

氏名・(本籍)	すぎもと よし ひさ 杉 本 喜 久 (滋賀県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第51号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成元年3月24日
学位論文題目	ACETAZOLAMIDE SLOWS THE GLUCOSE-INDUCED MEMBRANE DEPOLARIZATION IN PANCREATIC B-CELLS: THE H ⁺ -SENSITIVE K ⁺ -PERMEABILITY IS RESPONSIBLE FOR THE DEPOLARIZATION (アセタゾラミドは膵B細胞のグルコース依存性脱分極を遅延する: 脱 分極は水素イオン感受性カリウム透過性によって決定される)

審 査 委 員	主査 教授	北 里	宏
	副査 教授	木之下	正 彦
	副査 教授	繁 田	幸 男

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

膵ラ氏島のB細胞はGlucoseを投与すると脱分極し、Ca²⁺が流入による活動電位を発生し、細胞内Ca²⁺濃度は上昇してInsulinを開口分泌する。糖刺激と分泌の間の機構の中でこの脱分極が最初の引金である。糖依存性脱分極はK⁺透過性の低下に起因する。現在このK⁺透過性の低下に関して2つの仮説が優勢である。糖代謝により発生するH⁺によってK⁺チャネルの閉じるという仮説と糖代謝にて生成されるATPの濃度が上昇してATP感受性K⁺チャネルの閉じるという仮説である。糖依存性脱分極の機序を明らかにする目的で、膜電位を微小電極法で測定しアセタゾラミド(以下ACZ)の効果を検討した。ACZは糖代謝から発生するCO₂を脱水素して炭酸に変換する過程を阻害するため、H⁺の産生が抑制されると考えられる。

〔方 法〕

4~10週齢のICRマウスの膵臓を摘出し、容量0.4mlのチャンパー内で膜電位を測定した。微小電極は電極抵抗250~400MΩの微細なものをを用いた。

〔結 果〕

糖依存性脱分極に対するACZの効果: Glucoseを投与した時の脱分極速度は投与した糖濃度に従って増大した。ACZ存在下では脱分極速度が対照より低下した。これは糖依存性脱分極のうちACZで

低下した成分は CO_2 の脱水素過程を経ており、糖依存性脱分極は H^+ 感受性 K^+ チャンネルが主であるという事を示す。

外液の Na^+ 除去による脱分極に対する ACZ の効果：外液の Na^+ 濃度を減少すると脱分極する。この脱分極は外液中の Na^+ が減少による Na^+/H^+ 交換輸送の抑制のためと考えられる。この検証に ACZ を用いた。ACZ は脱分極速度を対照に比し低下させた。これは外液の Na^+ 除去による脱分極も H^+ 感受性 K^+ 透過性の低下による事を示す。

外液の Na^+ 除去による電位変化に対する Ca^{2+} の影響：外液の Na^+ を完全に除去すると一過性の過分極が生じる。この過分極の機序を調べた。B 細胞は外液の Ca^{2+} を取り去ると連続性活動電位を発生する。この状態から更に Na^+ を取り去ると活動電位は瞬時に消失し、その後脱分極した。 Ca^{2+} が存在下で ACZ は一過性過分極を生じたが、 Ca^{2+} 非存在下では一過性過分極を生じなかった。即ち Na^+ 除去でみられる一過性過分極は細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルが開いたためと考えられる。この機序としては外液の Na^+ が減少したことによる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送の抑制、また Ca^{2+} 流入量が増加したためと考えられる。

外液 Ca^{2+} 非存在時の 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (以下 SITS) の効果：一般に SITS は $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 交換輸送を抑制する。外液 Ca^{2+} 存在下での B 細胞に対する SITS の効果は脱分極と活動電位の増高であると報告されている。

これは SITS によって $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 交換輸送が抑制され、外液より HCO_3^- の流入が減り細胞内が酸性化するため脱分極すると説明されてきた。しかし、この説明は細胞内で $\text{H}^+ \cdot \text{HCO}_3^-$ が連続的に産生されている事実と矛盾する。外液 Ca^{2+} 非存在下で SITS を投与すると可逆的な過分極を生じた。これは SITS によって HCO_3^- の流出・ Cl^- の流入が抑制され細胞内がアルカリ化し過分極したと考えられる。

〔考察〕

B 細胞における H^+ 産生：糖投与時の細胞内 pH 変化に関して上昇・不変・低下と報告は様々だが、最近では低下の報告が多い。膜電位は細胞内 pH に敏感である。

