well dish (Iwaki) に播種した。培養 2 日後に DMEM (+P/S) に交換し, ミトコンドリア染色試薬である 50 nM MitoBright Green LT (Dojindo) で 30 分間ラベル化を行った。HBSS で洗浄後, フェノールレッド負含 DMEM で調整した刺激溶液で細胞を 18 時間培養した。その後, 蛍光顕微鏡観察を行った。1 細胞当たりの平均のミトコンドリア断片長を Image J で解析, 定量した。

2. 5 ミトコンドリア膜電位計測

単離した心筋細胞 (4×10^4 個) を Triple well dish に播種した。培養 2 日後に DMEM (+P/S) に交換し, 各種刺激を加え 18 時間培養した。ミトコンドリア膜電位プローブ JC-10 を用いて 30 分間インキュベーションすることでプローブを細胞に取り込ませた。HBSS で洗浄後, フェノールレッド負含 DMEM で調整した刺激溶液に細胞を戻し, 蛍光顕微鏡観察を行った。JC-10 シグナルは CH1 (Ex: 470 nm, Em: 525 nm) と CH2 (Ex: 545 nm, Em: 605 nm) で撮影を行い, CH2/CH1 比を計算し定量化した。

2. 6 酸素消費量測定

酸素消費量は XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience 社) を使用して測定した。単離した心筋細胞 (1.5×10^4 個) を専用プレートに播種した。培養 2 日後に DMEM (+P/S) に交換し, 各種刺激を加え 18 時間培養した。分析前に細胞を 5 mM グルコース, 1 mM ピルビン酸, 2 mM グルタミンを添加した XF Base Medium で 1 時間培養した後, 測定機器にプレートをセットした。

その後, 1) 10 μ M oligomycin, 2) 2 μ M carbonyl cyanide-p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 3) 10 μ M rotenone and 10 μ M antimycin A の順番で薬剤を加えた際の酸素消費量の変化を測定した。

2. 7 Proximity Ligation Assay (PLA) のよる Drp1-Filamin 複合体の解析

PLA は Sigma 社の Duolink PLA 蛍光検出プロトコルに従って行った。単離した心筋細胞 (3×10^4 個) を Triple well dish に播種した。培養 2 日後に DMEM (+P/S) に交換し, 各種刺激を加え 18 時間培養した。細胞固定とブロッキング処置を行った後に anti-Drp1 抗体 (Santa Cruz 社) と anti-Filamin 抗体 (Santa Cruz 社) でインキュベーションした。心筋細胞は anti-Actinin 抗体で対比染色を行い, 蛍光顕微鏡観察を行い, PLA ドット数を定量化した。

3. 研究結果

3. 1 高 NaCl 刺激は超硫黄同化反応を促進する

超硫黄分子は電子を受け取ると硫黄カテナーションから硫黄原子が外れて硫化水素が産生される。これを還元的異化反応と呼ぶ。一方, 酸化酵素 SQOR によって硫化水素は超硫黄鎖に取り込まれて硫黄カテナーションは伸張する¹¹⁾。この過程で SQOR は超硫黄分子から電子を引き抜くことから酸化的同化反応と呼ぶ。この異化反応と同化反応によって超硫黄分子と硫化水素のバランスは決められており, 報告者はこれまでに低酸素ストレスや環境親電子物質ストレスによりミトコンドリア電子伝達系が阻害されるとそこから漏出した電子によって超硫黄分子から硫化水素への異化反応が促進されること, そしてそれがミトコンドリアの過剰分裂, 心筋細胞の機能低下につながることを見出している⁴⁾。そこで, 高 NaCl 刺激が超硫黄分子と硫化水素のバランスに及ぼす影響を, 化学蛍光プローブを用いたイメージング解析から検証した。そこで DMEM 培地に 50 mM NaCl もしくは 100 mM NaCl を追加した培地で心筋細胞を 18 時間培養し, QS10 プローブで超硫黄分子を, SF7-AM プローブで硫化水素のイメージングを行った。その結果, 当初の予想に反して, 高 NaCl 刺激によって超硫黄分子は増加し, 硫化水素は減少したことから, 高 NaCl 刺激によって超硫黄同化の方にバランスがシフトしていることが分かった (図 1)。

