

In vivo 水晶体の Ca^{2+} 濃度調節機構の数理モデル

今泉 雅資, 古嶋 正俊, 中塚 和夫, 山之内 卯一

大分医科大学眼科学講座

要 約

In vivo で水晶体が Ca^{2+} 濃度の恒常性を維持していく調節機構を明らかにすることを目的に, Ca^{2+} の能動輸送のモデル (日眼会誌94: 135-140, 1990) を基本にして, 数理モデルを考案した。数理モデルには, 細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配を考慮して, 細胞膜を横切る Ca^{2+} の外向きまたは内向きの流束を新たな因子に加え, これを用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の数値シミュレーションを行った。 Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} の外向き流束 (能動輸送) は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存して増加し, Michaelis-Menten 型の反応を示した。また, 細胞膜の Ca^{2+} 透過係数の増加は内向き流束を増加させた。以上の結果は, 現在までに行われた実験結果と定性的に一致し, 数理モデルとしての妥当性が確認された。したがって, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は, Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} の能動輸送機構の Ca^{2+} 濃度依存性と細胞膜の Ca^{2+} 透過性の2つの因子によって決定される可能性が, 理論的側面から示唆された。(日眼会誌 95: 733-737, 1991)

キーワード: 水晶体, Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase, 動力学, in vivo

A Mathematical Model of the Regulation Mechanism of Ca^{2+} Concentration in Lens in Vivo

Masamoto Imaizumi, Masatoshi Furushima, Kazuo Nakatsuka
and Uichi Yamanouchi

Department of Ophthalmology, Medical College of Oita

Abstract

In order to elucidate the regulation mechanism of homeostasis on intracellular Ca^{2+} concentration in lens in vivo, the authors proposed a new mathematical model based upon the model of Ca^{2+} active transport. The mathematical model has new factors: Ca^{2+} efflux and Ca^{2+} influx across the cell membrane related to the difference between intracellular and extracellular Ca^{2+} concentration. Changes in intracellular Ca^{2+} concentration were investigated by numerical simulation using this model. Ca^{2+} efflux (active transport) is increased with intracellular Ca^{2+} concentration and their relationship corresponds to a Michaelis-Menten reaction. Ca^{2+} influx increases with the Ca^{2+} permeable coefficient of cell membrane. These results are consistent with the experimental results in a qualitative way and indicate that the model is suitable to elucidate the regulation mechanism of intracellular Ca^{2+} concentration. From the theoretical point of view, therefore, it is suggested that intracellular Ca^{2+} concentration may depend on two factors: one is the Ca^{2+} dependence of the Ca^{2+} active transport system, the other the Ca^{2+} permeability of the cell membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 733-737, 1991)

Key words: Lens, Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase, Kinetics, In vivo

別刷請求先: 879-55 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘1-1 大分医科大学眼科学講座 今泉 雅資
(平成2年10月5日受付, 平成2年12月12日改訂受理)

Reprint requests to: Masamoto Imaizumi, M.D. Department of Ophthalmology, Medical College of Oita,
1-1 Idaigaoka, Hasama-cho, Oita-gun, Oita 879-55, Japan

(Received October 5, 1990 and accepted in revised form December 12, 1990)

I 緒 言

水晶体の混濁に関与する因子として、水晶体中の Ca^{2+} 濃度の増加があげられる¹⁾。正常の水晶体中の Ca^{2+} 濃度は、房水に比較して1/100~1/1,000倍もの低濃度に維持されているが²⁾³⁾、こうした水晶体の Ca^{2+} 濃度の調節には、主に Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} の能動輸送が関与している^{4)~6)}。我々は、これまでに水晶体の Ca^{2+} 濃度の調節機構を明らかにすることを目的に、水晶体の Ca^{2+} -ATPase の反応サイクルに注目し、 Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} の輸送とそれに共役する ATP の加水分解の過程について数理モデルを提案し、その性質をコンピュータシミュレーションによって調べてきた⁷⁾⁸⁾。その結果、このモデルは *in vitro* での水晶体における Ca^{2+} -ATPase の生化学的性質を定性的に説明することが可能であった。

