PI(4,5)P_2を介するNa/Ca交換活性制御における シグナル伝達機構の解明

課題番号 14570039

平成 １４年度～平成１５ 年度科学研究費補助金

（基盤研究(C)(2)） 研究成果報告書

平成１６年５月

京 都 大 学 図 書
1040946273
附 属 図 書 館

研究代表者

松岡　達

京都大学・医学研究科

研
03
1

PI(4,5)P_2を介するNa/Ca交換活性制御における
シグナル伝達機構の解明

課題番号 14570039

平成　１４年度～平成１５　年度科学研究費補助金

（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成１６年５月

研究代表者

松岡　達

京都大学・医学研究科

この冊子は平成　１４年度～平成１５　年度科学研究費補助金　（基盤研究(C)(2)）「$PI(4,5)P_2$を介するNa/Ca交換活性制御におけるシグナル伝達機構の解明」課題番号（14570039）の研究成果報告書である。

１．　研究組織

研究代表者

松岡　達　　京都大学　医学研究科　細胞機能制御学

研究協力者

野間昭典　　京都大学　医学研究科　細胞機能制御学

岩本隆宏　　国立循環器病センター　循環分子生理部

重川宗一　　国立循環器病センター　循環分子生理部

范　海天　　国立循環器病センター　循環分子生理部

城　日加里　　京都大学　医学研究科　細胞機能制御学　大学院生

林　雪　　京都大学　医学研究科　心臓血管外科　大学院生

２．　交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,400 千円	0	2,400 千円
平成 15 年度	1,100 千円	0	1,100 千円
総計	3,500 千円	0	3,500 千円

３． 研究発表

（１）学会誌等

1) Matsuoka S., Sarai N., Jo H. and Noma A. Simulation of ATP Metabolism in Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology in press.*

2) Powell T, Matsuoka S, Sarai N, Noma A. Intracellular Ca^{2+} dynamics and sarcomere length in single ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 2004. 35:535-542.

3) 野間昭典、松岡　達、皿井伸明 京都大学　細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト「数理時空間に生体活動を実現する」「現代医療」３６巻　印刷中　現代医療社刊

4) 柴山司, 西俊文, 皿井伸明, 松岡達, 天野晃, 松田哲也, 野間昭典　「オブジェクト指向に基づいた生体機能シミュレーションモデル構築環境」 電子情報通信学会技術研究報告(ME とバイオサイバネティックス) 2003 年　103 巻 81 号 23−28.

5) 野間昭典, 松岡達, 皿井伸明, 松田哲也, 天野晃　「イオンチャネルのバイオシミュレーション」分子心血管病　2003 年　4 巻 5 号 483−492

6) Matsuoka S, Sarai N, Kuratomi S, Ono K, Noma A. 2003. Role of individual ionic current systems in ventricular cells hypothesized by a model study. *Japanese Journal of Physiology.* 53:105-123.

7) Sarai N, Matsuoka S, Kuratomi S, Ono K, Noma A. 2003. Role of Individual Ionic Current Systems in the SA Node Hypothesized by a Model Study. *Japanese Journal of Physiology.* 53:125-134.

8) Kuratomi S, Matsuoka S, Sarai N, Powell T, Noma A. 2003 Involvement of Ca^{2+} buffering and Na^{+}/Ca^{2+} exchange in the positive staircase of contraction in guinea-pig ventricular myocytes. Pflugers Arch. 446:347-355.

9) Osaka M, Shinagawa Y, Matsuoka S, Noma A. 2003. Estimating the active dimension of cardiac pacemaking dynamics. PHYSICA D-NONLINEAR PHENOMENA 178 (1-2): 118-126.

10) Matsuoka S. 2002. Stoichiometry of the Na^{+}-Ca^{2+} exchanger: models & implications. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 976:121-132.

11) Sarai N, Kihara Y, Izumi T, Mitsuiye T, Matsuoka S and Noma A. 2002. Nonuniformity of sarcomere shortenings in the isolated rat ventricular myocyte *Japanese Journal of Physiology* 52: 371-381,

12) 松岡　達、2002、Na/Ca 交換輸送体の構造と機能　心臓 HEART 34:296-305.

（２）学会等での発表

1) 松岡　達　「創薬研究における細胞機能シミュレーション」第１２４回日本薬学会２００４年３月２９～３１日　大阪（ミニシンポジウム　若手が拓く新しい薬剤学：生命をシステムとしてみる薬剤開発）

2) Jo, H. Matsuoka, S. & Noma, A. Response of mitochondrial NADH in guinea-pig ventricular myocytes to increase in workload. Kyoto University International Symposium on "Leading Project for Biosimulation". February 27-28, 2004. Kyoto.

3) Jo, H. Matsuoka, S. & Noma, A. Simultaneous measurement of mitochondrial NADH and cell shortening in isolated guinea pig ventricular myocytes. 48th annual meeting of biophysical society, February 14-18, 2004.

Baltimore, Maryland.

4) Lin, X., Jo, H., & Matsuoka S. Ni^{2+} inhibits both Na-Ca exchange and cAMP-dependent Cl^- currents in guinea-pig ventricular cells. 48th annual meeting of biophysical society, February 14-18, 2004. Baltimore, Maryland.

5) Satoshi Matsuoka. Simulation of cardiac excitation-contraction-energy metabolism coupling. Kyoto University International Symposium on "Leading Project for Biosimulation". February 27-28, 2004. Kyoto (English)

6) Satoshi Matsuoka, Hikari Jo, Nobuaki Sarai, and Akinori Noma. Simulation of energy metabolism in cardiac excitation – contraction coupling. International symposium Cardiovascular Physiome: -integrative comprehension from molecule to organ-. December 5-7, 2003. Okayama.