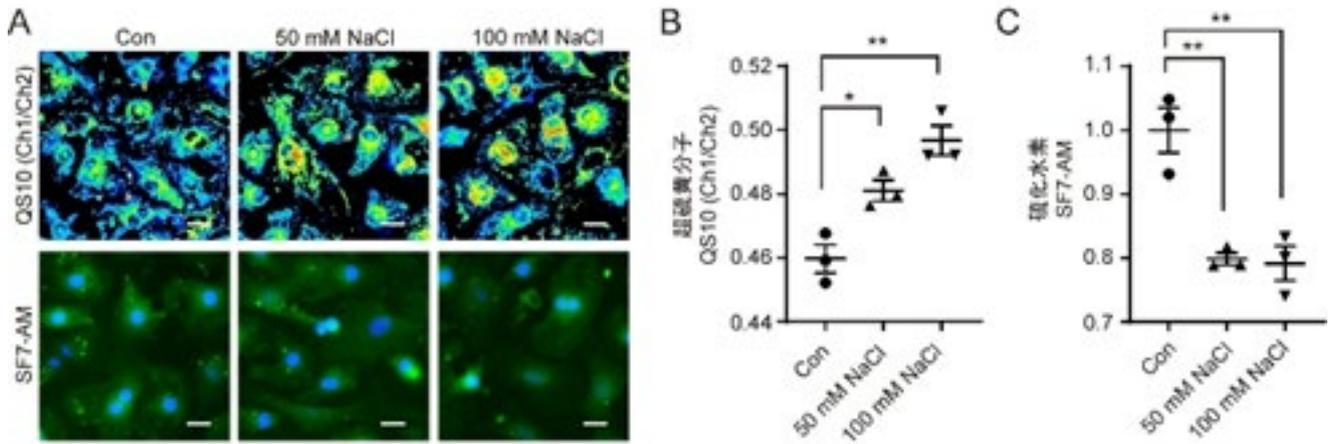


図 1. 高 NaCl 刺激による心筋細胞内の超硫黄分子と硫化水素の変化
 A) QS10 による超硫黄分子 (上段) と SF7-AM による硫化水素 (下段) のイメージング。スケールバーは 20 μm 。
 B) QS10 の定量結果。
 C) SF7-AM の定量結果。

3. 2 高 NaCl 刺激はミトコンドリア膜電位の過分極を引き起こす

低酸素ストレスによるミトコンドリア膜電位の脱分極は電子伝達系を阻害することで超硫黄異化反応を促進する⁴⁾。そこで高 NaCl 刺激がミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を、膜電位プローブ JC-10 を用いて検討した。その結果、超硫黄代謝と一致して、高 NaCl 刺激によって JC-10 シグナルの赤/緑比が高くなったことからミトコンドリア膜電位が過分極していることが明らかとなった (図 2)。

3. 3 高浸透圧刺激はミトコンドリア膜電位の過分極を引き起こす

高 NaCl 刺激は細胞外のナトリウムイオン (Na^+)、塩化物イオン (Cl^-) 濃度を上げると共に細胞にかかる浸透圧も変化させる。コントロール溶液が 300 mOsm/kg H_2O であるのに対して 50 と 100 mM NaCl 刺激では浸透圧が 400 と 500 mOsm/kg H_2O に変化する⁹⁾。そこで Na^+ と浸透圧変化のどちらがミトコンドリア膜電位の変化に寄与しているのかを明らかにするためにソルビトールを用いて同等の浸透圧変化を誘導した。その結果、ソルビトール刺激によっても同程度の過分極が確認されたことから (図 3)、高浸透圧ストレスがミトコンドリア膜電位の過分極を引き起こしていることが明らかとなった。

3. 4 高 NaCl 刺激は Drp1-Filamin 複合体形成および心筋ミトコンドリア形態に影響を与えない

低酸素ストレスなどによる超硫黄異化状態は Drp1-Filamin 複合体形成を介してミトコンドリアの過剰分裂を誘導した。そこで高 NaCl 刺激による超硫黄同化状態が Drp1-Filamin 複合体形成およびミトコンドリア形態に及ぼす影響について検討を行った。Drp1-Filamin 複合体形成を Drp1 抗体と Filamin 抗体を用いた PLA 法で検討した結果、高 NaCl 刺激によって PLA ドット数に変化が見られなかったことから Drp1-Filamin 複合体形成に影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 4A)。次に、ミトコンドリア染色試薬 MitoBright LT Green を用いてミトコンドリアの形態への影響について検討した。Drp1-Filamin 複合体形成と同様に高 NaCl 刺激はミトコンドリアの分裂/融合バランスに影響を与えなかった (図 4B)。

