

氏名(本籍)	濱田 可奈子 (和歌山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第446号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Properties of the Na ⁺ /K ⁺ pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia (成熟ラット後根神経節小径神経細胞におけるNa ⁺ /K ⁺ ポンプ電流の特性)
審査委員	主査 教授 木村 宏 副査 教授 陣内 皓之祐 副査 教授 新井 良八

論文内容要旨

【目的】

Na⁺/K⁺ ATPaseはATP 1分子の加水分解により生じるエネルギーを用いて3分子のNa⁺を細胞外に排出し2分子のK⁺を細胞内へ取り込む能動ポンプであり、細胞容積の維持や細胞膜興奮性の賦与に密接に関わる細胞内外のNa⁺とK⁺の濃度勾配の形成に重要なはたらきをなしている。Na⁺/K⁺ ATPaseは $\alpha\beta$ サブユニットから構成され、ほ乳類においては α サブユニットには、4種類($\alpha 1$ - $\alpha 4$)の、 β サブユニットには3種類($\beta 1$ - $\beta 3$)のアイソフォームが存在し、これらのアイソフォームは種や組織により分布が異なっていることが報告されている(Blanco & Mercer, 1998)。

一方、後根神経節(DRG)神経細胞は一次求心性の感覚神経であり、筋肉や皮膚などの末梢組織の感覚に関与しており、細胞径の違いにより関与する感覚が異なることが示唆されている。これらの細胞には、Na⁺/K⁺ ATPaseの2つの異なったアイソザイム($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$)の存在が*in situ* hybridization法や免疫染色法により確認されている(Mata et al. 1991, Fink et al. 1995)。しかし、これらの2つのアイソザイムの機能を実際に膜電流(Na⁺/K⁺ポンプ電流)として検討した報告はほとんどない。また、神経機能の発現にはNa⁺/K⁺ ATPaseの活性が密接に関与しており、虚血や糖尿病などの病的状態では活性低下が言われている。

今回、痛覚発現に密接に関与しているDRG小径細胞のNa⁺/K⁺ポンプ電流の特性をwhole-cell patch-clamp法で測定・検討した。

【方法】

雄成熟ラット(8~14週齢)の腰椎(L4~6)からDRGを摘出し、神経細胞を酵素処理にて単離、初代培養し、単離後24~48時間以内に実験に用いた。Whole-cell patch-clamp法を用いて、細胞内にNa⁺(25 mM)を負荷した小径細胞(直径25 μ m以下)からウワバイン感受性電流としてNa⁺/K⁺ポンプ電量を測定した。

【結果】

ウワバインを細胞外に投与すると、Na⁺/K⁺ポンプによる外向き電流が抑制され、これにウワバインを取り除くことで速やかに元の値に戻った。細胞内にNa⁺100mMを負荷した細胞において、-10mVの保持電位から200msのテストパルスで+60~-100mVの範囲(10mVステップ)に与えた時、ウワバイン投与前後のいずれのテスト電位においても時間依存性の電流はほぼ完全に抑制された。Na⁺/K⁺ポンプ電流と電圧の関係は、膜電位の脱分極により増加し電位依存性を認めた。この電位依存性は、細胞内Na⁺濃度の違いにより異なった。細胞内Na⁺を30mMに固定し、ウワバイン

濃度を0.1 μ Mから5mMまで変化させると、ウバイン0.1 μ M投与より外向き電流は抑制され始め、1mMではほぼ完全に抑制された。ウバイン1mM投与時に抑制された電流量を1.0として標準化した Na^+/K^+ ポンプ電流のウバイン用量反応関係は、一つの成分で表すことが出来ず、以下の様な二つのHill式の和で表すことができた。

$$I = I_{\max.h} / (1 + (K_{d.h} / [\text{ouabain}])) + I_{\max.l} / (1 + (K_{d.l} / [\text{ouabain}]))$$

$I_{\max.h}$ と $I_{\max.l}$ はウバインの高感受性と低感受性 Na^+/K^+ ポンプ電流の抑制の比率をあらわし、それぞれ0.08と1.01であった。 $K_{d.h}$ と $K_{d.l}$ はウバインの高感受性、低感受性 Na^+/K^+ ポンプ電流の解離定数で、0.2 μ Mと140.1 μ Mであった。

また、電極内 Na^+ 濃度を変化させた場合、 Na^+ 濃度と Na^+/K^+ ポンプの電流密度の関係は下記の式で表すことができた。

$$I = I_{\max.h} / (1 + (K_{0.5h} / [\text{Na}^+]_i)^3) + I_{\max.l} / (1 + (K_{0.5l} / [\text{Na}^+]_i)^3)$$

$K_{0.5h}$ と $K_{0.5l}$ はそれぞれ細胞内 Na^+ の高親和性、低親和性の解離定数をあらわし6.7と67.6mMであった。 $I_{\max.h}$ と $I_{\max.l}$ はそれぞれ細胞内 Na^+ の高親和性、低親和性の最大の電流密度で、1.62と0.99 pApF1であった。

【考 察】

多くのほ乳類において、 Na^+/K^+ ATPaseの $\alpha 1\beta 1$ アイソザイムと比較して細胞内 Na^+ 親和性が高く、ウバインの感受性が低いことが報告されている (Blanco & Mercer, 1998)。

今回の実験において、 Na^+/K^+ ポンプ電流のウバイン用量反応関係は一つの成分で表すことができず二つのHill式の和で表すことができた。このことから、ラットDRG小径神経細胞にはウバイン感受性の異なるアイソザイムが存在すると考えられた。また、電極内 Na^+ 濃度依存性から、 Na^+ 親和性の高い成分と低い成分から構成されていることが示唆された。電極内 Na^+ 30mMの時、ウバインの低感受性成分と高感受性成分の比率は93.7で、一方 Na^+ の高親和性成分と低親和性成分の比率は95.5であった。これらの結果により、ラットDRG小径神経細胞には、 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ の二つの Na^+/K^+ ATPaseのアイソザイムが存在し、それらの性質及び分布密度により、生理的な細胞内 Na^+ 濃度下においては $\alpha 1\beta 1$ が主に働いているが、活動電位の繰り返し放電のような細胞内 Na^+ の上昇時において $\alpha 1\beta 1$ とともに $\alpha 3\beta 1$ が活性化されると考えられる。

【結 論】

ラットDRG小径細胞の痛覚発現には異なる2種類の Na^+/K^+ ATPaseアイソザイムにより調節されていると推測される。

学位論文審査の結果の要旨

ラット後根神経節にある第一次感覚神経細胞体のうち、初代培養で同定できた小型細胞に焦点をあて、 Na^+/K^+ ATPaseのサブユニット発現をパッチクランプ法により解析した。その結果、小型神経細胞にはウバイン感受性の異なる高低2種のアイソザイムが存在すること、またこれらのアイソザイムは Na^+ 親和性の異なる成分からなることが示唆された。すなわち、 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ の2種のアイソザイムが静止あるいは興奮という神経活動の状況に応じて動的変動し、痛覚制御機構の一端を担うものと考えられた。

本研究は、これまでの形態学的な研究を支持するばかりでなく、2つのアイソザイムの機能を膜電流の測定により初めて実証したものである。したがって、博士(医学)授与に値するものと判定した。

なお、最終試験は平成15年2月4日に実施し、合格と判定した。