7) 松岡　達　「医工連携による医療関連産業創出」～京都大学　細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト～　京都医療ビジネスフォーラム(「京都次世代医療研究会」設立記念シンポジウム)」２００３年１１月１１－１２日　京都（京都リサーチパーク）

8) 松岡　達　「コンピュータシミュレーションによる活動電位持続時間の交互変化（APD alternans）発生メカニズムの検討」　第２０回日本心電学会　２００３年９月８日・９日　東京（シンポジウム）

9) Satoshi Matsuoka, Nobuaki Sarai, Hikari Jo and Akinori Noma. Simulation of ATP Metabolism in Cardiac Excitation - Contraction Coupling Korean Biophysical Society Meeting 2003 June 20, Suwon, Korea. (Plenary Lecture)

10) 松岡　達　「Na^+-Ca^{2+}交換輸送体の活性制御」　第７６回日本薬理学会年会２００３年３月２４～２６日　福岡市　（シンポジウム）

11) 松岡　達「包括的心筋細胞モデル（Kyoto Model）の現状」京都大学医工連携シンポジウム２００３年２月２２日京都市

12) 松岡　達「心筋細胞の膜興奮—収縮—代謝連関モデル」　第１９回日本心電学会　２００２年９月９－１０日　名古屋市（English）

13) Matsuoka, S. Sarai, N. and Noma, A. Computational electrophysiology of cardiac myocytes. 41th Annual Conference of Japanese Society for Medical Biological Engineering 第４１回日本エム・イー学会大会、２００２年５月９日—１１日　京都市（English）

14) Matsuoka, S., Sarai, N., Kuratomi, S. and Noma, A. Cardiac Cell Model of Excitation -Contraction Coupling.　In silico Physiology 第７９回日本生理学会大会　２００２年３月２８日—３０日　広島市

2003

1) 城　日加里、野間昭典、松岡　達, 単離モルモット心室筋細胞における、細胞収縮とミトコンドリアNADH蛍光の同時測定, 第９６回近畿生理学談話会　平成１５年８月３０日　京都市

2) Matsuoka, S., Sarai, N., Jo, H. & Noma A. Simulation of ATP Metabolism in Cardiac Excitation-Contraction Coupling. Modeling Cellular Function Meeting Auckland, New Zealand. 14 – 18 July 2003.

3) 松岡　達、皿井伸明、城　日加里、野間昭典　ミトコンドリアＡＴＰ産生と心筋細胞機能のシミュレーション解析　第８０回日本生理学大会２００３年３月２４～２６日　福岡市

4) Matsuoka, S., Sarai, N., Jo, H. & Noma A. Energy Metabolism in Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Myocytes; Simulation study.

47th annual meeting of biophysical society, March 1-5, 2003. San Antonio, Texas.

5) Sarai, N., Matsuoka, S., & Noma A. Role of Ca^{2+}-dependent inactivation of L-type Ca^{2+} channel in cardiac cells: Simulation study. 47th annual meeting of biophysical society, March 1-5, 2003. San Antonio, Texas.

6) Fan, H-T., Iwamoto, T., Kita, S., Shigekawa, M., & Matsuoka, S. Ca^{2+}-dependent activation and inactivation of Na^{+}-Ca^{2+} exchange isoform, NCX3. 47th annual meeting of biophysical society, March 1-5, 2003. San Antonio, Texas.

7) 松岡　達「包括的心筋細胞シミュレーター（Kyoto Model）の現状」京都大学医工連携シンポジウム　2003 年 2 月 22 日　京都市京都大学医学部

2002

1) 松岡　達　心筋細胞Ｃａホメオスタシス　第１３回心臓病フォーラム（車両財団研究助成事業）　東京　２００２年８月１日東京

2) 皿井　伸明、松岡　達、野間　昭典 京都モデルの拡張　平成１４年度車両財団研究助成事業「実心臓のモデル化に関する研究」２００２年７月３１日東京

3) 皿井　伸明、倉富　忍、松岡　達、野間　昭典　自活心筋細胞モデルの構築に向けて　第７９回日本生理学会大会　２００２年３月２８日—３０日　広島市

4) 倉富　忍、松岡　達、皿井　伸明、野間　昭典　モルモット心筋細胞における筋小胞体に依存しない階段現象　第７９回日本生理学会大会　２００２年３月２８日—３０日　広島市

5) 辰巳　秀爾、松岡　達、野間　昭典　モルモット心筋細胞容積調節におけるナ

トリウムポンプの役割　第７９回日本生理学会大会　２００２年3月２８日—３０日　広島市

6) 范　海天、松岡　達、喜多　紗斗美、岩本　隆宏、重川　宗一　Na/Ca 交換サブタイプ NCX3 の解析　第７９回日本生理学会大会　２００２年3月２８日—３０日　広島市

（３）出版物

1) 野間昭典、松岡　達、皿井伸明、2003、分子反応過程のモデル化　岡本良夫編著　心臓のフィジオーム：電気生理現象のシミュレーション　分子から臓器まで　森北出版株式会社　20-39.

2) 野間昭典、松岡　達、皿井伸明、2003、包括的心筋細胞モデル（Kyoto model）岡本良夫編著　心臓のフィジオーム：電気生理現象のシミュレーション　分子から臓器まで　森北出版株式会社　64-87.

4. 研究成果

（1）はじめに

細胞膜Na^+-Ca^{2+} 交換とCa^{2+}ポンプは、細胞内Ca^{2+}排出を行う主要な機構であるが、心筋細胞においては、Na^+-Ca^{2+} 交換が主に Ca^{2+}排出を担うと考えられている。Na^+-Ca^{2+}交換は細胞膜電位と細胞内外 Na^+、Ca^{2+}濃度によって活性が一次的に決定される二次性能動輸送体である。また、これ以外の活性調節システムとして、細胞内 Na^+ 濃度が増加したときの Na^+-Ca^{2+}交換活性の低下（Na^+依存性不活性化）、細胞内 Ca^{2+} 増加による Na^+-Ca^{2+}交換活性の増強（Ca^{2+}依存性活性化）という二次性調節機構があり、Na^+-Ca^{2+}交換活性は、細胞内 Na^+、Ca^{2+}濃度によって、その活性が巧妙に調節されている。

さらに、細胞内ATPがNa^+-Ca^{2+}交換を増強することが知られている。これは、イカの giant squid axon における Na^+-Ca^{2+}交換で最初に報告された。イカ giant squid axonNa^+-Ca^{2+}交換においては、ATPによるNa^+-Ca^{2+}交換活性化は、リン酸化・脱リン酸化反応によると考えられている。しかしながら、心筋細胞においてはATPがNa^+-Ca^{2+}交換を活性化するかどうかについては、研究者間で必ずしも合意は得られていない。例えば、心筋細胞を低温、低 Ca^{2+}液で培養したときに細胞から発生するブレブ膜をもちいたgiant membrane patchにおいては、細胞質側に投与したATPは強力にNa^+-Ca^{2+}交換電流を増強し、その効果は非常に長く続く。しかし、卵母細胞に発現させたNCX1や、心筋細胞のベジクル標本においては通常の条件では ATP は Na^+-Ca^{2+} 交換活性を増強しない。一方で、培養細胞に発現させたNCX1においてはATPはNa^+-Ca^{2+} 交換電流を増強するとの報告もある。また、卵母細胞に発現させた NCX1 や、心筋細胞ベジクル標本においても、非特異的protein phosphatase阻害剤であるvanadate存在下

