自動能についての研究 (Ⅲ)

——洞結節細胞で作動する二つの Electrogenic pump——

後 藤 鹿 島, 高 橋 徳 之

宮 前 俊 一, 金 田 能 子

金沢医科大学第二生理学教室 (主任: 後藤鹿島教授)

(昭和56年1月26日 受付)

I 緒 言

Electrogenic Na-pump というのは、一般にはナトリウムポンプと呼ばれ興奮性膜に存在して、細胞内に入った Na^+ を排出して、代りに K^+ を取り入れる。能動輸送の系統を総称して呼んでいる^{1)~5), 21)}。

Na-Pump は Hodgkin & Huxley (1952)⁶⁾ 及び Weidmann (1955)⁷⁾ 等が神経筋などの Na 学説をたてた時に仮説として設立したものである。その後幾多の実験結果から、興奮性膜には必須の機能的存在としてその実在も信ぜられるようになり、化学的エネルギー代謝とむすびついて Na-K-ATPase の一環に大きな役割を演じて来た。Eccles (1957)⁸⁾ は、その実際的な模型として膜に存在する水車のようなものを図示した。 K^+ と Na^+ の交換は、電位勾配に對抗して行われ、metabolic drive を想定している。

現在、神経なども K^+ 不足の液に長くつけられていた後に K^+ の充分存在する液にもどされると、 K^+ 活性の過分極が起るが、これは Na-pump の機能亢進によるものであることが知られている⁹⁾、筋や神経などの post tetanic hyperpolarization³⁾¹⁰⁾¹¹⁾ も Na-pump の機能の高まったことで説明されている。我々が実験材料として使用している洞結節細胞にも多量の Na-pump が作用し、特に歩調取り電位の電位形成には、欠くべからざるものの1つとして研究されるようになった¹²⁾¹³⁾。

II 実験方法

実験材料は1.5~2.5kg の家兎から摘出された心臓を用いた。耳静脈より50cc の空気を入れて兎にショックを与え、開胸後ただちに心臓をとり出し、95% O_2 + 5% CO_2 の飽和させた Krebs 液中に入れ、上大静脈の右房に近い洞結節の部分以外は切りすて

る。顕微鏡下で洞結節の部分 $1.0 \times 0.5 \text{ mm}$ の大きさに dissect し、灌流バスの中に set する。バスの容量は1.0 ml で、灌流速度は、2 ml/min であった。組織は洞結節の中でも特に dominant の部分が選択され、直径 50μ のタングステン針でバスの底のシリコンラバーの上に固定され、先端が 0.1μ 以下で抵抗が20~30 M Ω の硝子製微小電極を刺すことによって歩調取り細胞の活動電位が直流増幅器に誘導された。この時使用した前置増幅器は、日本光電製の MEZ8261, main Amp は同社製 AVH9, 現象の観察に当って VC9 Oscilloscope が使用され、記録に際しては TEAC の R-260 の Tape recorder と Recti-corder とが併用された。

Krebs 液の組成は NaCl 133, NaHCO_3 15, NaH_2PO_4 1.2, KCl 5.4, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.05, glucose 5.5 mM で pH は 7.4 に調整された。使用された薬物濃度 KCl-free は Krebs 液より KCl を除去したもの、1.35 mM KCl, 10.8 mM KCl 液は Krebs 液の K 濃度をかえたもの、Rb-Krebs 液は K の代りに 10 mM RbCl, Cs-Krebs 液は K の代りに 10 mM CsCl を使用した。又 Ouabain の濃度は 10^{-5} M で g-strophanthin を使用、Ca-free は Krebs 液より CaCl_2 を除去したものをを用いた。バスの温度は心筋恒温装置を用い $35 \pm 0.5^\circ \text{C}$ の範囲に固定され、それは芝浦電気製 Thermister MGAIII で持続的に recti-corder に記録された。又同時に微分アンプにより立上りの速度も記録された。

III 実験結果

A. Na-pump の存在

Fig. 1A の示すように Na-pump は興奮性膜に存在し、metabolic drive により、そのエネルギーを得て能動的に回転し、 Na^+ を外へ K^+ を内側に運ぶ動

Fig. 1

A : Schematic diagram of Na-K pump showed by Eccles (1957)⁹⁾. The Na-K pump is combined with metabolic drive.

