



The importance of glycolytically-derived ATP for the regulation of Na⁺/H⁺ exchange activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉山, 志保 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1143

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 290号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	杉山志保		
論文題目	The importance of glycolytically-derived ATP for the regulation of Na ⁺ /H ⁺ exchange activity (Na ⁺ /H ⁺ 交換活性の調節における解糖系由来のATPの重要性)		

博士(医学) 杉山志保

論文題目

The importance of glycolytically-derived ATP for the regulation of Na^+/H^+ exchange activity

(Na^+/H^+ 交換活性の調節における解糖系由来のATPの重要性)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

心筋細胞において、 Na^+/H^+ 交換は細胞内アシドーシスからの細胞内pH (pHi) の回復過程に重要であり、細胞内への Na^+ 取り込みの主要経路の一つである。細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) の増加は、虚血/再灌流障害の原因の一つである細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の過負荷を引き起こす。 Na^+/H^+ 交換の調節機構の一つにATPの関与が報告されているが、詳しい調節機構は依然不明である。今回我々は、単一心室筋細胞を用いて、 Na^+/H^+ 交換機構の調節における解糖系由来のATPの重要性について検討した。

〔材料ならびに方法〕

酵素法を用いてモルモット単一心室筋細胞を分離した後、pHiの測定には2'-7'-bis (carboxyl) -5', 6'-carboxyfluorescein / acetoxymethyl ester (BCECF / AM) ($0.5 \mu\text{M}$) を、 $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定には各々sodium-benzofuran isophthalate (SBFI) / AM ($5 \mu\text{M}$)、fura-2 / AM ($5 \mu\text{M}$) を負荷した。細胞内ATP濃度 ($[\text{ATP}]_i$) は、mag-fura-2 / AM ($5 \mu\text{M}$) により測定した細胞内 Mg^{2+} 濃度 ($[\text{Mg}^{2+}]_i$) から推測した。細胞内への酸負荷にはアンモニアプレバルス法を用いた ($15\text{mM NH}_4\text{Cl}$: 5分間)。 Na^+/H^+ 交換活性の定量的評価には、細胞内アシドーシスからのpHiの回復速度と H^+ の緩衝能 (intrinsic H^+ buffering power : β) から酸排出率 (net acid efflux : JH) を算出した。解糖系阻害には 20mM の2-deoxyglucoseを含む無グルコースHEPES溶液を(2-DG群)、酸化的リン酸化阻害には 2mM のsodium cyanideを含む 10mM グルコースHEPES溶液を灌流した (CN群)。

〔結果〕

- (1) アンモニアプレバルス法による細胞内アシドーシスからのpHiの回復過程において、コントロールHEPES溶液の灌流 (Cont群) では NH_4Cl 投与によりpHiは 7.12 ± 0.03 から 7.47 ± 0.08 に上昇し、 NH_4Cl 除去により急速に 6.60 ± 0.06 に低下した。その後pHiは急速に回復し、プレバルス開始10分後のpHiは 6.94 ± 0.13 であった。一方 Na^+/H^+ 交換の選択的阻害剤である $1 \mu\text{M}$ hexamethylene amiloride (HMA群) 存在下では、プレバルス開始10分後のpHiは 6.54 ± 0.02 であり、Cont群と比較してpHiの回復は有意に抑制された ($p < 0.001$)。この結果より細胞内アシドーシスからのpHiの回復には、 Na^+/H^+ 交換が働くことが示された。
- (2) アンモニアプレバルス法による細胞内アシドーシスからのpHiの回復過程は、CN群ではCont群と同様の結果であったが、2-DG群では有意に低下した ($p < 0.001$)。 β には有意差を認めなかった (Cont : $37.5 \pm 4.3\text{mM}$, CN : $31.5 \pm 6.2\text{mM}$, 2-DG : $40.0 \pm 5.3\text{mM}$)。 JHはCont群とCN群の間に差を認めなかったが (Cont : $6.30 \pm 2.55\text{mM} / \text{min}$, CN : $4.55 \pm 0.79\text{mM} / \text{min}$)、2-DG群とHMA群では有意に低下した (2-DG : $0.29 \pm 0.21\text{mM} / \text{min}$, HMA : $0.42 \pm 0.14\text{mM} / \text{min}$, $p < 0.001$)。
- (3) Cont群では、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は灌流中変化しなかった (前 $0.95 \pm 0.13\text{mM}$, 60分後 $0.90 \pm 0.14\text{mM}$: $n=12$)

が、CN群では $[Mg^{2+}]_i$ は $2.19 \pm 0.37 \text{ mM}$ へと有意に上昇した ($p < 0.01$ vs. Cont, $n = 15$)。一方2-DG群では、 $[Mg^{2+}]_i$ は $1.32 \pm 0.12 \text{ mM}$ へとCont群に比し有意に上昇したが、その程度はCN群に比し有意に低かった ($p < 0.001$ vs. Cont, $n = 14$)。

