

氏名・(本籍)	内 田 康 和 (大阪府)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第150号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成6年3月24日		
学位論文題目	褐色脂肪細胞の膜電位に及ぼすノルアドレナリンの作用		
	審 査 委 員	主 査 教 授	戸 田 昇
		副 査 教 授	北 里 宏
		副 査 教 授	木 之 下 正 彦

論 文 内 容 要 旨

[目的]

褐色脂肪細胞は哺乳類において体温調節機能のための発熱機関として働いており、この体温調節機構は交感神経により支配され、交感神経の活動の増加により発熱量が増大していくことが知られている。また交感神経の神経伝達物質であるノルアドレナリンを作用させると細胞内でのミトコンドリア内膜の H^+ 透過性が上昇し、発熱量が増大することが報告されている。しかし、交感神経線維末端から放出されたノルアドレナリンと受容体との結合からミトコンドリア内膜の H^+ チャンネルが活性化されるまでの経路はまだ解明されていない。本研究の目的は膜電位を指標として、交感神経活動とミトコンドリア内膜の H^+ 透過性上昇の共役の機構解明の手がかりを得ることである。

[方 法]

実験にはICR種のマウスを用い、肩甲骨間の褐色脂肪組織を使用した。細胞内電位の測定にはガラス微小電極を用いた。また電位測定および抵抗測定には微小電極用増幅器を用い、磁気テープに記録し解析した。 K^+ efflux, Na^+ effluxの測定実験には、放射性同位元素を加えたリンガー液の中に摘出した組織を入れ、放射性物質を細胞に取り込ませた後細胞から出てくる放射性物質を測定し、単位時間に組織から流出した放射能活性をその時点で組織中に残存している放射能活性の平均値で割り、輸送活性を表した。

[結 果]

1. 膜電位の温度依存性

褐色脂肪細胞の膜電位が温度に対してどのように変化しているかを調べた。19℃から40℃までの範囲で、29℃において最大の膜電位が得られた。また、29℃と37℃に於いて膜電位に及ぼすノルアドレナリンの影響を調べ、37℃で作用させたときの方が29℃の場合に比べ脱分極の作用は小さいことを確かめた。

2. 膜電位の K^+ 濃度依存性

静止電位への K^+ 透過性の寄与の程度を知るため膜電位の K^+ 濃度依存性を調べた。29℃では静止状態の膜の全コンダクタンスの約60%を K^+ コンダクタンスが占めていた。

3. 膜電位および膜抵抗に及ぼすノルアドレナリンの作用

ノルアドレナリンを加えると膜抵抗は減少した。次にノルアドレナリンの効果が α 受容体刺激に依

るものか β 受容体刺激に依るものかを調べるため、プロプラノロール、イソプロテレンロール、フェニレフリンを使って実験し、ノルアドレナリンの作用は主として β 受容体を介していることを示す結果を得た。

4. ノルアドレナリンによる脱分極におけるATP感受性 K^+ チャンネルの関与

ノルアドレナリンによる脱分極にATP感受性 K^+ チャンネルの関与があるかどうかをATP感受性 K^+ チャンネルオープナーであるジアゾキサイド、ニコランジル、ATP感受性 K^+ チャンネルブロッカーであるトルブタミド、グリベンクラミドの薬剤を使って実験した。ノルアドレナリンで脱分極させた後オープナーを同時に使用すると再分極を起こした。また静止状態の細胞にATP感受性 K^+ チャンネルのクローザーを使うと脱分極した。これにより褐色脂肪細胞にはATP感受性 K^+ チャンネルが存在していることがわかった。またこのATP感受性 K^+ チャンネルはノルアドレナリンの存在下ではほとんど閉じており、ノルアドレナリンの非存在下ではかなりの部分が開いていることが示唆された。

5. Rb^+ effluxおよび Na^+ effluxに及ぼすノルアドレナリンの効果

$^{86}Rb^+$ effluxはノルアドレナリンを投与したときにやや減少し、ノルアドレナリンの投与を中止したとき増大した。また $^{22}Na^+$ effluxはノルアドレナリン投与したときに増大し、ノルアドレナリンの投与を中止したときにはもとのレベルまで戻った。このことはノルアドレナリン投与によって K^+ 透過性が低下すると共に、 Na^+ 透過性が上昇することを示唆している。