B : Dominant pacemaker potentials in a sinus node cell (lower trace). Upper trace shows the rate of rise of the action potential (2 V/sec). The following figures are same.

Calibration : 20mV, Time scale : 1, 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

力と考えられているが, Na^+ や K^+ が膜を通過するのは, この外にも拡散による受動的通路もあることを示している. そういった考えのもとに dominant の歩調取り電位の記録を見るのに Fig. 1 の B に緩徐脱分極の典型的な形が示されている. この電位のどの部分に Na-pump が存在するのか, その記録だけでは不明である. しかし従来の種々の報告から第3相から第4相にかけて大きな働きをしているのではないと思われる。

B. K-free 液中で前処置された洞結節細胞が K^+ 含有液にもどされた時の過分極現象

1) 標準 Krebs 液にもどされた時

Fig. 2B, にみられるように control として典型的な歩調取り電位を示す標本において KCl-free 液中につけられると初めの2~3分間には約10mVの過分極が起り, 振幅は増大, 次いで3分後に Fluctuation (Cの矢印) が始まる. この時に標準の Krebs 液中にもどすと自動能は一時停止し, 過分極を起し, 次いで自動能は段階的に一種の間をおいて回復して

Fig. 2 K-activated hyperpolarization in the sinus node cell after exchanging from the K-free to the standard solution.

A : Remarkable K-activated hyperpolarization following a momental excitation and its pause when the recovery-solution was recycled after the K-free solution. Arrow shows a small fluctuation.

B : Control and a little hyperpolarization in the K-free solution.

C : At 5 min after exchanging to the K-free solution, the recovery-solution was recycled at 5.4mM. Arrow shows a small fluctuation.

Calibration : 20mV, Time scale : 0.5, 1 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

来る. この経過を少し明確な例で示すと Fig. 2A にみられるように KCl-free 液中で振幅が漸次小となり, Fluctuation の起った後に (矢印), 5.4mM の所で標準 Krebs 液にもどされると拍動の停止に次いで10mV以上の過分極を示した後, ただちに一過性に拍動をとりもどすが又一時休止して漸次もとの拍動状態にもどる. この休止状態は明確にでない場合もある.

2) 低濃度の KCl-Krebs 液にもどされた時

KCl-free 液中につけられて2分位までは Fig. 3A にみられるように一過性の過分極があり, 更に3分後に Fluctuation の発生があり (Bの矢印), ここで1.35mM KCl-Krebs 液中で灌流させられると, 前例と同様に過分極をへて振幅一時増大, 一時減少の経

Fig. 3 K-activated hyperpolarization in the sinus node cell after exchanging from the K-free to the 1.35mM K solution.

A : A little hyperpolarization in the K-free solution.
B : Exchanging to the 1.35mM K solution at 1.35 mM. Arrow shows a small fluctuation.

C : The recovery-solution was recycled at 5.4mM. Calibration : 20mV, Time scale : 1, 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

Fig. 4 K-activated hyperpolarization in the sinus node cell after exchanging from the K-free to the 10.8mM K solution.

A : A little hyperpolarization in the K-free solution.
B : Exchanging from the K-free to the 10.8mM K solution.