3. 5 高 NaCl 刺激は心筋ミトコンドリアでのエネルギー産生能を低下させる

低酸素ストレスや環境親電子物質曝露ストレスではミトコンドリアの過剰分裂が誘導されることでミトコンドリアでのエネルギー産生能は低下する。そこで、高 NaCl 刺激がミトコンドリアでのエネルギー産生能に及ぼす影響について検討を行った。エネルギー産生能は Seahorse XF ミストレストを用いて評価した。その結果、高 NaCl 刺激によってミトコンドリアの最大呼吸能は優位に低下することが明らかとなった (図 5)。

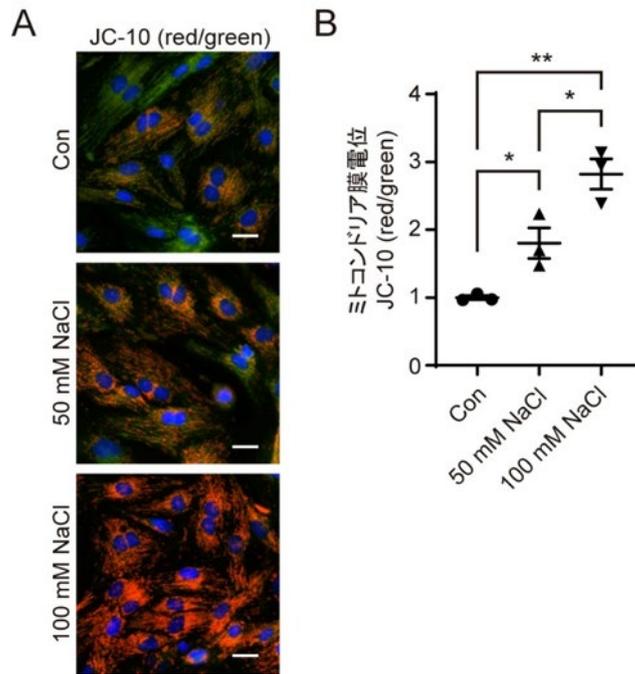


図 2. 高 NaCl 刺激による心筋ミトコンドリア膜電位の変化
 A) JC-10 によるミトコンドリア膜電位イメージング。スケールバーは 20 μm 。
 B) JC-10 (red/green)比の定量結果。

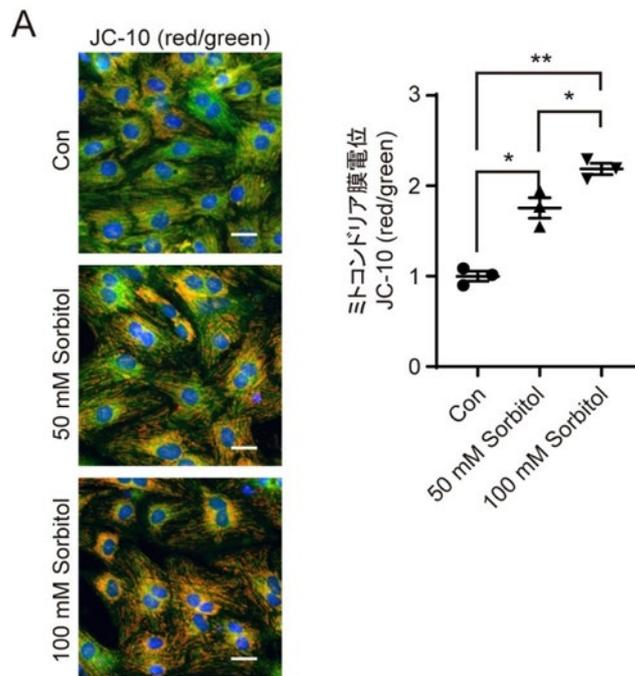


図 3. ソルビトール刺激による心筋ミトコンドリア膜電位の変化
 A) JC-10 によるミトコンドリア膜電位イメージング。スケールバーは 20 μm 。
 B) JC-10 (red/green)比の定量結果。