には、ATP により Na^+-Ca^{2+}交換活性が増強するとの報告があり、蛋白質リン酸化・脱リン酸化の関与が示唆されている。

このように、ATP の Na^+-Ca^{2+}交換に対する効果は、実験条件に依存すると推測される。それ故、正常心筋における ATP の効果を研究するためには、可能な限り正常に近い実験系において行う必要がある。

一方で、膜リン脂質の一つである phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P_2)が Na^+-Ca^{2+}交換活性を強力に増強することが、心筋細胞ブレブ膜の Na^+-Ca^{2+}交換で報告された。心筋細胞ブレブ膜を用いる実験系では、ATP による増強効果のほぼ 100%が lipid kinase による PtdIns(4,5)P_2 産生増加で説明できると言われる。しかし、上述したように、ATP の効果には実験条件で差があるため、より正常に近い実験系で、PtdIns(4,5)P_2 の効果を検証し直す必要がある。

このように、ATP による Na^+-Ca^{2+}交換活性化機序については、①Na^+-Ca^{2+}交換蛋白あるいは関連する蛋白のリン酸化・脱リン酸化と、②lipid kinase による PtdIns(4,5)P_2 産生増加が、その機序として推測される。この一連の研究においては心筋細胞膜 Na^+-Ca^{2+}交換蛋白の ATP による活性機序を、これまでに用いられているブレブ膜や、ベジクル等よりもより正常に近いと考えられる心筋細胞から剥離したパッチ膜（マクロパッチ）と膜電位固定下の心筋細胞で調べた。特に、①ATP による活性化の有無、②リン酸化・脱リン酸化過程の関与、③lipid kinase による PtdIns(4,5)P_2 産生の関与を、主に解析した。

（２）intact な心筋細胞膜から剥離したマクロパッチにおける ATP による Na^{+}-Ca^{2+}交換の活性化

まず、モルモット心室筋細胞から剥離したパッチ膜から Na^{+}-Ca^{2+}交換電流を記録し、ATP により Na^{+}-Ca^{2+}交換電流が増強されるかどうかを検討した。図 1 にその代表的実験結果を示す。細胞質側に投与した 2 mM ATP は Na^{+}-Ca^{2+}交換電流を約３倍増加し、その効果は可逆的であった。そして、ATP の半飽和濃度は約 5 mM であった。

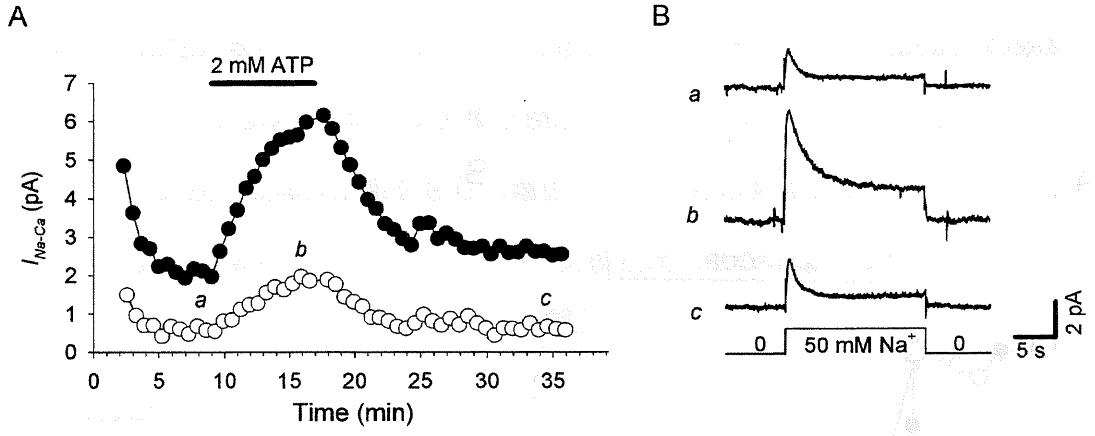

図 1　モルモット心室筋細胞から剥離したマクロパッチにおける ATP による Na^{+}-Ca^{2+}交換電流の増強　A.　外向き Na^{+}-Ca^{2+}交換電流のピーク電流（黒丸）と定常電流（白丸）の時間経過を示す。B. A の時刻（a, b, c）における 50 mM Na^{+}で誘発された Na^{+}-Ca^{2+}交換電流。

ATP は、Na^{+}-Ca^{2+}交換電流のピーク電流を増加する。これはおそらく、Ca^{2+}依存性活性化を増強するためと考えられる。また、ATP は Na^{+}依存性不活性化を抑制し、定常電流を増加した。正常心筋細胞には ATP が 5 mM 程度存在することを考慮すると、

生理的状態において Na^+-Ca^{2+}交換は、ATP で活性化された状態に維持されていると推測される。

whole-cell 膜電位固定下のモルモット心室筋細胞において、Na^+-Ca^{2+}交換電流を測定したが、ピペット内液に ATP が存在するときと、存在しないときで、Na^+-Ca^{2+}交換電流の大きさに著明な違いはなかった。これはおそらく、心筋細胞内で ATP が産生されるためと考えられる。この考えを確かめるために、ミトコンドリア脱共益剤である FCCP を投与し、ミトコンドリアにおける ATP 産生を抑制したところ、Na^+-Ca^{2+}交換電流は 80%以上抑制された（図 2)。

