Osaka University Knowledge Archive

Title	神経細胞内Ca2+濃度調節におけるNa+ーCa2+交換系の役割に関する研究
Author(s)	浅野, 省一
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40529
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

氏　　名	浅　野　省　一（あさ の しょう いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　13795　号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学　位　論　文　名	**神経細胞内 Ca^{2+} 調節における $Na^{+}-Ca^{2+}$ 交換系の役割に関する研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　馬場　明道 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　溝口　　正　　教　授　東　　純一

論　文　内　容　の　要　旨

細胞内 Ca^{2+} イオンは，細胞内情報伝達系の重要なシグナル物質として分化，増殖，神経可塑性，伝達物質の遊離など種々の生理反応に関与し，またその過度の濃度上昇は細胞毒性を示す。したがって，細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の調節機構を解明することは細胞のさまざまな機能発現を理解するうえで重要であると考えられる。一般に，静止時 $[Ca^{2+}]_i$ は約100nMで，この維持，また，刺激時の急激な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に，小胞体，ミトコンドリア等の Ca^{2+} 貯蔵系，及び細胞膜 Ca^{2+} 輸送系が重要な役割をはたしていると考えられている。

$Na^{+}-Ca^{2+}$ 交換系（NCX）は Na^{+} と Ca^{2+} 逆方向に輸送するアンチポーターで，Na^{+} 3分子に対し Ca^{2+} 1分子を輸送するため起電的であり，その活性は Na^{+} および Ca^{2+} の細胞膜を隔てた電気化学ポテンシャルに依存している。その結果NCXは静止状態で Ca^{2+} をくみ出す順モードで働いているが，細胞内 Na^{+} の増加あるいは脱分極等の条件下では Ca^{2+} 流入を引き起こす逆モードに反転すると考えられている。

中枢神経系NCXの研究は心筋，平滑筋などと比べ進んでおらず，特に神経細胞での知見はほとんど得られていない。本研究においては神経細胞NCXの生理的，病態的意義を明らかにすることを目的とし，神経標品を用いたNCXの存在，活性について検討した。

中枢神経系におけるNCXの存在は非常に少なく，また，現在各アイソフォーム特異的抗体が現在のところ得られないことから，competitive RT－PCR法によりNCX各アイソフォームmRNAの存在を検討した。その結果，培養神経細胞，アストロサイトとも3種のアイソフォームが存在しており，培養神経細胞ではNCX 1，NCX 2が多く，培養アストロサイトではNCX 1が多く存在していることが明らかとなった。また，この神経細胞におけるNCX 1の存在は免疫学的検討により神経細胞に存在していることを明らかにした。

次いでこれらの活性の性質，調節について検討を行った。NCX活性は細胞内に Na^{+} を蓄積する薬物を細胞に処置することでNCX逆モード活性を $^{45}Ca^{2+}$ 取り込みあるいは細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定することで観察した。Na, K－ATPase阻害薬ウアバイン，Na^{+} イオノフォアモネンシンは細胞内に Na^{+} を蓄積すると考えられ，神経細胞においてはこれら薬物処置により $[Ca^{2+}]_i$ 及び $^{45}Ca^{2+}$ 取り込みは増大した。この $[Ca^{2+}]_i$ 増加及び $^{45}Ca^{2+}$ 取り込み促進作用はNCXの選択的阻害薬のNo.7943（2－（2－（4－（4－nitrobenzyloxy）phenyl）ethyl）isothiourea）で抑制した。また，ウアバイン，モネンシン単独ではアストロサイトにおいて $[Ca^{2+}]_i$ の増加，$^{45}Ca^{2+}$ 取り込み促進作用は見られなかった。つまり，神経細胞とアストロサイトでNCX活性の性質に違いがあることが考えられた。な

お，この違いは神経細胞をテトロドトキシン処置することでモネンシンによる $[Ca^{2+}]_i$ レスポンスを減弱させることから神経細胞の興奮性に起因している可能性が考えられた。

活性調節に関しては，血管平滑筋については一酸化窒素（NO）－ cyclic GMP 系が NCX を活性化することが知られているので，神経細胞 NCX の活性調節機構について NO － cyclic GMP 系の関与について検討を行い，NO － cyclic GMP 系がGキナーゼ非依存的に活性化することを示した。

さらに NCX の生理的，病態的意義について検討した。生理的意義に関しては興奮性の伝達に NCX が関与しているかどうか検討を行った。高カリウム刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加の一部は№7943に感受性であり，また，この№7943に感受性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加はテトロドトキシン処置により消失した。また，興奮性後シナプス電位を発生させるグルタミン酸と，そのイオノトロピック受容体アゴニスト刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も№7943により一部抑制することが明らかとなった。ところで，細胞内に流入した Ca^{2+} は神経伝達物質に遊離を引き起こすことが考えられるので次に神経伝達物質遊離実験を行った。高 K^+ 等で刺激した際のセロトニン遊離に対し，3，4 － dichlorobenzamil は抑制作用を示し，神経細胞の興奮と，伝達物質遊離に NCX 逆モードを介した Ca^{2+} 流入が関与していることが考えられた。NCX と病態との関りについてはグルタミン酸による神経細胞死に対し NCX の阻害薬が有効であるかどうか検討を行った。しかし№7943はグルタミン酸による細胞死に対し保護作用を示さなかった。この理由として，処置時間の違いに起因する可能性が考えられる。また，他に $[Ca^{2+}]_i$ が細胞死に関っている現象として血清除去あるいは NO による神経細胞死があげられる。これらの細胞死の一部は内因性グルタミン酸によるものであることが知られている。NO，血清除去の細胞死に対し，№7943は保護作用を示したことから，グルタミン酸の放出あるいはグルタミン酸による興奮のいずれかに NCX が関与しているものと考えられた。

以上まとめると，本研究において神経細胞 NCX の存在，活性及び活性制御機構について，また NCX 逆モードを介した Ca^{2+} 流入が神経細胞の興奮，伝達物質の遊離，神経細胞死に関与していることを明らかにした。当研究室においてはすでに虚血再灌流障害モデルの一つである Ca^{2+} パラドックス障害が培養アストロサイトでおきること，この障害に NCX 逆モードを介した Ca^{2+} 流入が関与していることを明らかにしている。本研究はこれらの成績とともに，中枢 NCX が創薬のターゲット分子となる可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

$Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系は，膜を隔てた Na^+ の濃度勾配により Ca^{2+} を輸送するアンチポーターであり，心筋，平滑筋細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度調節における $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の役割が報告されている。しかしながら，中枢神経系 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系に関しては細胞レベルでの解析は少なく，本分子の生理的，病態的意義は不明である。

申請者は，細胞内情報伝達物質のひとつである Ca^{2+} が細胞の生理，病態に深く関与していることから，神経細胞内 Ca^{2+} 濃度調節における $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の役割を主に培養神経細胞を用い追究した。まず，神経細胞 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の存在，活性を検討する方法論を確立した。そして，神経細胞 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系がアイソフォームレベル，Na^+ 感受性の点でアストロサイトと異なっていることを明らかにした。これらの知見は神経細胞 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系と膜興奮性との密接な関連を示唆している。さらに，これらの成績を基に，$Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の神経伝達物質遊離，そして Ca^{2+} 依存性細胞障害への関与を検討し，神経細胞 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の生理的，病態的意義を明らかにした。

これらの成績は，$Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の創薬ターゲット分子としての可能性を示したことで評価され，薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。