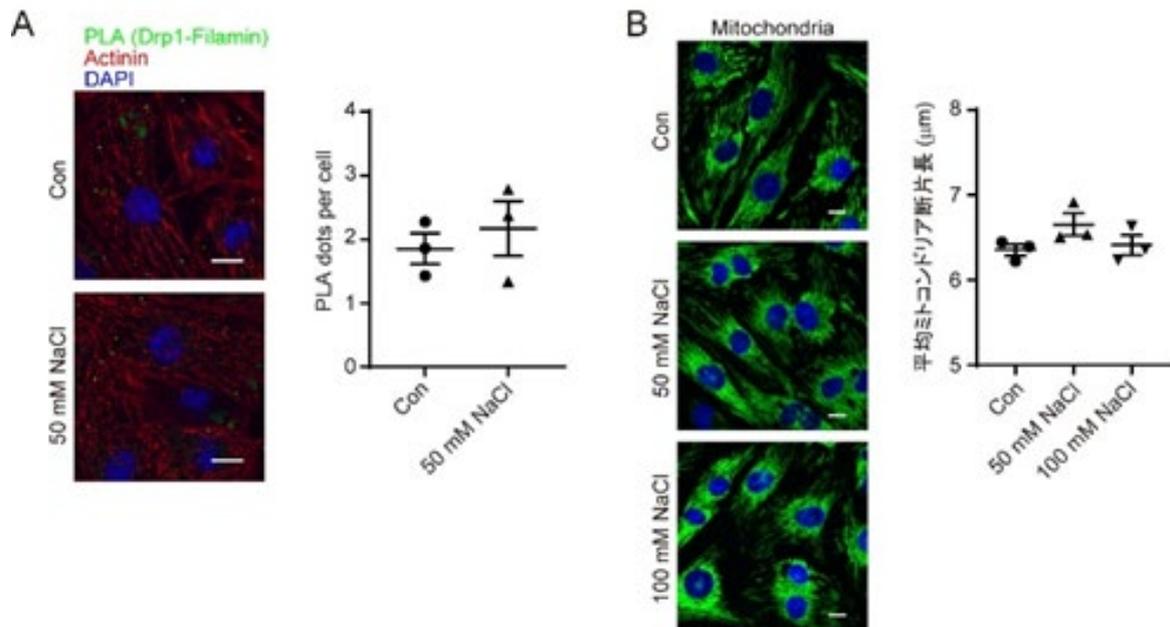


図 4. 高 NaCl 刺激が心筋ミトコンドリア形態に及ぼす効果

- A) PLA 法による Drp1-Filamin 複合体のイメージング。
 緑は PLA シグナル, 赤はアクチニン(心筋細胞マーカー)染色, 青は核染色。スケールバーは 10 μm 。
 細胞当たりの PLA ドット数を定量化したものを右に示す。
- B) ミトコンドリア形態のイメージング。スケールバーは 10 μm 。
 細胞当たりの平均ミトコンドリア断片長を定量化したものを右に示す。

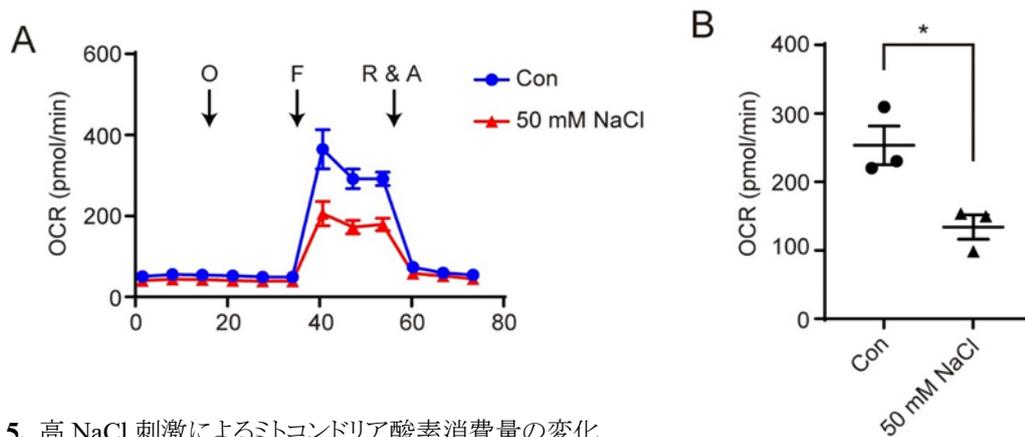


図 5. 高 NaCl 刺激によるミトコンドリア酸素消費量の変化

- A) 酸素消費量の経時変化。各試薬の投与タイミングを矢印で示す。
 O: オリゴマイシン, F: FCCP, R & A: ロテノンとアンチマイシン。
- B) 最大呼吸能。