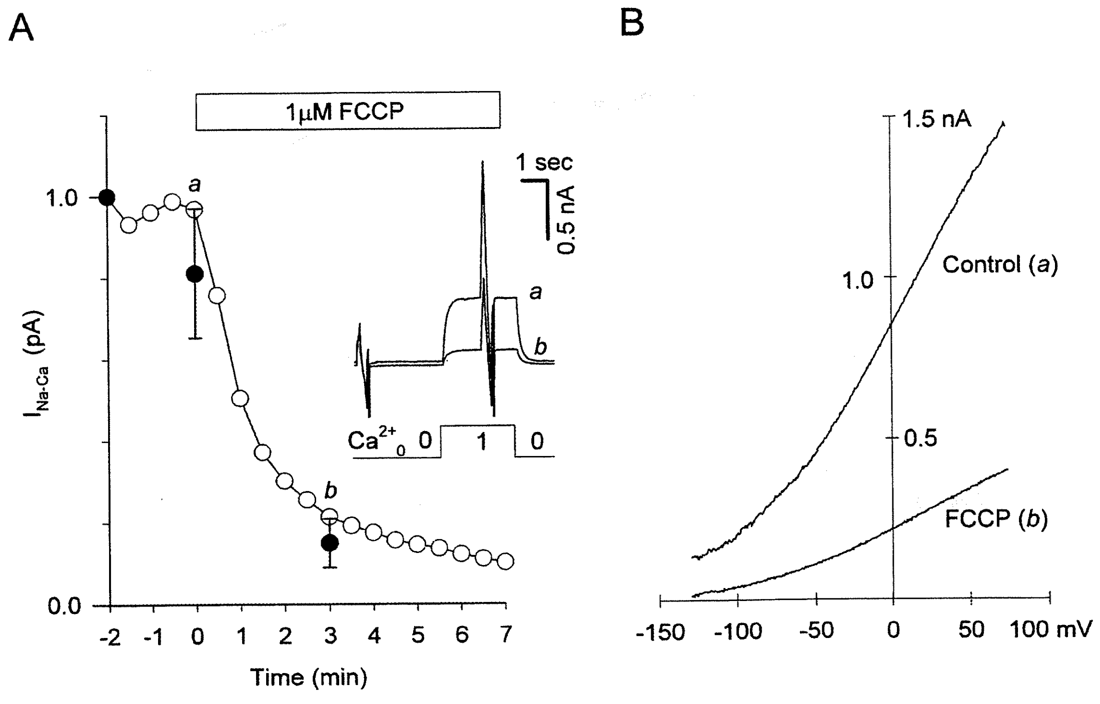

図 2　モルモット心室筋細胞の whole-cell Na^+-Ca^{2+}交換電流に対する FCCP の効果

以上の結果は、正常心筋細胞膜におけるNa^+-Ca^{2+}交換は、細胞内ATP存在下に活性化された状態にあるという考えを支持する。

（３）ATPによるNa^+-Ca^{2+}交換の活性化におけるTyrosine phosphataseの関与

「はじめに」で述べたように、卵母細胞に発現させたNCX1や、心筋細胞ベジクル標本においては、非特異的protein phosphatase阻害剤であるvanadate存在下には、ATPによりNa^+-Ca^{2+}交換活性が増強する。このことから、これらの実験条件においては、protein phosphatase活性が何らかの原因で高くなっていて、ATPのNa^+-Ca^{2+}交換に対する活性が現れにくくなっていると推測される。そこで、vanadateの効果をモルモット心室筋細胞のマクロパッチ膜で検証した。図3に示すように、vanadateはATPのNa^+-Ca^{2+}交換電流増強効果をさらに増強し、特に定常電流を増加させた。しかし、vanadateはATP非存在下には、Na^+-Ca^{2+}交換電流に影響しなかった。

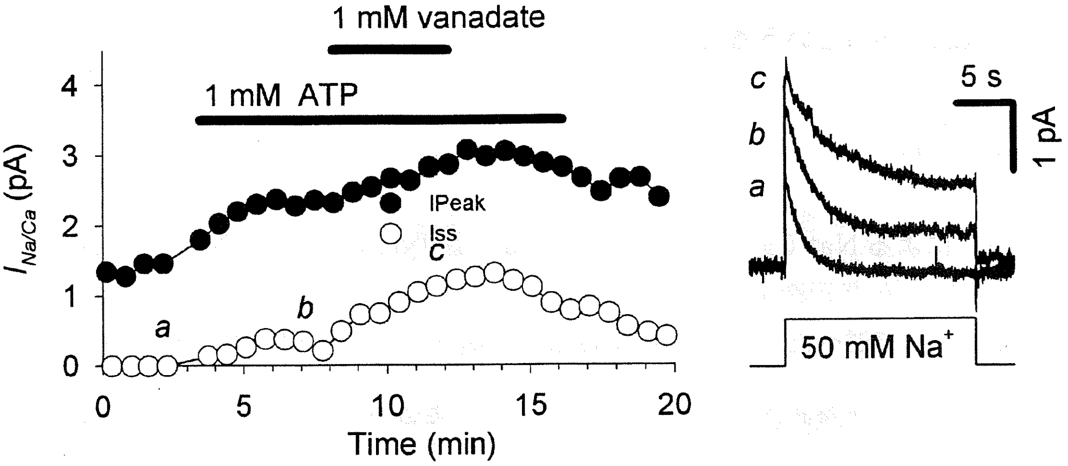

図 3　モルモット心室筋細胞から剥離したマクロパッチにおける vanadate の効果。A.　外向き Na^{+}-Ca^{2+}交換電流のピーク電流（黒丸）と定常電流（白丸）の時間経過を示す。B. A の時刻（a, b, c）における 50 mM Na^{+}で誘発された Na^{+}-Ca^{2+}交換電流。

vanadate は protein tyrosine phosphatase 阻害剤としての作用がある。そこで、より選択制の高い bpV(phen)を用いて同様の実験をしたところ、bpV(phen)にも同様の効果があった。これらの結果は、ATP の Na^{+}-Ca^{2+}交換電流増強効果の一部には蛋白質リン酸化・脱リン酸化が関与し、Na^{+}-Ca^{2+}交換蛋白あるいは関連蛋白のリン酸化により、Na^{+}-Ca^{2+}交換が活性化され、脱リン酸化により抑制されることを示唆する。さらに、bpV(phen) が vanadate と同様の効果を示すことから、protein tyrosine kinase/phosphatase の関与が強く示唆される。

（4）lipid kinase による PtdIns(4,5)P_2 産生の関与

次に、モルモット心室筋細胞から剥離したマクロパッチにおける、PtdIns(4,5)P_2 の効果を検討した。図 4 に示す様に、PtdIns(4,5)P_2 は Na^{+}-Ca^{2+}交換電流を著目に増加さ

せた（図 4A）。また、phosphatidylinositol 特異的 phospholipase C (PtdIns-PLC)により、ATP の ATP により増強された Na^{+}-Ca^{2+}交換電流が抑制された（図 4B）。このことから、phosphatidylinositol から lipide linase により PtdIns(4,5)P_2 が産生される時に ATP が必要とされ、PtdIns(4,5)P_2 産生を介して Na^{+}-Ca^{2+}交換が活性化されることが確認された。