C : The recovery solution was recycled at 5.4mM. Calibration : 20mV, Time scale : 0.5, 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

過をへてもとへもどるが、1.35mM にもどしてから、3分たつと再び振巾は小さくなる。5.4mM の標準液にもどして初めて安定した波型と振幅が得られる(C)。

3) 高濃度 KCl-Krebs 液にもどした時

実験処置は前二者と同じで (Fig. 4 A), Fluctuation の発生後 (矢印) に10.8mM の KCl-Krebs 液にかえると(B), 過分極も大きく起り回復するに要する時間も長めで、急激に電位があらわれ振幅は間もなく小さくなり、型もくずれて来る。5.4mM で初めて安定した状態にもどる(C)。

C. K-free 液中で前処置された洞結節細胞が Cs, Rb 含有液にもどされた時の過分極現象

K^+ に最も近い性質を有するものとして Cs^+ , Rb^+ があるが、 K^+ に代って5.4mM K と同じ強さに相当するといわれる10mM Cs, Rb を使用した。K-free 液中で脱分極されて Fluctuation の起った処で Cs-Krebs 液を灌流させると、最大20mV の過分極が40sec 間に亘ってつづき、次いで自動能を回復するが、これは長い間つづかないで停止する。5.4mM の標準液にもどすと、間をおいて急速に歩調取り電位が回復するが、その間一時停止する期間がみられた (Fig. 5A)。

10mM Rb-Krebs 液においても殆ど同じ経過を観

Fig. 5 Cs and Rb activated hyperpolarization in the sinus node cell after exchanging from K-free to Cs- or Rb- Krebs solution.

A : Cs-activated hyperpolarization after the K-free solution and the recovery solution was recycled at 5.4 mM.

B : Rb-activated hyperpolarization after the K-free solution and the recovery-solution was recycled at 5.4 mM.

Calibration : 20mV, Time scale : 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

察出来たが、この場合過分極は Cs に比して一層強かった (Fig. 5B).

D. Ca-free 液中前処置された時と Ca-free 液中で後処置された時の比較

洞結節細胞は Ca-free の Krebs 液中で灌流されると、10数分後には自動能を消失する。その瞬間が Fig. 6A に示されてある。通常小さな正弦波で終る。標本を標準 Krebs 液中にもどすと、30秒位の間に自動能が再開されるが、この際 Ca の補足によって基線が過分極状態を示すことはない。比較的速に歩調取り電位の増大することが判る。これに反して B, C 図にみられるように、初め K-free 液で処置されて5分後に Fluctuation の発生を起し、次いで Ca-free-Krebs 液に移すと過分極が起って一時拍動は停止して間もなく自動能が回復する。しかしこの時 Fluctuation はすでに消失している。

E. K-free と Ouabain で前処置された時における洞結節細胞のいま1つの電位変化

1) Ouabain 処置後の K^+ による過分極不活性強心配糖体は一般に Na-K-pump を抑制すると言われている¹⁵⁾¹⁶⁾ が、K-free で前処置2.5分後、Ouabain を2.5分間作用させた時に標準 Krebs 液中にもどす。Fig. 7A は control の型で、Bにおいて

Fig. 6 Pacemaker potential in the recovery solution after Ca-free solution and pacemaker potential in the Ca-free solution after the K-free solution.

A : Decreasing pacemaker potential and its recovery in the standard solution. Note the base line.
B : Fluctuation potential after the K-free solution and its hyperpolarization in the Ca-free Krebs solution. Note the base line.

Calibration : 20mV, Time scale : 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

Fig. 7 Fluctuation potential in the K-free or Ouabain solution and disappearance of the K activated hyperpolarization after using the Ouabain solution.

A : Control ; typical pacemaker potential.

B : Potential change in the ouabain K-free solution. The recovery-solution was recycled at 5.4mM.

C : Recovery process in the solution.

Calibration : 20mV, Time scale : 0.5, 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

Fig. 8 Disappearance of the Rb activated hyperpolarization after using the ouabain solution.

A : Control

B : Potential change in the ouabain K-free solution. The Rb-solution was exchanged at Rb.

C : The recovery solution was recycled at 5.4mM.

