



研究ノート

# 脳機能障害と (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseアイソザイム

松田敏夫\*, 馬場明道

## Neuronal damage and (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase isozymes

**Key words** : (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase, ischemia, astroglia, IGF-I, proliferation

### 1. はじめに

(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseは、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>の能動輸送を行うことにより膜を隔てたNa<sup>+</sup>勾配を作る重要なイオンポンプである。本酵素により作られるイオン勾配は神経細胞の興奮性維持、細胞容積調節に重要な役割を演じているだけでなく、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換系や種々の物質の輸送系のエネルギー源として利用されている。本イオンポンプは駆動力としてATPを必要とし、脳でのそのATP消費は産生されるATPの約40%と、他組織と比べ著しく高い。一般に細胞毒性の機構の一つとしてイオン環境の変化が考えられる。神経細胞の場合、虚血、低血糖等の脳障害やグルタミン酸による神経障害の細胞毒性機構にイオンポンプを含むNa<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>の輸送系の関与が示唆されている<sup>1)</sup>。

一方、(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseには3種(α1, α2, α3)のアイソザイムが存在し、これらのアイソザイムはそれぞれ異なる役割を演じていると考えられているが、その詳細は不明である<sup>2,3)</sup>。私たちは(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseアイソザイムの病態発現における役割を追求し、in vitro脳虚血モデル系における本酵素アイソザイムの活性変化を明らかにした。本稿では、(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseアイソザイムが作用点となる新しい脳

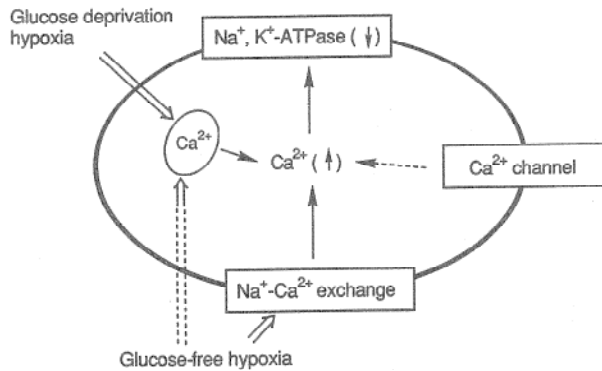
機能改善薬の開発を目指した私たちの基礎的研究を紹介する。

### 2. 脳切片の系での検討<sup>4-7)</sup>

脳虚血時あるいは虚血後に(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase活性が低下することが報告されている。この低下の機構としては、ATPの減少、本酵素の阻害物質の産生、そして本酵素自身の活性低下等が考えられるが、その詳細は不明である<sup>1)</sup>。脳虚血障害は血液循環の障害で脳組織への酸素及びグルコースの供給が不足することにより起こるが、in vivoでの本障害の機構及び薬物作用の解析は、中枢作用だけでなく末梢作用も反映されてくる為複雑となる。私たちは、インタクトな細胞構築を維持している脳切片を低酸素、グルコース欠乏の条件に暴露し、切片より調製した膜標品(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase活性を検討することによりin vitro脳虚血の本酵素に対する作用を解析した。この場合、活性測定は膜標品を用い至適条件で行っているため、活性変動の機序としてATP減少、阻害物質の産生等は除去される。低酸素、グルコース欠乏、そして酸素・グルコース欠乏いずれの条件においても切片中のATP含量は有意に減少したことから、本系はin vitro虚血モデルとして有用であると考えられる。この条件下で、脳切片(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseは処置時間に依存した活性低下を示した。脳切片(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaseは細胞内Ca<sup>2+</sup>によりdown-regulationを受ける。低酸素、グルコース欠乏の作用のCa<sup>2+</sup>依存性について調べると、それらの作用は外液Ca<sup>2+</sup>非存在下でも認められるが、細胞内Ca<sup>2+</sup>のキ



\*Toshio MATSUDA  
1949年10月17日生  
1974年大阪大学大学院薬学研究科  
修士課程修了  
現在、大阪大学薬学部薬学科、助  
教授、薬学博士、薬理学  
TEL 06-877-5111 (内線6172)



レーターの存在下では見られない。一方、酸素・グルコース欠乏の作用は外液  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しており、 $\text{Ca}^{2+}$  流入経路として  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系の重要性が示された。これらの作用の概略は図のようにまとめられ、いずれの場合も本酵素活性低下作用に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が重要な役割を演じている。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  による本酵素活性低下作用は発育とともに変化し、未成熟ラット脳切片においては酸素・グルコース欠乏の作用は見られない。このことは、未成熟ラット脳が成熟ラットのそれと比べ脳虚血障害に対して強い抵抗性を示すことと一致しており、 $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase 活性の変化が脳虚血障害の発現に関与しているという考えを支持している。脳切片標品には、ウアバイン低感受性の  $\alpha 1$  と高感受性である  $\alpha 2, \alpha 3$  の3種の  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase アイソザイムが存在するが、約80%はウアバイン高感受性アイソザイムである。脳切片  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase のウアバイン感受性は、酸素・グルコース欠乏処置後でも一定であった。又、 $\alpha 1$  アイソザイムのみから成る腎臓切片  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase は、酸素・グルコース欠乏により活性変化を示さない。従って、脳虚血障害の発現には  $\alpha 2, \alpha 3$  アイソザイムの活性低下が関与していると考えられる。神経細胞型アイソザイムである  $\alpha 2, \alpha 3$  の活性低下は、処置後切片を正常栄養液中でインキュベートすることにより回復することから、本酵素の活性低下は神経細胞死による二次的なものではなく神経細胞死の引き金になるものと考えられる。すなわち、本酵素活性の低下は、アミノ酸伝達物質の遊離促進等、 $\text{Na}^{+}$  依存性輸送系の異常を引き起こし、脳機能障害発現に関与しているものと考えられる。