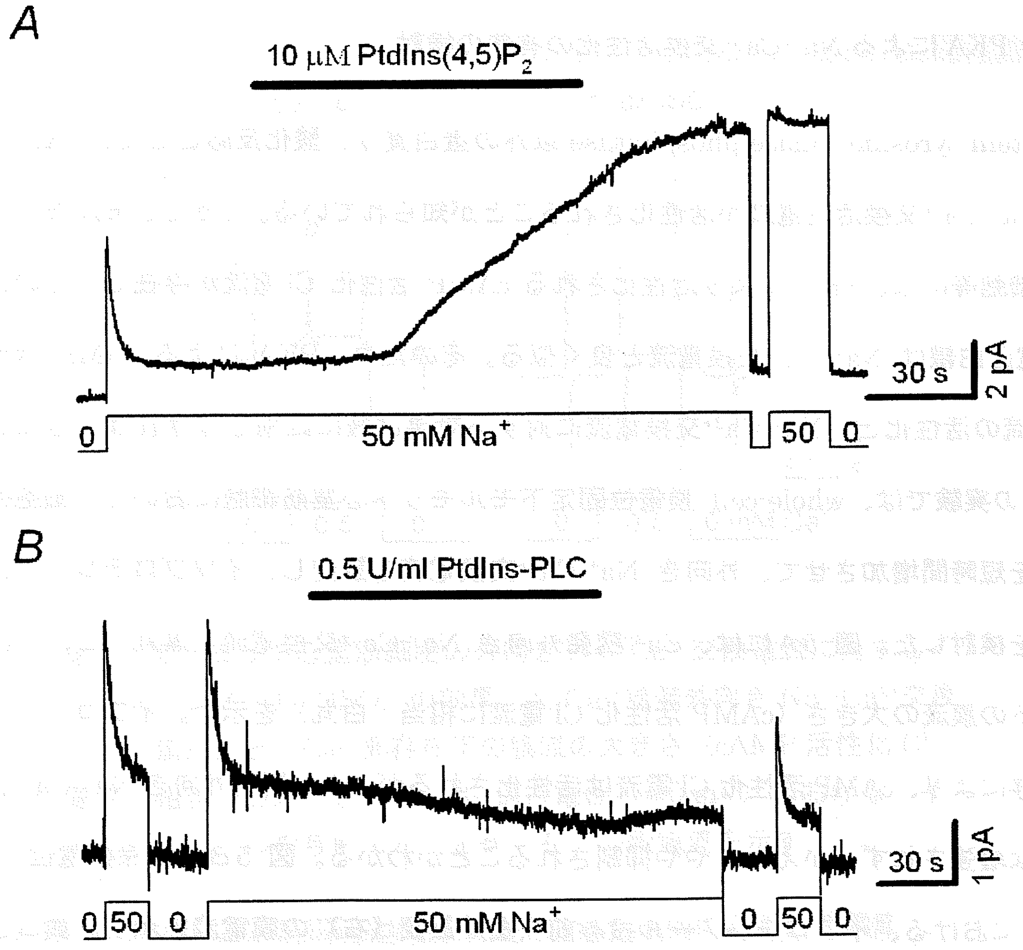

図 4　A. モルモット心室筋細胞から剥離したマクロパッチにおける PtdIns(4,5)P_2 の効果　B. ATP により増強された Na^{+}-Ca^{2+}交換電流に対する PtdIns-PLC の効果

最大効果で比較すると、ATP は平均 2.3 倍 Na^+-Ca^{2+}交換電流を増強したが、PtdIns(4,5)P_2は 3.5 倍であった。また、PtdIns(4,5)P_2の効果は、PtdIns(4,5)P_2を wash out した後も長く続き、ATP の効果とは著目に異なる。この違いはおそらく、ATP による Na^+-Ca^{2+}交換活性化には lipid kinase による PtdIns(4,5)P_2産生増加のみならず、上述した、protein tyrosine kinase/phosphatase の系、特に protein tyrosine phosphatase が強く影響することを示すと推測された。

（４）PKA による Na^+-Ca^{2+}交換活性化の有無の検討

protein tyrosine kinase/phosphatase 以外の蛋白質リン酸化反応として、PKA により、Na^+-Ca^{2+}交換活性電流が活性化されることが知られている。しかし、モルモット心室筋細胞等には、PKA により活性化される cAMP 活性化 Cl^-電流が存在し、その、電流―電圧曲線は Na^+-Ca^{2+}交換電流と良く似る。そのため、PKA による cAMP 活性化 Cl^-電流の活性化と、Na^+-Ca^{2+}交換電流に対する効果は厳に区別しなければならない。図 5 の実験では、whole-cell 膜電位固定下モルモット心室筋細胞において、細胞外液 Ca^{2+}を短時間増加させて、外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流を誘発し、イソプロテレノールの効果を検討した。図 5Aには、Ca^{2+}誘発外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流（黒丸）と、Ca^{2+}非存在下の膜流の大きさ（cAMP 活性化 Cl^-電流に相当：白丸）を示す。イプロテレノール投与により、cAMP 活性化 Cl^-電流は活性化されるが、Ca^{2+}誘発外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流は増強されず、かえってやや抑制されることがわかる。図 5Bには保持電位（-40 mV）における、イプロテレノール投与前（左）と後（右）の膜電流を示す。膜コンダクタンスは増加する（つまり、cAMP 活性化 Cl^-電流は活性化される）が、Ca^{2+}誘発外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流はほぼ変化しない。これらの結果から、モルモット心室筋細胞においては、PKA 活性化は Na^+-Ca^{2+}交換電流を活性化しないと結論された。