ATP 感受性 K^+ チャンネル：Patch clamp 法による研究では、cell attached patch で観察されている Glucose 存在時に閉じていて非存在時に開いている K^+ チャンネル (Gchannel) のチャンネル透過性と Kinetics が ATP 感受性 K^+ チャンネルのものと類似しているため二つのチャンネルは同一であると報告されている。しかし、glucose 非存在時の B 細胞内の ATP 濃度 (2-3 mM) ではこの ATP 感受性 K^+ チャンネルは 99.7% 閉じている。B 細胞の ATP 濃度測定によると Glucose 投与開始 1 分後に一過性に ATP 濃度が低下し、Glucose の非存在時と存在時の ATP 濃度差は 1.1 倍である事より不合理である。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル：B 細胞では常に Ca^{2+} が流入しており、細胞膜直下の Ca^{2+} 濃度はかなり高いと考えられる。それを考慮すると Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルは pH 依存性がある事より、このチャンネルが糖依存性脱分極に関連している可能性がある。膜電位に対する SITS の効果：SITS が Ca^{2+} 存在下で脱分極させる理由に関して SITS が $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 交換輸送を抑制し、細胞

内に HCO_3^- が蓄積するために細胞内の CO_3^{2-} も増加すると考えられる。この CO_3^{2-} は細胞内の Ca^{2+} と結合して CaCO_3 を形成するので細胞内 Ca^{2+} が減少し、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが閉じて脱分極し、また細胞内外の Ca^{2+} の濃度差の増大により活動電位が増高したと考えられる。

〔結論〕

ACZ による Glucose 依存性脱分極の抑制によって糖の代謝産物である CO_2 から生成される H^+ が脱分極をひきおこす事が分かった。また、外液の Na^+ 除去による脱分極も Na^+/H^+ 交換輸送を抑制し細胞内 pH を低下させ H^+ 感受性 K^+ チャネルが閉じたためであると考えられた。 H^+ と対になる HCO_3^- は $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 交換輸送を介して細胞外に排出されることが示された。これらにより、B細胞の刺激分泌連関に関わるチャネル・ポンプ・交換輸送の機能の一部が明らかになった。

学位論文審査の結果の要旨

近年パッチクランプ法の発達により、細胞膜にある各種イオンチャネルの性質が詳細に調べ上げられ、これらの研究の結果、 β 細胞には細胞内 ATP 濃度を感知して閉じる K^+ channel と細胞内 H^+ 濃度の上昇によって閉じる K^+ channel の存在が明らかとなっている。この研究は生理的環境下ではこれら ATP-sensitive K^+ channel と H^+ -sensitive K^+ channel の何れが β 細胞の glucose によって誘発される脱分極 (glucose-induced depolarization) に主な役割を演じているかを明らかにしようとしたものである。本研究では、炭酸脱水酵素阻害剤が ATP 合成には殆ど影響を与えず、 CO_2 の水和反応のみを抑制する性質を利用し、種々の実験条件のもとで起こる膜電位変化について、炭酸脱水酵素阻害剤を作用させた場合と作用させなかった場合とを比較検討する方法が採られている。細胞内の炭酸脱水酵素活性を抑制する実験では、飽和抑制濃度の約 10 倍の acetazolamide を用いている。

実験結果に関する主な所見は次のものである。

- 1) 細胞内呼吸の結果として発生する CO_2 の水和から生成する H^+ は常時 Na^+/H^+ 交換輸送を介して細胞外へ排出されている。この交換輸送を抑制すると脱分極が起こる。脱分極の進行速度は細胞外 glucose 濃度に依存する。
- 2) CO_2 の水和反応を抑制しておくと、 Na^+/H^+ 交換輸送を抑制することによる脱分極の速さも glucose-induced depolarization の速度も共に約 1/3 に低下する。
- 3) 細胞外から流入した Ca^{2+} は主として $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送により細胞外へ排出される。細胞外 Na^+ 濃度を下げることによって $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送を抑制すると、一過性に僅かな過分極が起こり、その後脱分極する。 H^+ 生成が抑制されているとき、同様に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送を抑制すると顕著な過分極が認められる。

これらの所見から、glucose-induced depolarization には細胞内 H^+ による K^+ chan-

nel. の閉塞が主な役割を果たしていると結論している。この研究は、細胞内呼吸が炭酸脱水酵素の関与を介して膜電位変化に大きな影響を与えることを示したものであり、glucose-induced depolarizationの機構解明に重要な所見を提供したと評価される。以上の点から、本研究は学位論文として価値あるものと認める。