

氏 名（本籍） 志 村 雅 彦

学位の種類 博 士（医 学）

学位記番号 医 博 第 1 3 8 5 号

学位授与年月日 平 成 9 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 外科学系専攻

学位論文題目 Characterization of the electrogenic $\text{Na}^+\text{-K}^+$
pump in horizontal cells isolated from the
carp retina.

(コイ網膜水平細胞における $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの電
気生理学的性質)

(主 査)

論文審査委員 教授 玉 井 信 教授 丸 山 芳 夫

教授 柳 澤 輝 行

論文内容要旨

研究目的

細胞における $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの役割は主に静止膜電位の形成に貢献している。興奮伝導により膜電位を絶えず変化させる神経細胞においてはそれのみならず、周囲のイオン環境の調節にも大きな役割を果たしていると思われる。網膜においては、特にナトリウムイオン及びカリウムイオンの変動が激しく、その環境維持に網膜内の神経細胞も寄与していると考えられる。

今回コイ網膜の水平細胞を急性単離し、ニスタチン穿孔パッチクランプ法を用いて $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの電気生理学的性質を調べる研究を行った。

研究結果及び考察

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ電流は -40mV の保持電位の条件下で、細胞内液をナトリウム 40mM 、セシウム 80mM とし、様々なイオンチャンネルのブロッカーを用いて、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプのみ活動できるようにし、細胞外のカリウム濃度を 0mM から 3mM にする事で $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプを活性化した。細胞外のカリウム濃度は 120mM とした。活性化された $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプは 1mol の ATP を消費して、細胞内からナトリウムイオンを 3mol 排出し、細胞外からカリウムイオンを 2mol 取り込むため、つごう電価が 1F 細胞外に移動することになる。この電荷が外向き電流として記録され、また、この外向き電流は $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプのブロッカーであるウアブイン (3mM) により完全に抑制されることにより、得られた外向き電流を $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ電流とした。

この電流は細胞外のカリウム濃度依存性に上昇し、 EC_{50} は 0.66mM 、また Hill 係数は 1.39 であった。尚、 3mM の細胞外カリウムによってこの電流は完全に活性化されていることがわかった。また、細胞外カリウム投与前後にランプ波 ($-90\text{mV}\sim+20\text{mV}$) を入れたところ、この $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ電流に電位依存性は認められなかった。

さて、細胞外のカリウムを 120mM から 0mM に変化させると、保持電流が外向きに変位した。このときどちらの条件下でも $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ電流が惹起され、細胞外ナトリウムの有無で差異はみられなかった。細胞外のカリウムの変化による保持電流の変位の原因を解明するべく、細胞内液をナトリウム 0mM とし、細胞外液のカリウムが存在する (120mM) 条件下で、 3mM の細胞外カリウムを投与すると、細胞内ナトリウムがない状態にも関わらず、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ電流が記録された。これは、細胞外から細胞内に向けて、ナトリウムが流れ込んでいることを示唆するものと思われた。

次に細胞内外のカリウムをともに 0mM とし、 3mM の細胞外カリウムを投与して $\text{Na}^+\text{-K}^+$

ポンプ電流を惹起すると、一過性に外向き電流が流れ、やがて流れなくなった。これは、細胞膜に残存するナトリウムが存在し、これを使ってポンプが一時的に稼働されるものと考えられた。

一方、ウアバインによるポンプ電流の抑制効果について検討すると、このポンプ電流はウアバイン濃度依存性に抑制され、その濃度-応答曲線は二相性になった。これより、ウアバインに対する感受性の高低により2グループに分けられ、その IC_{50} は、20nM（高感受性）及び10.4 μ M（低感受性）。また、Hill 係数はともに1.15であった。尚2つのグループの存在割合は高感受性のものが32.6%、低感受性のものが67.4%であった。これは水平細胞に2種類の Na^+K^+ ポンプの異性体が存在することを示していた。

網膜では、その機能特異性により、細胞内外でのナトリウム、及びカリウムの環境維持は非常に大切であり、また複雑でもある。今回、細胞内外のイオン環境の変化を考えあわせ、網膜の水平細胞における Na^+K^+ ポンプの電気生理学的性質を調べたことにより、今後の網膜機能の解明に大きな役割を果たすと考えられた。

審査結果の要旨

興奮性細胞として神経網膜を構成する各種ニューロンのイオン透過性とその回復メカニズムを知ることは網膜における光情報伝達とその処理過程を知る上で重要である。本研究はコイ網膜の単離した水平細胞(H)におけるパッチクランプ法を用いたNa-Kポンプの電気生理学的性質に関する研究である。

細胞外およびニスタチン穿孔法により細胞内イオン濃度(Na, K)を変化させ、Na-Kポンプ以外のイオンチャネルは各々の阻害剤でブロックすることによりNa-Kポンプのみ働く環境下でポンプ電流の性質、保持電流の変化を調べている。これらの方法は現在の興奮性膜のメカニズムを知る方法として妥当なものである。又Na-K ATPase阻害剤であるウアバインを投与してNa-Kポンプ電流の変化を調べたところその感受性から2種類に分けられること、高感受性のものと低感受性のものが1:2の割合で存在することが見いだされた。

網膜には神経細胞が層状に配列し網膜内ですでに多くの情報処理が行われていることが明らかになっている。各々の神経細胞の果たす役割を維持しているイオン環境の維持を知ることは重要で、その点から本論文は博士論文として価値があると認められた。