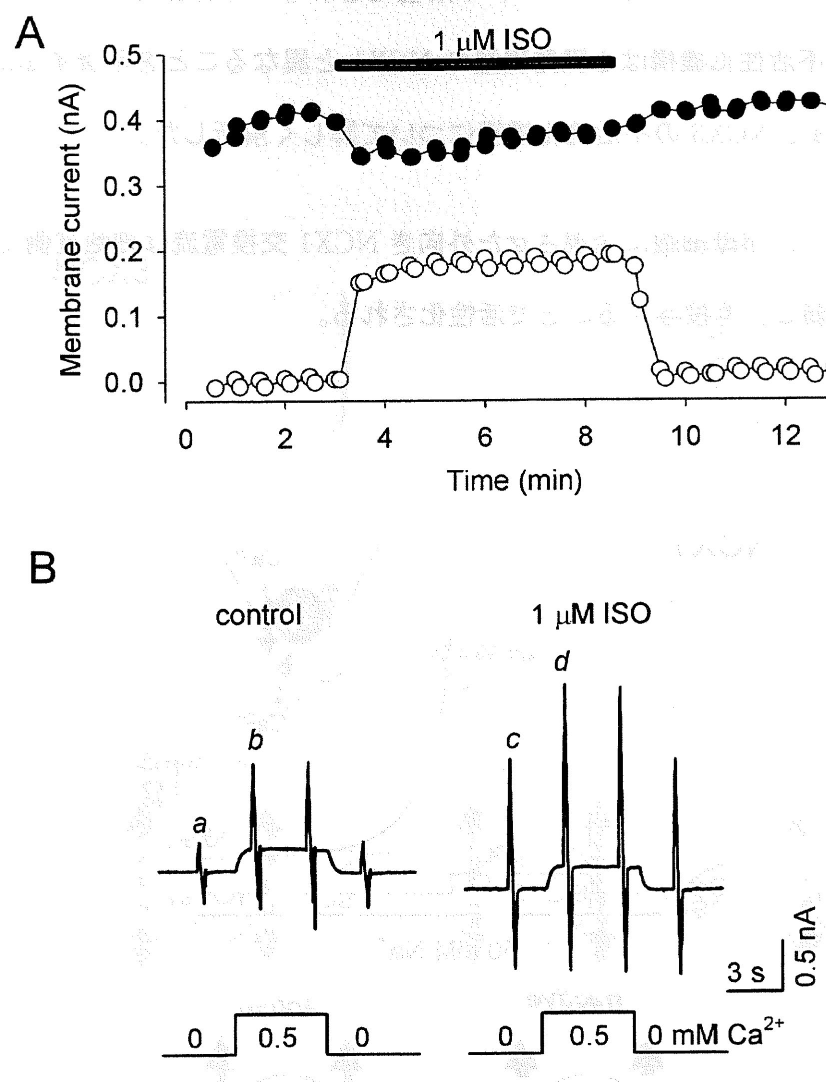

図5　モルモット心室筋細胞の外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流に対するイソプロテレノール（ISO）の効果　A. Ca^{2+}誘発外向き Na^+-Ca^{2+}交換電流（黒丸）と、Ca^{2+}非存在下の膜流の大きさ（cAMP 活性化 Cl^-電流に相当：白丸）を示す。B. 保持電位（-40 mV）における、イプロテレノール投与前（左）と後（右）の膜電流を示す。

（5）NCX3 における、NCX1 とは異なる不活性化機構による活性調節

これまで述べてきたように、ATP と PtdIns(4,5)P_2は、Na^+依存性不活性化または、Ca^{2+}依存性活性化を修飾することで、Na^+-Ca^{2+}交換を活性化すると考えられる。培養細胞に発現させた実験系においては、心臓発現型の NCX1 は ATP により活性化され、脳・

骨格筋細胞に発現するNCX3はATPにより活性化されないと報告されている。このことは、NCX3の不活性化機構は心臓発現型のNCX1と異なることを示唆するかもしれない。そこでます、NCX3の不活性化機構について詳しく解析した。

図6に示すように卵母細胞に発現させた外向きNCX1交換電流は細胞質側 Ca^{2+} を取り除くことで現弱し、再投与することで活性化される。

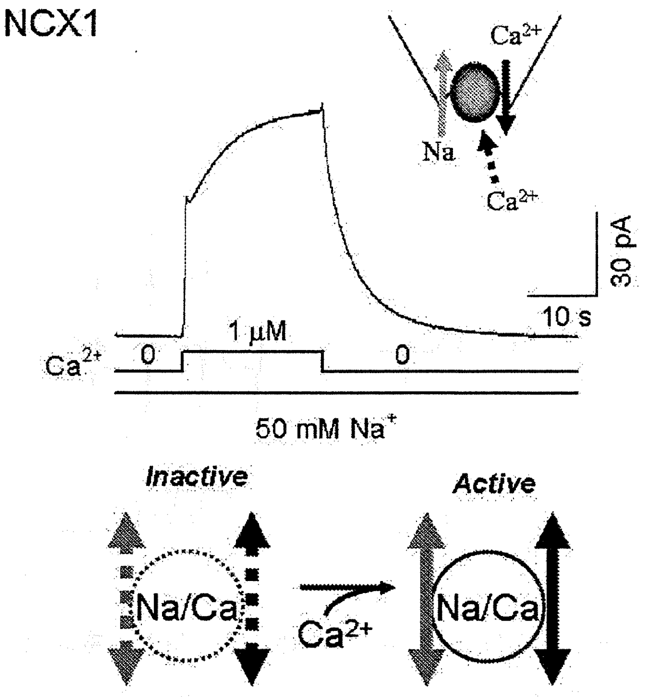

図6　NCX1における Ca^{2+} による活性化。

NCX3はNCX1と明らかに異なる Ca^{2+} による調節機構があることが明らかになった。つまり図7にあるように、細胞質側に Ca^{2+} を投与すると外向きNCX3電流は活性化されるが、それは一過性であり、外向き Na^+-Ca^{2+} 交換電流は速やかに減衰した。このことは、NCX1には Ca^{2+} による活性化機構があるのに対して、NCX3には Ca^{2+} による活

