



Title	Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体の内在性カチオン制御部位の生理的役割に関する研究
Author(s)	潘, 焰
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41671
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	はん 潘 えん 焰
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体の内在性カチオン制御部位の生理的役割に関する研究 (Physiological roles of the regulation of the Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger by intracellular cations)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡本 光弘 (副査) 教 授 重川 宗一 教 授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

細胞膜に発現する Na⁺/Ca²⁺ 交換体 (NCX) は、3 個の Na⁺ と 1 個の Ca²⁺ をイオン濃度勾配及び膜電位に依存して可逆的に交換輸送する重要な細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 調節系である。NCX は通常、さまざまな刺激時に増加した細胞内 Ca²⁺ を細胞外へ汲み出す輸送系として機能するが、虚血再灌流時などのように、細胞内 Na⁺ 濃度が増加し膜電位が上昇するような状況下では、逆に Ca²⁺ を流入させることも知られている。電気生理学的な研究から、心筋において豊富に発現する I 型交換体 (NCX 1) は輸送基質でもある細胞内 Ca²⁺ と Na⁺ により活性制御されることが報告されている。NCX 1 分子の細胞質内ドメインに存在する Ca²⁺ 制御部位にサブ μ M オーダー ($K_d = \sim 0.3 \mu$ M) の Ca²⁺ が作用すると NCX 1 はスイッチオンされ (Ca²⁺ 依存性活性化)、また細胞内 Na⁺ 濃度が増加すると不活性化機構が亢進する (Na⁺ 依存性不活性化)。しかし、これら細胞内カチオンによる活性制御が intact な細胞においてどのような生理的役割をもつか未だ明確になっていない。そこで本研究では、カチオン制御部位に変異を導入した NCX 1 cDNA を細胞系に発現させ、[Ca²⁺]_i 調節における NCX 1 のカチオン制御系の役割について検討を行った。

【方法】

イヌ心筋の NCX 1 cDNA に部位特異的変異法を用いて変異を導入し、Ca²⁺ 制御部位を低親和性 ($K_d = \sim 1 \mu$ M) にさせた変異型 NCX 1 (Ca-mutant)、Na⁺ 依存性不活性化を示さない変異型 NCX 1 (Na-mutant) 及び細胞内ドメインを欠損させた変異型 NCX 1 (Δ -mutant) を作成した。リン酸カルシウム法を用いて、これら変異型 NCX 1 及び野生型 NCX 1 cDNA を CCL39 線維芽細胞に安定に高発現させ、得られた発現細胞の交換輸送特性、[Ca²⁺]_i 及び細胞特性の変化の詳細な比較を行った。

【結果】

得られた発現細胞の交換体の発現量を比較したところ、Ca-mutant は野生型 NCX 1 とほぼ同程度の発現、Na-mutant 及び Δ -mutant は 30-50% の発現を示した。この発現量比は ⁴⁵Ca²⁺ 取り込みで測定した交換輸送活性とほぼ相関していた。そこで、これら発現細胞をトロンビンで刺激し、その際に起こる [Ca²⁺]_i 変化を測定して検討したところ、3 種類の変異交換体のうち Ca-mutant では細胞外 Na⁺ 依存性 Ca²⁺ 汲み出し活性が野生型 NCX 1 に比べ

て著明に低下していることを見出した。また、細胞内 Na^+ 負荷による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加反応を調べてみると、野生型 NCX 1 及び Ca-mutant では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過性に増加するのに対して、Na-mutant 及び Δ -mutant では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は持続的に増加した。外向き交換電流を測定すると、前者は Na^+ 依存性不活性化を示す交換体であり、後者は Na^+ 依存性不活性化を示さない交換体であった。興味深いことに、後者の細胞では、前者と異なって持続的な細胞内 Na^+ 負荷により細胞死が起こることが明らかになった。

【総括】

本研究では、NCX 1 に関わる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節において内在性カチオン制御系がどのような役割を有するか検討した。 Ca^{2+} 制御部位が低親和性になった変異型 NCX 1 (Ca-mutant) 発現細胞では、トロロンビンなどの生理的刺激でおこる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient の際に細胞外 Na^+ 依存性 Ca^{2+} 汲み出し活性が顕著に低下すること、また Na^+ 依存性不活性化を持たない変異型 NCX 1 (Na-mutant, Δ -mutant) 発現細胞では、生理的な培養条件下 ouabain 処理によって Ca^{2+} 過剰負荷が誘起され細胞死が引き起こされることが示された。これらの結果は、 Ca^{2+} 依存性活性化機構は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加時に NCX 1 による Ca^{2+} 汲み出しを起動するスイッチとして、また Na^+ 依存性不活性化機構は細胞内に Na^+ が負荷された異常時に NCX 1 を介する Ca^{2+} 過剰負荷を抑制する仕組みとして役割を持つ可能性を示唆する。これら内在性カチオン制御系は、NCX 1 が様々な細胞環境に応じて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を恒常的に調節していくための重要な制御系であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

心筋 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX 1) は輸送基質でもある細胞内 Ca^{2+} と Na^+ により活性制御されるが、intact な細胞における生理的、病態的意義については未だ明確になっていない。本研究は、カチオン制御部位に変異を導入した NCX 1 cDNA を細胞系に発現させ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節における NCX 1 カチオン制御系の役割について検討したものである。 Ca^{2+} 制御部位が低親和性になった変異型 NCX 1 発現細胞では、トロロンビンなどの生理的刺激でおこる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient の際に細胞外 Na^+ 依存性 Ca^{2+} 汲み出し活性が顕著に低下すること、また Na^+ 依存性不活性化を持たない変異型 NCX 1 発現細胞では、生理的な培養条件下 ouabain 処理によって Ca^{2+} 過剰負荷が誘起され細胞死が引き起こされることが示された。これらの結果は、 Ca^{2+} 依存性活性化機構は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加時に NCX 1 による Ca^{2+} 汲み出しを起動するスイッチとして、また Na^+ 依存性不活性化機構は細胞内に Na^+ が負荷された異常時に NCX 1 を介する Ca^{2+} 過剰負荷を抑制する仕組みとして役割を持つ可能性を示唆する。この研究は、内在性カチオン制御系が NCX 1 が様々な細胞環境の変化に対応して、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を調節するための重要な制御系であることを示唆するもので、学位の授与に値すると考えられる。