Calibration : 20mV, Time scale : 0.5, 1 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

K-free で前処置された標本が Ouabain の液の中に移行され、膜電位の消失寸前に Krebs 液中に移行さ

せられるのが示されている。この時 K^+ 活性による過分極がみられない。その代り Fluctuation potential の著明な状態が示されている。C は Fluctuation が停止後の経過である。

2) Ouabain 処置後の Rb^+ による過分極不活性

Fig. 8 は前と同様な実験経過に従って今度は Rb -Krebs 液を使用した。KCl-free と Ouabain で処置された液中から Rb -Krebs 液中に移すと一過性分極が起らず、一過性の歩調取り電位の回復がみられるが、これも間もなく停止する。Krebs 液にもどすと、もとの potential には、完全には復帰出来ないが振幅は小でも周期性の興奮はつづく。

F. 洞結節細胞に見られる代表的な Electrogenic pump の型

Fig. 9 は、A は K-free 液で5分間前処置された消失寸前の標本を K^+ の代用する一価イオン Rb^+ を含んだ Krebs 液にかえると強い過分極を起してその周期性を失い、1分後に急激に回復している。これが従来のいわゆる Na-pump の代表的な型である。次にBにおいては、Ouabain で処置された歩調取り電位が Fluctuation を起して、Ca-free-Krebs 液中に移動されることによって、その Fluctuation をただちに消失する。これが Na-K-pump の低下時にみられる今1つの電位変化であり、Voltage dependent, Ca-dependent の pump である。

Fig. 9 Two types of electrogenic pump.

A : Rb -activated hyperpolarization after the K-free solution.

B : Fluctuation potential evoked by the use of ouabain solution. The fluctuation was inhibited by the Ca-free solution.

Calibration : 20mV, Time scale : 5 sec and 1 min. according to the speed of the recording respectively.

IV 考 察

Electrogenic pump の存在及び機序については多くの説があり¹⁾⁻⁵⁾、 Na^+ 、 K^+ などの輸送に関しては Skou¹⁴⁾ (1957) がカニの神経線維で Na-K の輸送に ATPase なるものの存在を示した。この K^+ と酵素活性とのむすびつきを離断するものが強心配糖体であることも知られている¹⁵⁾¹⁶⁾。

Electrogenic pump の存在についてカエルの内臓神経で K-active hyperpolarization (KAH) とよばれる形で Morita & Koketzu⁹⁾、Rang & Ritchie¹⁰⁾ 等によって demonstrate され、又洞結節細胞についても Noma & Irisawa¹²⁾¹³⁾ 等によっても数年前に報告された。

この demonstrate された pump は Na^+ 、 K^+ に関する pump で K-depletion による液から、 K^+ を含んだ標準液へ移行後、又は K^+ を多量に細胞外に排出した後にみられる過分極現象である。これによって、洞結節細胞等は K^+ の conductance を増大し膜電位を復活して、再び正常に近い歩調取り電位をとりもどすこととなる。

今回の報告では、その現象が K^+ でなくても、 Rb^+ や Cs^+ でも代用のきく処に Electrogenic pump の特有な性質が現われている。

従来 Na-K-pump は興奮に際して Na^+ の細胞内進入、 K^+ の細胞外流出の結果による不均衡を、ATPase など介して積極的に Na^+ を外へ運び出し、外部の K^+ をもとへもどす作用であった。しかし洞結節の細胞の場合、膜電位の回復には、Na-K の代りに一時的に Na-Rb、或いは Na-Cs の交換でも間に合うのである。この意味は、膜電位の回復には外部環境に K^+ の必要なことは勿論であるが、それ以外に細胞間に一種の受容器様間隙 (cleft) があり、それを介しての細胞内との均衡が大きな要素となっていることを認めざるを得ない。これに類する作用をもつ処を K-cleft なる言葉で表わしている人もいる²²⁾。それと同一のものであるか否かは明らかでないが、 K^+ 活性の著明な現象として K-depletion 液に入れた最初に起る過分極現象は洞結節細胞など周期性興奮に特有にあらわれる現象で Ouabain の溶液に入れた時¹⁵⁾¹⁶⁾、あるいは O_2 不足の液、pH の低下した時²³⁾²⁴⁾ 等においても同一視される過分極現象で、Electrogenic-pump の一過性促進と見なされている。そして促進は後になって必ず低下を伴って来る。