性化機構と不活性化機構の両方が存在することを示唆する。

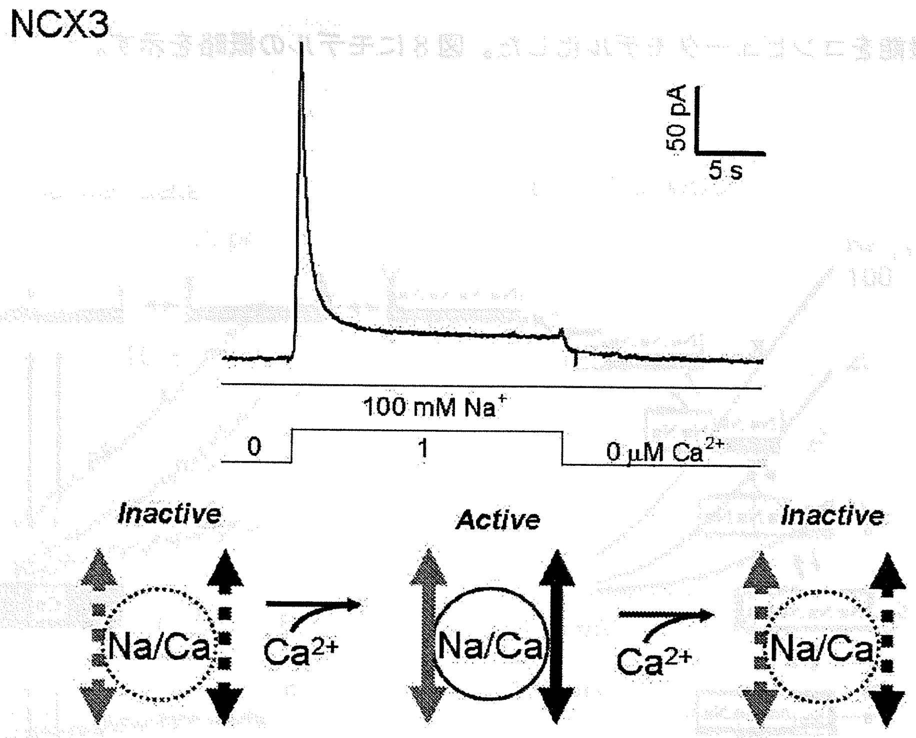

図 7　NCX3 における Ca^{2+}による活性化。

NCX1 を発現させた HEK 細胞から剥離したパッチ膜において、ATP は外向き NCX1 電流を著明に増加させたが、NCX3 電流に対する効果はわずかであった。NCX1 と NCX3 における不活性化機構の違いと、ATP 効果の違いはと何らかの関係があると推測される。

（6）コンピュータシミュレーションによる検討

これまでに述べたように、Na^+-Ca^{2+}交換の不活性化機構はATP、Ca^{2+}、PtdIns(4,5)P_2、protein tyrosine kinase/phosphatase 等による調節の作用機序に深く関与する。そこで、不活性化機構キネティクスを検討するために、マクロパッチのデータを基に Na^+-Ca^{2+}交換機能をコンピュータモデル化した。図 8 にモデルの概略を示す。

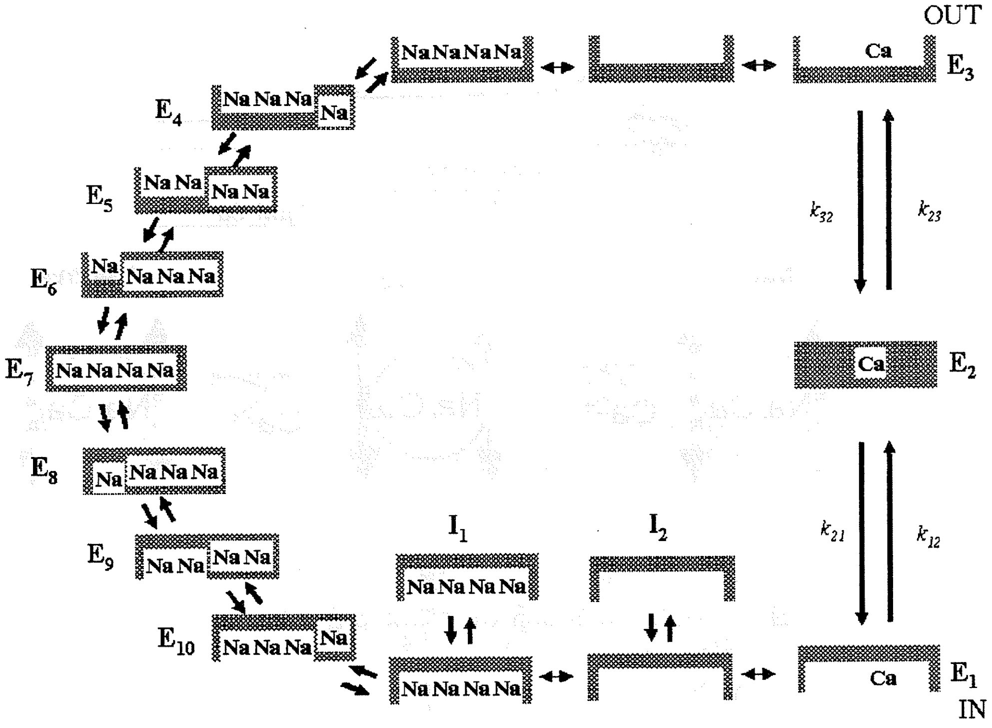

図 8　Na^+-Ca^{2+}交換モデルの state diagram

このモデルでは①マクロパッチのデータに基づき $4Na^+$：$1Ca^{2+}$交換を想定した。②Na^+依存性不活性化（I_1）と低 Ca^{2+}で誘発される不活性化（I_2）と一つの活性化状態を考えた。③Na^+の輸送を 8 個の過程に、Ca^{2+}輸送を 3 個の過程に分割し、それぞれに膜電位依存性を持たせた。

シミュレーション結果を図９に示す。９Aにはマクロパッチから記録された電流電圧関係を、９Bにはシミュレーション結果を示す。Na^+-Ca^{2+}交換電流の膜電位依存性が良く再構築された。このような電流—電圧関係は上記③の仮説を組み込むことで初めて再現できた。１つの過程でイオンが輸送される様なモデルでは決してこのような電流—電圧関係は得られない。