- (4) 解糖系および酸化的リン酸化阻害中の $[Na^+]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_i$ には、Cont群とCN群及び2-DG群に有意差は認めなかった ($[Na^+]_i$; Count: $7.6 \pm 1.4 \text{ mM}$, CN: $7.5 \pm 1.3 \text{ mM}$, 2-DG: $8.2 \pm 1.7 \text{ mM}$) ($[Ca^{2+}]_i$; Cont: $88.9 \pm 12.2 \text{ nM}$, CN: $92.0 \pm 11.1 \text{ nM}$, 2-DG: $86.2 \pm 14.9 \text{ nM}$)。

〔考察〕

細胞内アシドーシスからのpHiの回復には Na^+/H^+ 交換が関与し、その活性は2-DG群でより抑制された。CN群と2-DG群における Na^+/H^+ 交換活性の差は、 $[ATP]_i$ 低下の程度による可能性があるが、 $[ATP]_i$ は2-DG群よりもCN群でより低かった。そのため解糖系阻害による Na^+/H^+ 交換活性の抑制は、ATPの総量ではなく、解糖系由来のATPの減少によることが示唆された。解糖系および酸化的リン酸化阻害により $[Na^+]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、二次的に Na^+/H^+ 交換活性が変化する可能性があるが、解糖系および酸化的リン酸化阻害時の $[Na^+]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_i$ の変化による二次的な影響は否定的であった。

〔結論〕

単一心室筋細胞において、 Na^+/H^+ 交換活性には解糖系由来のATPが必要である事が示された。今後、 Na^+/H^+ 交換活性の調節における構造的及び機能的な詳細な評価には更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞において、 Na^+/H^+ 交換はアシドーシスからの細胞内pH (pHi) の回復過程に重要である。この際に上昇する細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) は、虚血/再灌流障害の原因の1つとして考えられている細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の過負荷を引き起こす。

そこで申請者は Na^+/H^+ 交換の調節機構の一つであると考えられる解糖系由来ATPの重要性について検討した。モルモット単一心室筋細胞を用いて細胞内を酸性化し、そこからのpHiの回復過程を観察した。細胞内への酸負荷にはアンモニアプレバルス法を用いた。pHiの測定にはBCECF/AM ($0.5 \mu\text{M}$) を、 $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ の測定には各々SBFI/AM ($5 \mu\text{M}$)、fura-2/AM ($5 \mu\text{M}$) を用いた。 Na^+/H^+ 交換活性の定量的評価には、 H^+ の緩衝能と酸排出率を算出して評価した。

次に、 Na^+/H^+ 交換の調節機構に解糖系由来のATPが関与しているかを検討するために、解糖系阻害には20mMの2-deoxyglucose (2-DG) を含む無グルコースHEPES溶液を、酸化的リン酸化阻害には2mMのsodium cyanide (CN) を含む10mMグルコースHEPES溶液を灌流した。細胞内ATP濃度 ($[ATP]_i$) は、mag-fura-2/AM ($5 \mu\text{M}$) により細胞内 Mg^{2+} 濃度を測定することにより評価した。

これらの方法により、以下のような結果を得た。

- 1) 細胞内アシドーシスからのpHiの回復は Na^+/H^+ 交換機構により行われていた。
- 2) Na^+/H^+ 交換活性はCN処置では抑制されず、2-DG処置により抑制された。
- 3) $[ATP]_i$ は2-DG処置よりもCN処置でより低かった。
- 4) 解糖系および酸化的リン酸化阻害による $[Na^+]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_i$ の変化はなく、それらの阻害によ

る Na^+/H^+ 交換活性への二次的な影響はなかった。

これらの結果より、モルモット単一心室筋細胞において Na^+/H^+ 交換活性には解糖系由来 ATP が必要であることが示された。虚血/再灌流障害を予防するために、 Na^+/H^+ 交換活性の調節機構の解明は重要であると考えられた。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) モルモット単離心筋を用いた理由
- 2) 細胞内アシドーシスの作成法
- 3) ATPが Na^+/H^+ 交換を活性化する機構
- 4) 細胞内ATPの測定法
- 5) ATPのコンパートメント化の意義
- 6) 心収縮状態での Na^+/H^+ 交換の役割
- 7) アシドーシス時の心筋内 Na^+ 、 Ca^{2+} 濃度の変化
- 8) 他の解糖系抑制薬での検討
- 9) 酸化的リン酸化抑制によるNADPHの上昇による影響
- 10) Na^+/H^+ 交換系のアイソフォームと組織特異性
- 11) 本研究の臨床的意義

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士（医学）の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 梅村 和夫

副査 教授 数井 暉久 副査 助教授 上里 忠良