4. 考察

本課題では高 NaCl ストレス刺激が心筋細胞に及ぼす影響を超硫黄代謝とミトコンドリア品質の観点から検証した。報告者はこれまでに、低酸素ストレスや環境親電子物

質曝露ストレスでは心筋ミトコンドリアの膜電位低下を起点に超硫黄異化反応が促進されることで Drp1-Filamin 複合体が形成され、ミトコンドリアの過剰分裂を介してエネルギー産生能が低下し、これが心機能低下の要因となることを

これまでに報告してきた^{2,3,4)}。食塩過剰摂取も心疾患リスクの要因となることから同様のメカニズムが起こるかを検証したところ、超硫黄代謝に関してはミトコンドリア膜電位が過分極し、超硫黄同化の方にバランスがシフトしていた。また、Drp1-Filamin 複合体形成とミトコンドリア形態には影響は出なかったがミトコンドリアのエネルギー産生能は低下していた。以上の結果から考えて、Drp1-Filamin 複合体形成によるミトコンドリア過剰分裂とは別の機序でエネルギー産生能が阻害されていると予想された。アフリカミドリザル腎臓上皮細胞 (Vero) やマウス髄質内集合管細胞 (mIMCD-3) では高 NaCl 処置によって早期にミトコンドリアの過剰分裂と膜電位低下が起き、シトクロム c の放出を介して細胞死が誘導される^{12,13)}。今回の実験系では高 NaCl 刺激を 18 時間行っても明確な細胞死は確認されなかったことから、細胞の生存に関わるような激しいストレスにはなっておらず、ミトコンドリア形態に対する応答も先行論文とは異なっていたことが考えられる。

マクロファージでは、高 NaCl ストレスにより細胞内に Na⁺ が取り込まれることがミトコンドリア呼吸鎖複合体の複合体 II 活性阻害、膜電位低下、ATP 産生低下を引き起こし、これがマクロファージの細菌殺傷能力を変化させることが知られている¹⁴⁾。一方、心筋細胞では高 NaCl 刺激だけでなく、高ソルビトール刺激でも同様のミトコンドリア膜電位の変化が見られたことから、Na⁺ ではなく浸透圧変化がミトコンドリア膜電位の変化に重要だと考えられる。しかしながら、超硫黄代謝やミトコンドリア形態、酸素消費量に対する高 NaCl 刺激の効果に関しても浸透圧変化に依存しているかは今後ソルビトール刺激で詳しく検証していく必要がある。

5. 今後の課題

心筋細胞への高 NaCl 刺激はミトコンドリアでのエネルギー産生能の低下を引き起こしたが、仲介するメカニズムは報告書がこれまでに低酸素ストレスや環境親電子曝露ストレスで示してきたものとは大きく異なっていた。そこで、そのメカニズムを明らかにすることが今後の課題である。高 NaCl 刺激によるミトコンドリア膜電位の上昇は浸透圧上昇によるものと予想されたが、近年、ミトコンドリア内膜を介した Na⁺ 勾配が H⁺ 勾配と同様に電子伝達系での ATP 産生を駆動する力になることが明らかにされている¹⁵⁾。そこで、Na⁺ の影響についてもより詳細な解析が今後求められる。

心機能を低下させる多くのストレスが超硫黄異化/同化バランスを異化方向にシフトさせるのに対して、高 NaCl 刺激は同化方向にシフトさせた。硫化水素から超硫黄分子への同化反応は SQOR によって制御されると考えられているので、Na⁺ が SQOR の発現や活性に与える影響についても今後検討を行っていく。

超硫黄代謝は心臓だけでなく様々な細胞や組織において重要な機能を担うことが近年明らかになりつつある⁶⁾。高 NaCl 刺激による超硫黄同化とそれが心筋細胞の機能に与える影響をより詳細に検証していくことで、生体の恒常性維持と疾患発症における超硫黄代謝の重要性がより明らかとなってくるだろう。