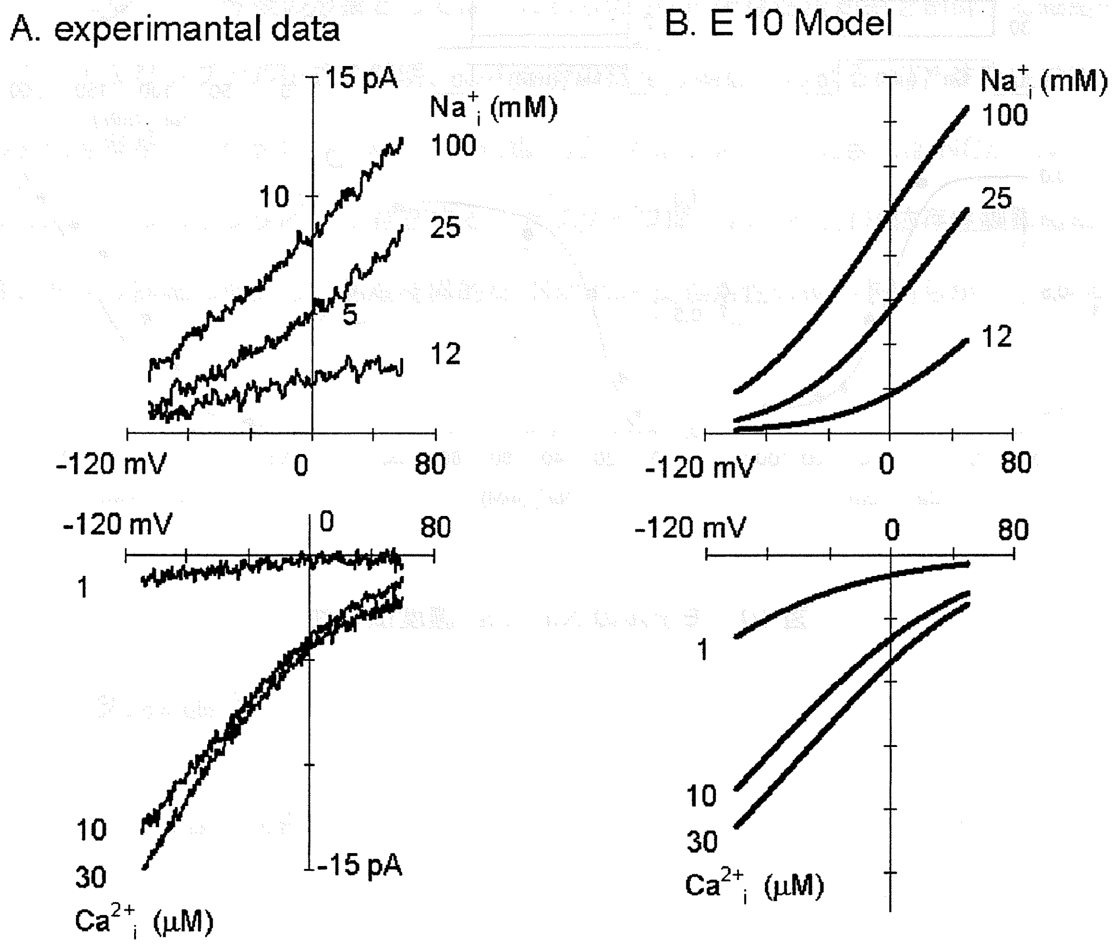

図９　電流—電圧関係のシミュレーション　A. モルモット心室筋細胞から剥離したマクロパッチにおける実験データ　B. シミュレーション結果

また、図 10 には、細胞内 Na^+依存性、Ca^{2+}依存性、細胞内 Ca^{2+}による活性化の Ca^{2+}依存性のシミュレーションと実験結果を示す。モデルは、良く実験結果を再構築できる。

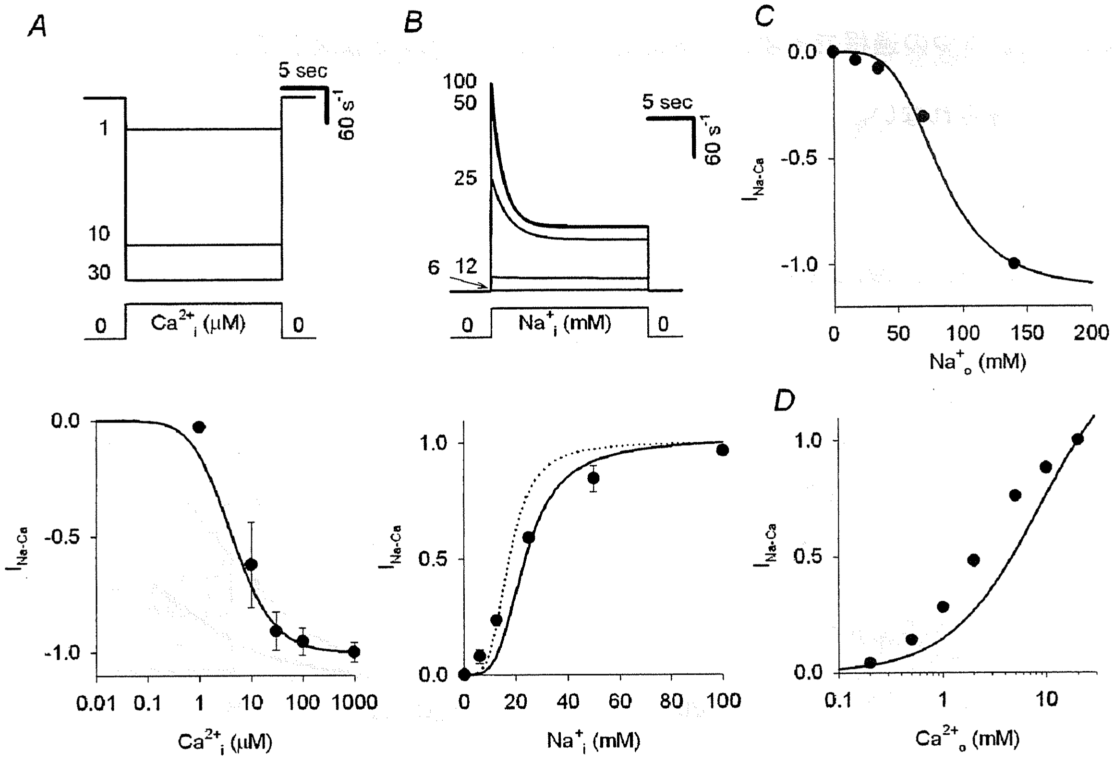

図 10　モデルの Na^+, Ca^{2+}濃度依存性

5. 今後の展望

この一連の研究から、正常心筋細胞におけるNa^+-Ca^{2+}交換はATP依存性に活性化された状態にあることが明らかになった。そしてATPによる活性化の機序としては、protein tyrosine kinase/phosphataseによるNa^+-Ca^{2+}交換蛋白もしくは関連蛋白のリン酸化と、lipid kinaseによるPtdIns(4,5)P_2産生の両方のシステムが存在することが明らかになった。今後の展望としては、これらのATP依存性調節系を制御する細胞外リガンド及びシグナル伝達の解明、心不全等の様々な病態におけるATP依存性調節系の変化を解析して行きたい。また、ほ乳類においてはNa^+-Ca^{2+}交換にはNCX1, NCX2, NCX3の３つのサブタイプが存在する。サブタイプ間におけるATP依存性調節機構の違いをより詳細に検討し、組織特異的なNa^+-Ca^{2+}交換活性の違いを明らかにして行きたい。

6. 発表論文

以下に、発表論文を掲載する。