

学位論文題名

ラット膵島B細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構における
 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究では、ラット膵島B細胞において、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体が静止時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節に関与しているかどうか、および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の reverse mode を介する Ca^{2+} 流入がぶどう糖によって引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に関与しているかどうかを検討する目的で、1) 静止時の $[\text{Na}^+]_o$ 低下による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動に対する各種阻害薬の効果、2) 膵島B細胞が活性化された条件下で引き起こされた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動に対する KB-R7943 の効果を観察することにより、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節機構への寄与を検討した。

$[\text{Na}^+]_o$ を低下させると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされ、 $[\text{Na}^+]_o$ 低下の程度に依存して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の最大値は大きくなった。また、 Ca^{2+}_o を除去すると、 Na^+_o 除去による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は抑制された。加えて、 Ca^{2+} 流入を抑制する Ni^{2+} 存在下で、 Na^+_o 除去による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は Ni^{2+} 濃度依存性に抑制された。しかし、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの阻害薬であるニフェジピン、あるいは受容体介在性 Ca^{2+} チャネルをも阻害する SK&F 96365 存在下で、 Na^+_o 除去による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は影響されなかった。 Na^+, K^+ -ATPase の特異的な阻害薬であるウアバイン存在下では、 Na^+_o 除去による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の振幅は、コントロールの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の振幅と比べて有意に増強された。

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割を定量的に解析するために、 Ca^{2+} ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$) および Na^+ ($\Delta\mu\text{Na}^+$) の電気化学的勾配を算出したところ、それぞれ 39.1 および 12.8 kJ/mol となった。また、 $[\text{Na}^+]_o$ と Ca^{2+} 流入の正味の駆動力 ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+} - 3 \Delta\mu\text{Na}^+$) との間には負の直線関係が、異なる $[\text{Na}^+]_o$ で測定した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の最大値とそれぞれの $[\text{Na}^+]_o$ で計算した $\Delta\mu\text{Ca}^{2+} - 3 \Delta\mu\text{Na}^+$ との間には正の直線関係が認められた。

高濃度ぶどう糖による 2 相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第 2 相目で Na^+_o を除去すると、3 mM ぶどう糖存在下での反応とは異なり、一過性に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が減少した後、通常の持続的なレベルまで回復した。高濃度ぶどう糖存在下での Na^+_o 除去時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動の最大値は、3 mM ぶどう糖存在下での最大値よりも有意に小さかった。

Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体活性に対する膜電位の効果を検討するために、100 mM K⁺ および 3 mM ぶどう糖を含む溶液で引き起こされる脱分極条件下で、Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 変動を調べた。高濃度 K⁺ 条件下での Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇の振幅は、通常濃度 K⁺ 条件下での Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇の振幅よりも有意に小さかった。しかし、高濃度 K⁺ のみによる持続的な [Ca²⁺]_i 上昇はニフェジピンによって阻害されないことから、この条件下では Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体が [Ca²⁺]_i 上昇に関与している可能性があり、これにより振幅に差が生じるものと思われる。したがって、高濃度 K⁺ 条件下での Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇における Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体の reverse mode の寄与を、高濃度 K⁺ 単独による [Ca²⁺]_i 上昇と Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇両者の成分を合わせて観察するために、Na_o⁺ 除去前に Ca_o²⁺ を取り除いて [Ca²⁺]_i 変動を記録した。Na_o⁺ 除去溶液に Ca_o²⁺ を再導入すると、通常濃度 K⁺ 条件下で観察されたような [Ca²⁺]_i 上昇反応が引き起こされた。Na_o⁺ 除去時の [Ca²⁺]_i の最大値および Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇の振幅は [K⁺]_o が上昇すると有意に増加した。

Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇に対する Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体の寄与の膜電位依存性を評価するために、Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体の reverse mode の阻害薬である KB-R7943 存在下で実験を行った。高濃度 K⁺ 条件下で、Na_o⁺ 除去後の Ca_o²⁺ 再導入による [Ca²⁺]_i 上昇は KB-R7943 によって抑制された。KB-R7943 非存在下での Na_o⁺ 除去による [Ca²⁺]_i 上昇量 ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) は、高濃度 K⁺ 溶液で有意に増大した。一方、KB-R7943 存在下での $\Delta[Ca^{2+}]_i$ は、[K⁺]_o を増加させても有意な変化は認められなかった。前者から後者を差し引いて得られた正味の $\Delta[Ca^{2+}]_i$ は、[K⁺]_o が上昇すると有意に増大した。

KB-R7943 存在下で、ぶどう糖濃度を増加させると KB-R7943 非存在下の際と同様の [Ca²⁺]_i 変動が引き起こされたが、1 相目より後の $\Delta[Ca^{2+}]_i$ が KB-R7943 非存在下における $\Delta[Ca^{2+}]_i$ に比べて有意に減少した。

以上の結果、ラット臍島では、[Na⁺]_o 低下によって引き起こされる [Ca²⁺]_i 上昇は Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体を介する Ca²⁺ 流入によるものである。Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体は静止時の [Ca²⁺]_i 維持に重要な役割を果たしている。また、Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体の reverse mode の活性は脱分極時に増強される。Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体を介する Ca²⁺ 流入はおそらくぶどう糖によって引き起こされる [Ca²⁺]_i 変動に部分的に関与していると結論付けられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 助 教 授 石 川 透

学 位 論 文 題 名

ラット臍島B細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構における $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割に関する研究

電解質輸送担体のひとつである $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体は、細胞内外の Na^{+} 濃度勾配と電氣的勾配を駆動力として、 Na^{+} と Ca^{2+} をお互いに逆方向に輸送するイオンキャリアーであり、forward modeとreverse modeによって細胞内の Ca^{2+} 濃度調節を行っている。この交換輸送体の臍島B細胞における役割を明らかにするために、細胞生理学的研究を行った。細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を経時的にモニターしながら細胞外のイオン組成を人工的に変化させ、また各種の阻害薬、特にKB-R7943という新たに開発された特異性の高い $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体阻害薬を用いて検討を行った。得られた知見は以下に要約される。

1) 遊離ラット臍島細胞標本を用い、灌流液の Na^{+} 濃度を低下させると、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。この上昇は、細胞外 Ca^{2+} の除去あるいは Ni^{2+} 添加で消失または低下したが、L型カルシウムチャネル阻害薬のニフェジピンと受容体介在性カルシウムチャネル阻害薬のSK&F96365は無効であった。ウワバインを添加して細胞内 Na^{+} 濃度を上げ、reverse modeの駆動力を増加させると、細胞外 Na^{+} 濃度低下による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が促進された。さらに、KB-R7943は細胞外 Na^{+} 濃度低下によって惹起される Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。以上の結果は、臍島B細胞に $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体が存在していることを示唆するものである。

2) 細胞外 Na^{+} 濃度の低下と Ca^{2+} 濃度上昇の定量関係について解析を行ったところ、非分泌時（非刺激時）における Ca^{2+} の流れがもっぱらこの輸送体を介して行われているとすれば、そのstoichiometryは $3\text{Na}^{+}:1\text{Ca}^{2+}$ であると結論された。

3) ぶどう糖刺激時に認められる細胞内 Ca^{2+} 濃度の二相性変動のうち、KB-R7943は一相目にたいしては無効であったが、二相目の Ca^{2+} 濃度上昇を有意に抑制した。この結果は、二相目の細胞内 Ca^{2+} 濃度変動のメカニズムに、 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体が一部関与していることを示唆する。

4) $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体のreverse modeの活性あるいは数が、細胞膜電位変化に影響され、脱分極時、すなわちぶどう糖刺激時に亢進あるいは増加することが示唆された。

以上の知見から、豚島B細胞の細胞内Ca²⁺濃度制御機構にNa⁺/Ca²⁺交換輸送体が寄与していると結論した。これらの成果は、豚島B細胞の細胞内イオン濃度制御機構にたいして新たな視点を提供するものである。よって、審査員一同は、吉橋一隆氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分であると認めた。