

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 金 鳳 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 $\text{Na}^+$ -dependent Modulation of Mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ via<br>Electrogenic Mitochondrial $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ Exchange<br>(心筋ミトコンドリアにおける起電性 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換体による細胞質 $\text{Na}^+$ 依存<br>的な $\text{Ca}^{2+}$ 調節) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>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  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$ ) 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、 $\text{Ca}^{2+}$ は  $\text{Ca}^{2+}$ ユニポートを介して主に流入し、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換体 ( $\text{NCX}_{\text{mito}}$ ) 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  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Na}^+$  濃度が  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  を規定する重要な因子である。しかし、 $\text{NCX}_{\text{mito}}$  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  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  と  $\Delta\phi_{\text{mito}}$  を、Rhod-2 と TMRE を用いてそれぞれ測定した。

無  $\text{Na}^+$  下に、300nM  $\text{Ca}^{2+}$  液を灌流すると Rhod-2 蛍光は約 9 倍増加し、この増加は  $\text{Ca}^{2+}$ ユニポート抑制剤 (Ruthenium Red: RR) によりほぼ完全に抑制された。細胞質  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+_c$ ) は  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  増加を抑制し、 $\text{IC}_{50}$  は約 2mM であった。 $\text{Na}^+_c$  の存在下に CGP-37157 ( $\text{NCX}_{\text{mito}}$  阻害剤) を投与すると、 $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  はさらに増加した。これらの結果は、主に  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  順モードにより  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  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  $\text{Na}^+_c$  は  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  増加をより促進した ( $\text{EC}_{50}$  = 約 4mM)。RR と Cyclosporin A (ミトコンドリア Permeability Transition Pore (PTP) の抑制剤) はこの  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  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  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  逆モードにより  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  溶液でミトコンドリアに  $\text{Ca}^{2+}$  を前負荷した後に、 $\text{Na}^+_c$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  排出の初速度を減少させた。しかし、300nM  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  ユニポートを抑制した状態で、600 nM  $\text{Ca}^{2+}$  溶液を灌流しても、 $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  は上昇しなかったが、脱分極により  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  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  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  活性が  $\Delta\phi_{\text{mito}}$  に依存することを示す。

$\text{NCX}_{\text{mito}}$  活性が  $\Delta\phi_{\text{mito}}$  に依存するならば、 $\text{NCX}_{\text{mito}}$  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  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  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  $\text{NCX}_{\text{mito}}$  コンピュータモデルの解析から、 $\text{NCX}_{\text{mito}}$  の膜電位依存性は、ミトコンドリア内外の  $\text{Na}^+$ ・ $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Na}^+$  透過性が増加することが、細胞質  $\text{Na}^+$  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、 $\text{NCX}_{\text{mito}}$  が膜電位依存性であることにより、 $\text{Na}^+_c$  と  $\Delta\phi_{\text{mito}}$  変化を介して  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $\text{Ca}^{2+}_m$ ) の調節に  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  交換体 ( $\text{NCX}_m$ ) が寄与するが、 $\text{NCX}_m$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_c$ ) や細胞質  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+_c$ ) 濃度を変えて順モード  $\text{NCX}_m$  ( $\text{Na}^+_c/\text{Ca}^{2+}_m$  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、 $\text{Ca}^{2+}$  ユニポータを介して  $\text{Ca}^{2+}_m$  が増加するが、同時に  $\text{Na}^+_c$  濃度を増加すると、順モード  $\text{NCX}_m$  によって、この  $\text{Ca}^{2+}_m$  増加は抑制された。一方、脱分極状態では、逆モード  $\text{NCX}_m$  を介して  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、 $\text{Na}^+_c$  の増加は  $\text{Ca}^{2+}$  増加を促進した。さらに、順モードによる  $\text{Ca}^{2+}$  排出は脱分極により減少した。これらの結果から  $\text{NCX}_m$  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  $\text{NCX}_m$  モデルを開発することができた。以上の結果より、 $\text{NCX}_m$  は膜電位依存性であり、これによって  $\text{Na}^+_c$  と膜電位変化を介して  $\text{Ca}^{2+}_m$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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。