### 3. 培養細胞の系での検討<sup>8,9)</sup>

脳  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase は、神経細胞だけでなくグリア細胞にも存在している。従って、脳障害における本酵素の役割を解明する上で、グリア細胞の本酵素アイソザイムの意義を明らかにすることは、神経細胞の場合と同様に重要である。先に述べたように、脳切片  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase  $\alpha 1$  アイソザイムの活性は、酸素・グルコース欠乏により変化しない。このことは、脳虚血障害においてグリア細胞  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase が神経細胞のものとは異なる役割をしていることを示唆する。私たちは、脳障害時にグリア細胞の増殖が見られることを考慮し、培養アストロサイトの増殖における本酵素の役割について検討し、種々の成長因子の中でインスリンが本酵素活性を増加させることを見いだした。インスリンの作用は本細胞に存在するインスリン様成長因子-I (IGF-I) 受容体を介しており、その作用発現には IGF-I 受容体活性化によるチロシンキナーゼの活性化が関与していた。本酵素の活性増加には一定の潜伏期が見られ、又その作用は蛋白合成阻害薬で抑制された。更に、アイソザイムに選択的な抗体を用いたウエスタンブロット解析において、 $\alpha 1$  アイソザイムの量的増加が見られた。すなわち、アストロサイト IGF-I 受容体の活性化により  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase  $\alpha 1$  アイソザイムの誘導が起こる。興味あることに、この IGF-I の作用は、増殖の盛んな若い細胞では見られるが、増殖の遅い老齢の細胞では見られない。又、IGF-I の作用は細胞増殖の抑制される条件では見られない。従って、IGF-I による  $\alpha 1$  アイソザイムの誘導はアストロサイトの増殖過程に密接に関与していると考えられる。

グリア細胞は神経成長因子、IGF-I 等の多くの成長因子を産生し、これらの因子は神経細胞の突起伸展を促進したり、又、神経細胞保護作用を有する。従って、脳障害時にグリア細胞数が増加することは、脳障害を改善する意味において重要な過程の一つと考えられる。最近、脳障害時に IGF-I の産生、遊離が増加していること、又、IGF-I に脳障害改善作用がある

こと等が報告され注目されている。私たちの成績は、IGF-Iの神経作用が $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseの誘導を介したグリア細胞の増殖と関連していることを示唆しており、グリア細胞 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseが脳機能改善薬の一つのターゲットになる可能性を示している。

#### 4. おわりに

脳切片を低酸素、グルコース欠乏の状態にすると $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseの $\alpha 2, \alpha 3$ アイソザイムの活性は低下し、又IGF-Iにより培養アストロサイトの $\alpha 1$ アイソザイムは誘導される。すなわち、脳 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseアイソザイムは脳障害発現においてそれぞれ異なる役割を演じていると考えられる。最近、 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseが作用点と考えられる脳機能改善薬が開発されつつある。私たちは、 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPaseアイソザイムをターゲットとする新しい脳機能改善薬が開発されることを夢みて、脳機能障害、そしてその修復過程における本酵素アイソザイムの役割の詳細を更に検討している。

#### 参 考 文 献

- 1) Lees, G. J. (1991) *Brain Res. Rev.*, **16**, 283-300.
- 2) Sweadner, K. J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **988**, 185-220.
- 3) 松田敏夫 (1990) *薬学雑誌*, **110**, 253-245.
- 4) Matsuda, T. and Iwata, H. (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 729-735.
- 5) Matsuda, T.; Shimizu, I. and Baba, A. (1991) *Eur. J. Pharmacol.*, **204**, 257-263.
- 6) Matsuda, T., Shimizu, I., Murata, Y. and Baba, A. (1992) *Brain Res.*, **576**, 263-270.
- 7) Matsuda, T., Shimizu, I. and Baba, A. (1992) *Brain Res.*, **572**, 349-351.
- 8) 松田敏夫, 村田陽介, 馬場明道 (1992) 第20回薬物活性シンポジウム講演要旨集, p 107-112.
- 9) 村田陽介, 松田敏夫, 馬場明道 (1992) *神経化学*, **31**, 242-243.

