

氏名	キム 金	ボン 鳳	ズ 柱
学位(専攻分野)	博士(医学)		
学位記番号	医博第3247号		
学位授与の日付	平成20年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻		
学位論文題目	Cytoplasmic Na ⁺ -dependent Modulation of Mitochondrial Ca ²⁺ via Electrogenic Mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ Exchange (心筋ミトコンドリアにおける起電性 Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換体による細胞質 Na ⁺ 依 存的な Ca ²⁺ 調節)		
論文調査委員	(主査) 教授 河野 憲二 教授 福田 和彦 教授 長澤 丘司		

論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリア内 Ca²⁺ (Ca²⁺_{mito}) は酸化的リン酸化の基質である NADH を産生する脱水素酵素を活性化することから、心筋の興奮収縮連関に必要な ATP 供給を調節する上で重要な役割を担うと考えられている。心筋ミトコンドリアにおいては、Ca²⁺は Ca²⁺ユニポータを介して主に流入し、Na⁺-Ca²⁺交換体 (NCX_{mito}) を介して主に排出され、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\phi_{\text{mito}}$) とミトコンドリア外の Ca²⁺ と Na⁺濃度が Ca²⁺_{mito} を規定する重要な因子である。しかし、NCX_{mito} の起電性及び膜電位依存性はまだ明らかにされていない。これを明らかにする目的で、サポニン透過性ラット心室筋細胞を用いて Ca²⁺_{mito} と $\Delta\phi_{\text{mito}}$ を、Rhod-2 と TMRE を用いてそれぞれ測定した。

無 Na⁺下に、300nM Ca²⁺液を灌流すると Rhod-2 蛍光は約 9 倍増加し、この増加は Ca²⁺ユニポータ抑制剤 (Ruthenium Red: RR) によりほぼ完全に抑制された。細胞質 Na⁺ (Na⁺_c) は Ca²⁺_{mito} 増加を抑制し、IC₅₀ は約 2mM であった。Na⁺_c の存在下に CGP-37157 (NCX_{mito} 阻害剤) を投与すると、Ca²⁺_{mito} はさらに増加した。これらの結果は、主に NCX_{mito} 順モードにより Ca²⁺_{mito} が排出されることを支持する。一方、同様の実験を FCCP (プロトンイオノフォア) 投与による脱分極状態で行うと Na⁺_c は Ca²⁺_{mito} 増加をより促進した (EC₅₀=約 4mM)。RR と Cyclosporin A (ミトコンドリア Permeability Transition Pore (PTP) の抑制剤) はこの Ca²⁺_{mito} 増加を抑制しなかったが、CGP-37157 により抑制された。脱分極状態では NCX_{mito} 逆モードにより Ca²⁺流入すると考えられる。これらの結果はミトコンドリア膜脱分極により NCX_{mito} 交換モードが順モードから逆モードに変わることを示す。

800nM Ca²⁺溶液でミトコンドリアに Ca²⁺を前負荷した後に、Na⁺_c 依存性 Ca²⁺排出 (順モード) の初速度を測定したところ、FCCP などによる脱分極は Ca²⁺排出の初速度を減少させた。しかし、300nM Ca²⁺溶液で前負荷した場合には、脱分極は初速度に影響しなかった。一方、RR で Ca²⁺ユニポータを抑制した状態で、600 nM Ca²⁺溶液を灌流しても、Ca²⁺_{mito} は上昇しなかったが、脱分極により Ca²⁺_{mito} は約 5 倍まで増加した。これらの結果は、順モード及び逆モードとも NCX_{mito} 活性が $\Delta\phi_{\text{mito}}$ に依存することを示す。

NCX_{mito} 活性が $\Delta\phi_{\text{mito}}$ に依存するならば、NCX_{mito} 活性に伴う電荷移動により、 $\Delta\phi_{\text{mito}}$ が変化すると予測された。実際、TMRE による測定で、順モードは $\Delta\phi_{\text{mito}}$ を脱分極し逆モードは過分極した。さらに、この $\Delta\phi_{\text{mito}}$ 変化は CGP-37157 により抑制された。この結果は NCX_{mito} が起電性であり、交換に伴い電荷が移動する事を示す。

実験データを基に作成した NCX_{mito} コンピュータモデルの解析から、NCX_{mito} の膜電位依存性は、ミトコンドリア内外の Na⁺・Ca²⁺濃度により変化する事が示唆された。また、脱分極時にミトコンドリア Na⁺透過性が増加することが、細胞質 Na⁺により逆モードが活性化される原因であると推測された。

以上の結果より、NCX_{mito} が膜電位依存性であることにより、Na⁺_c と $\Delta\phi_{\text{mito}}$ 変化を介して Ca²⁺_{mito} 濃度がダイナミックに調節されると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度 (Ca^{2+}_m) の調節に $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX_m) が寄与するが、 NCX_m の機能特性は未だに不明である。そこで、ラット心筋細胞ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度と膜電位変化を、それぞれ Rhod-2 と TMRE を用いて測定した。細胞質 Ca^{2+} (Ca^{2+}_c) や細胞質 Na^+ (Na^+_c) 濃度を変えて順モード NCX_m ($\text{Na}^+_c/\text{Ca}^{2+}_m$ 交換) を活性化するとミトコンドリア膜は脱分極し、逆モード ($\text{Na}^+_m/\text{Ca}^{2+}_c$ 交換) を活性化すると過分極した。正常膜電位でを投与すると、 Ca^{2+} ユニポータを介して Ca^{2+}_m が増加するが、同時に Na^+_c 濃度を増加すると、順モード NCX_m によって、この Ca^{2+}_m 増加は抑制された。一方、脱分極状態では、逆モード NCX_m を介して Ca^{2+} が流入し、 Na^+_c の増加は Ca^{2+} 増加を促進した。さらに、順モードによる Ca^{2+} 排出は脱分極により減少した。これらの結果から NCX_m は膜電位依存性であると結論した。今回得られた実験データを全て説明できる起電性 NCX_m モデルを開発することができた。以上の結果より、 NCX_m は膜電位依存性であり、これによって Na^+_c と膜電位変化を介して Ca^{2+}_m 濃度がダイナミックに調節されると結論された。以上の研究は、ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度の調節メカニズムの理解を促進し、心臓生理学に寄与するところが多い。

従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。