そこで、この促進をもたらすものは何であるかを考えるのに K-depletion の直接の働きというより、K-cleft に外部環境の変動に対して pump に特異的に伝える受容器様の装置があると考えねばならない。K⁺ 及び類似のイオンは特異的に Na-K-pump とこの cleft を通じて間接にむすびついている。Ouabain 作用、O₂ 不足、pH 低下も K⁺ と同様な結果をもたらすから cleft は K に特異的とはいえない。Cleft は外溶液の K-depletion に対しては、特に敏感に働き、これを予知して pump の亢進を要求する。又ある種の外部環境変化に対しても敏感に予知して一種の保護装置となる。この保護装置は一時的には K⁺ の作用と同価の類似イオンで代用出来るがそう長くは使用出来ない。Na-K-ATPase の処で進行が停止する。それは Rb-Krebs, Cs-Krebs の中で自動能が一過性に回復して、間もなく消失して去る原因となる。Cleft は外部環境変化に対する敏感な受容器であるとともに、また K⁺ のたまり場でもある。外部 K⁺ の depletion で cleft の K⁺ が完全に放出されてしまうと再び与えられた時に、その部に K を貯蔵するのに時間的遅れを生じ、自動能が一時停止する。そしてそれを通じて Na-K-pump を活性させる。Na-K-pump の活性で cleft の K は直ちに使い果され、また K の貯蔵する過程が始まり一時的に自動能は低下してから再び活発に働くようになる。

第二の問題として、ここにあげられるのは Na-K-pump の機能低下した時に、他の形をもった Ca-dependent の pump が働くことで、これは Fluctuation potential の型で記録された。これは外液 Ca を取り除くことによって消失する。しかも potential dependent である。Eisner & Lederer^{(17)~(20)} は羊の Purkinje fibre の実験で Ouabain 使用後に起る或は K-depletion 使用後における小さな振動は、Na-K-pump の機能低下による内部 Na⁺ の蓄積といっている。この内部 Na⁺ の蓄積は、当然自動能の消失につながるが、Na⁺ の過剰のため外部 Ca⁺⁺ との交換が考えられ、Ca⁺⁺ の内向き電流を測定している。特に浅い電位で内向き電流が増大している。これら実験結果を併せ考えると、Ca-free 液中で消失する Fluctuation 電位は Na-K-pump の機能低下時に誘発される Ca-pump の亢進と考えるべきである。

V 結 語

洞結節細胞に作動する Electrogenic pump に二種みられた。すなわち兎の洞結節細胞の歩調取り電位を記録しながら、K-free で前処置した後、K⁺ 含有の代用液へもどすと、10mV 以上の過分極を起し、次の歩調取り電位の活性源となる。これは洞結節細胞に存在する Na-K-pump 活性化表現の一種で、この活性化は、Rb, Cs でも代用出来る。この pump の活性には外部環境の変化を媒介する K-cleft なる受容器様装置が存在する。今一つの型は Na-K-pump の機能低下時にみられる Fluctuation potential を主体とする電位変動の現象で voltage dependent で、Ca-dependent の Ca-pump と思われる。

文 献

- 1) Thomas, R.C.: Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 52: 564-594, 1972.
- 2) Kekut, G.A., and York, B.: The electrogenic sodium pump. Bristol: Sciencetechnica, 1971.
- 3) Kuno, M., Miyahara, J.T., and Weakly, J.N.: Post-tetanic hyperpolarization produced by an electrogenic pump in dorsal spino-cerebellar tract neurones of the cat. *J. Physiol.* 210: 839-855, 1970.
- 4) Vassalle, M.: Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. *Circ. Res.* 27: 361-377, 1970.
- 5) Brooks, C.McC., Lu, H.H.: The sinoatrial pacemaker of the heart. Springfield Ill.: Ch. C. Thomas 1972.
- 6) Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F.: The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 497-506, 1952.
- 7) Weidmann, S.: The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J. Physiol.* 127: 213-224, 1955.
- 8) Eccles, J.C.: The physiology of Nerve Cells. Johns Hopkins Press, 1957.
- 9) Morita, K. and Koketsu, K.: An analysis of the effect of adrenaline on electrogenic Na