6. 文献

1. Nishimura A, et al. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence. *Sci Signal* 11, (2018).
2. Nishimura A, et al. Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload. *Sci Signal* 12, (2019).
3. Nishimura A, et al. Supersulfide prevents cigarette smoke extract-induced mitochondria hyperfission and cardiomyocyte early senescence by inhibiting Drp1-filamin complex formation. *J Pharmacol Sci* 154, 127-135 (2024).
4. Nishimura A, et al. Polysulfur-based bulking of dynamin-related protein 1 prevents ischemic sulfide catabolism and heart failure in mice. *Nat Commun* 16, 276 (2025).
5. Akaike T, et al. CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8, 1177 (2017).
6. Barayeu U, Sawa T, Nishida M, Wei FY, Motohashi H, Akaike T. Supersulfide biology and translational medicine for disease control. *Br J Pharmacol*, (2023).
7. Gupta D, et al. Dietary sodium intake in heart failure. *Circulation* 126, 479-485 (2012).
8. Hasan P, et al. Mitochondrial fission protein, dynamin-related protein 1, contributes to the promotion of

- hypertensive cardiac hypertrophy and fibrosis in Dahl-salt sensitive rats. *J Mol Cell Cardiol* 121, 103-106 (2018).
9. Ryuno H, et al. HES1 potentiates high salt stress response as an enhancer of NFAT5-DNA binding. *Commun Biol* 7, 1290 (2024).
 10. Ikizawa T, et al. Mitochondria directly sense osmotic stress to trigger rapid metabolic remodeling via regulation of pyruvate dehydrogenase phosphorylation. *J Biol Chem* 299, 102837 (2023).
 11. Nishimura A, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma-irradiated cysteine protects cardiac ischemia/reperfusion injury by preserving supersulfides. *Redox Biol* 79, 103445 (2025).
 12. Copp J, Wiley S, Ward MW, van der Geer P. Hypertonic shock inhibits growth factor receptor signaling, induces caspase-3 activation, and causes reversible fragmentation of the mitochondrial network. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C403-415 (2005).
 13. Michea L, Combs C, Andrews P, Dmitrieva N, Burg MB. Mitochondrial dysfunction is an early event in high-NaCl-induced apoptosis of mIMCD3 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F981-990 (2002).
 14. Geisberger S, et al. Salt Transiently Inhibits Mitochondrial Energetics in Mononuclear Phagocytes. *Circulation* 144, 144-158 (2021).
 15. Hernansanz-Agustin P, et al. A transmitochondrial sodium gradient controls membrane potential in mammalian mitochondria. *Cell* 187, 6599-6613 e6521 (2024).

The Role of Cardiac Mitochondrial Quality in the Increased Risk of Cardiac Diseases Due to Excessive Salt Intake

Akiyuki Nishimura^{1,2}

¹Division of Cardiocirculatory Signaling, National Institute for Physiological Sciences,

²Cardiocirculatory Dynamism Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems

Summary

Quality of mitochondria plays a vital role in maintaining cellular homeostasis. The author has previously demonstrated that excessive mitochondrial fission in cardiomyocytes, triggered by ischemic stress or environmental electrophiles, contributes to cardiac dysfunction. This abnormal fission is mediated by the formation of a pathological complex between the mitochondrial fission protein Drp1 and the actin-binding protein Filamin. Furthermore, it was revealed that supersulfides which is highly reactive sulfur metabolites, regulate the Drp1-Filamin complex formation. A decrease in supersulfide levels induced by ischemia facilitates the formation of the Drp1-Filamin complex, leading to mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes.

While the importance of salt restriction in heart failure patients is well recognized, the specific mechanisms by which high salt intake directly impairs cardiac contraction and relaxation remain unclear. However, morphological abnormalities in cardiac mitochondria have been observed in salt-sensitive hypertensive rats, suggesting a potential link between salt intake and mitochondrial quality impairment.

In this study, the effect of high salt stress on mitochondrial quality and function was investigated, focusing on the regulation of the Drp1-Filamin complex via supersulfide metabolism. Under hypoxia, cardiomyocytes exhibited mitochondrial membrane depolarization, which promoted a catabolic shift from supersulfides to hydrogen sulfide. In contrast, treatment with high-NaCl media induced mitochondrial membrane hyperpolarization, favoring the anabolic conversion from hydrogen sulfide to supersulfides. Similar changes were observed when cells were exposed to sorbitol-containing media with equivalent osmolarity, indicating that hyperosmotic stress was the driving factor.

Interestingly, high-NaCl treatment did not affect the formation of the Drp1-Filamin complex or alter mitochondrial morphology. However, mitochondrial energy production was impaired, suggesting that hyperosmotic stress modulates mitochondrial function through mechanisms distinct from those involved in hypoxic stress. Elucidating these unique pathways of mitochondrial regulation under high-salt conditions remains an important direction for future research.