6. Rb^+ effluxに及ぼすATP感受性 K^+ チャンネルオープナーおよびブロッカーの作用

$^{86}Rb^+$ effluxがATP感受性 K^+ チャンネルを通るかどうかを調べるため、ノルアドレナリン存在下と非存在下でそれぞれチャンネルオープナーおよびブロッカーの投与を行い、 $^{86}Rb^+$ effluxを測定した。その結果ノルアドレナリン存在下ではジアゾキサイドの投与でeffluxは増大し、ノルアドレナリンが存在していない時にトルブタミドの投与でeffluxは減少することを認めた。

[考 察]

褐色脂肪細胞での交感神経の活動、ノルアドレナリンの組織への刺激による脱分極のメカニズムを解明することを考えた。29°Cで K^+ 濃度の依存性が高く、37°Cでは K^+ 濃度の依存性が低いため、この脱分極に K^+ に対してチャンネルの開閉があったことが予想された。そこでATP感受性 K^+ チャンネルのオープナーやブロッカーを使用して電位の測定を行い、褐色脂肪細胞でATP感受性 K^+ チャンネルの存在を明らかにした。次に実際に K^+ のeffluxがどうなっているかを測定した。 K^+ イオンと生体内で同じ動きをして細胞膜 K^+ チャンネル通過する Rb^+ を使って実験を行った。しかし予想とは反してノルアドレナリンの投与により Rb^+ のeffluxは減少し、投与中止後effluxの増加をみた。そこで他の陽イオンの流入が関与している可能性があったため、 Na^+ のeffluxを測定した。すると Na^+ のeffluxはノルアドレナリンの投与により増大した。すなわち Na^+ のinfluxにより脱分極したものと考えられる。また細胞からの陰イオンの流失も考えられ、 Cl^- イオンの関与の可能性が一番高い。膜抵抗を測定するとノルアドレナリン投与により抵抗の減少がみられた。これには β 作用が主に関わっているが、 α 作用も若干関与している。これには他のイオンが関与している可能性が高いと思われる。

[結 論]

褐色脂肪細胞においてノルアドレナリンを投与することにより、細胞は脱分極を起こし膜抵抗が低下する。またノルアドレナリンより細胞膜の Na^+ の透過性を上昇させ、細胞膜にあるATP感受性 K^+ チャンネルを閉じさせる。resting stateで開いている K^+ チャンネルの大部分はATP感受性 K^+ チャンネルで

ある。またノルアドレナリンは Na^+ チャンネルを開く作用を持っていると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

近年、褐色脂肪細胞は幼年者のみならず、成年になっても存在することが報告されており、生体のエネルギー代謝の面から注目されている。脂肪細胞では、ノルアドレナリンにより脂質の加水分解や熱産生が引き起こされ、細胞膜を脱分極する事が知られている。しかし、脱分極の機序に関しては未だ論議が多い。本研究は、膜電位、陽イオンの膜透過、 K^+ チャンネル開口薬と遮断薬の作用などを指標として、ノルアドレナリンによる膜のイオン透過性変化をマウスの褐色脂肪細胞を用いて検討したものである。

実験の結果、次の点が明らかとなった。1) ノルアドレナリンを細胞外液に加えると、脂肪細胞膜は脱分極し、膜の電気抵抗は約40%減少した。2) ノルアドレナリンは ^{22}Na -effluxを増加した。3) ノルアドレナリンを作用させると、膜は脱分極するにも拘らず、 ^{86}Rb -effluxは殆ど変化しないか或いは僅かに減少した。4) ノルアドレナリン作用時にATP感受性 K^+ チャンネル開口薬であるdiazoxideを細胞外液に加えると、 ^{86}Rb -effluxはほぼ2倍に増加した。5) ノルアドレナリン非存在時には、diazoxideは ^{86}Rb -effluxに殆ど影響を及ぼさなかった。以上の所見は、ノルアドレナリンが作用したときに見られる脱分極に Na^+ 透過性の上昇と K^+ 透過性の低下がともに関与すること、ノルアドレナリンによる K^+ 透過性の低下にATP感受性 K^+ チャンネルの閉鎖が関与することを示唆している。

本研究は、ノルアドレナリン投与による褐色脂肪細胞膜のイオン透過性の変化を明らかにし、その後引き起こされる熱産生や脂肪分解の機序の解析の基礎を提供したといえる。よって、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められた。