- pump of visceral nerve fibers in Bullfrogs. *Jpn. J. Physiol.* 29 : 239-250, 1979.
- 10) Rang, H.P. and Ritchie, J.M. : On the electrogenic sodium pump in mammalian nonmyelinated nerve fibres and its activation by various external cations. *J. Physiol.* 196, 183-221, 1968.
 - 11) Den Hertog, A. : Some further observations on the electrogenic sodium pump in non-myelinated nerve fibres. *J. Physiol.* 231 : 493-509, 1973.
 - 12) Noma, A. & Irisawa, H. : Electrogenic sodium pump in rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* 351 : 177-182, 1974.
 - 13) Noma, A. & Irisawa, H. : Contribution of an electrogenic sodium pump to the membrane potential in rabbit sinoatrial node cells. *Pflügers Arch.* 358 : 289-301, 1975.
 - 14) Skou, J.C. : Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes. *Physiol. Rev.* 45 : 569-617, 1965.
 - 15) Kassebaum, D.G. : Electrophysiological effects of strophanthidin in the heart. *J. Pharmac. exp. Ther.* 140 : 329-338, 1963.
 - 16) Ellis, D. : The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibres. *J. Physiol.* 273 : 211-240, 1977.
 - 17) Eisner, D.A. & Lederer, W.J. : Inotropic and arrhythmogenic effects of potassium depleted solutions in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* 294 : 255-277, 1979 a.
 - 18) Eisner, D.A. & Lederer, W.J. : The role of the sodium in the effects of potassium depleted solutions on mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* 294 : 279-301, 1979 b.
 - 19) Eisner, D.A. & Lederer, W.J. : The relationship between sodium pump activity and twitch tension in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.* 303 : 475-494, 1980.
 - 20) Isenberg, G. : Cardiac Purkinje fibres resting action and pacemaker potentials under the influence of $(\text{Ca})_i$ as modified by intracellular injection techniques. *Pflügers Arch.* 371 : 51-59, 1977.
 - 21) Baker, P.F. & Connelly, C.M. : Some properties of the external activation site of the sodium pump in crab nerve. *J. Physiol.* 185 : 270-297, 1966.
 - 22) Eisner, D.A. and Lederer, W.J. : Characterization of the electrogenic sodium pump in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.* 303 : 441-474, 1980.
 - 23) Whereat, A.F., & Nelson, J. : Metabolic interrelations of substrate, pH, and oxygen in perfused rabbit heart. *Am. J. Physiol.* 226 : 1309-1314, 1974.
 - 24) LaManna, J.C., Saive, J.J. & Snow, J.R. : The relative time course of early changes in mitochondrial function and intracellular pH during Hypoxia in the isolated toad ventricle strip. *Cir. Res.* 46 : 755-763, 1980.

STUDIES ON THE AUTOMATISM (III)

—TWO TYPES OF THE ELECTROGENIC
PUMP IN THE SINUS NODE—KASHIMA GOTO, TOKUYUKI TAKAHASHI,
SHUNICHI MIYAMAE, TAKAKO KANEDADepartment of Physiology Kanazawa
Medical University, Ishikawa, Japan
(Director : Prof. KASHIMA GOTO)

Pacemaker cells of the isolated sinus node of the rabbit were exposed to the K-free and ouabain Krebs solution. Potentials recorded by means of a conventional microelectrode technique showed two types of electrogenic pump.

One of the pump was evidenced by the hyperpolarization which was activated by K^+ , Rb^+ and Cs^+ after applying of the K-free solution. The another was the fluctuation potential which was evoked by the K-free and ouabain solution. The former was inhibited with applying of ouabain while the latter was voltage- and Ca-dependent.

It was discussed that the K-activated hyperpolarization was caused from K-cleft, and the fluctuation from the slow inward current of Ca^{++} .

Key words : Pacemaker cell. Electrogenic-pump. K active hyperpolarization. Fluctuation potential.