しかしながら、*in vivo* 水晶体中での Ca^{2+} -ATPase の性質は、*in vitro* 水晶体の Ca^{2+} -ATPase の性質とは異なることが推測される。その理由の一つとして、*in vivo* 水晶体では細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配が常に存在し、細胞膜を横切る Ca^{2+} の外向きまたは内向きの流束が存在していることがあげられる。

以上の観点に基き、今回、我々は、*in vivo* 水晶体の Ca^{2+} -ATPase が、細胞内外の Ca^{2+} 濃度の影響を受けながら、 Ca^{2+} の輸送を行い、恒常的に至適 Ca^{2+} 濃度を維持していく過程について新たに数理モデルを提案し、コンピュータシミュレーションを行ない、*in vivo* 水晶体における Ca^{2+} 濃度の調節機構について理論的考察を行った。

II 数理モデル化の方法

Ca^{2+} -ATPase は、ATP の加水分解によって得たエネルギーを利用して、細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配に逆らいながら、 Ca^{2+} の能動輸送を行っている。今回、*in vivo* での細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節機構の数理モデル化に対して、前報⁷⁾⁸⁾で述べた *in vitro* での Ca^{2+} -ATPase 反応サイクルを基本とした。

すなわち、 Ca^{2+} -ATPase の反応サイクルを単純化し、表1のような化学反応系 (I) を組み立てた。この反応系では Ca^{2+} -ATPase は4つの状態をとると仮定した。すなわち、 Ca^{2+} 結合部位が細胞質側を向き、 Ca^{2+} に高い親和性を示す E_1 型酵素 (E_1^* を含む) と Ca^{2+} 結合部位が細胞質の外側を向き、 Ca^{2+} に低い親和性を示す E_2 型酵素 (E_2^* を含む) の状態、さらに、それ

表1 Ca^{2+} -ATPase の反応サイクルを単純化した化学反応系。 $k_1 \sim k_4$, $k_{-1} \sim k_{-4}$ は速度定数を示す。

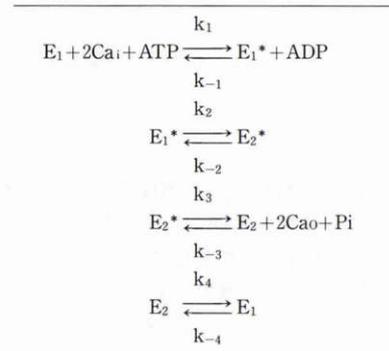


表2 Ca^{2+} -ATPase の化学反応系のシミュレーションに用いたパラメータの値。速度定数の値は全て予測値。また、リン酸化合物の細胞内濃度は文献(15)によった。

E_0 (M)	1
Ca_o (mM)	2
ATP (mM)	2.46
ADP (mM)	1.07
Pi (mM)	2.33
k_1 (s^{-1})	10^9
k_{-1} (s^{-1})	1
k_2 (s^{-1})	1
k_{-2} (s^{-1})	1
k_3 (s^{-1})	1
k_{-3} (s^{-1})	10^7
k_4 (s^{-1})	1
k_{-4} (s^{-1})	1

ぞれの酵素に Ca^{2+} 結合したリン酸化中間体 (* で表す) である。 Ca^{2+} 結合部位は Ca^{2+} -ATPase 1 分子当たり 2 個とした。また、表1に示した $k_1 \sim k_4$, $k_{-1} \sim k_{-4}$ は各々速度定数を表す。前報⁸⁾で述べたように、水晶体 Ca^{2+} -ATPase について速度定数の値は、未だ測定されていないので、前報⁷⁾⁸⁾のシミュレーションに用いた値を、*in vivo* 水晶体の Ca^{2+} -ATPase についてもそのまま用いた (表2)。

表1に示した反応サイクルより各化学種に対する反応速度式は

$$d\text{Ca}_i/dt = -k_1 E_1 \text{Ca}_i^2 \text{ATP} + k_{-1} E_1^* \text{ADP} + \text{Pca} (\text{Ca}_o - \text{Ca}_i) \quad (1)$$

$$dE_1/dt = -k_1 E_1 \text{Ca}_i^2 \text{ATP} + k_{-1} E_1^* \text{ADP} + k_4 E_2 - k_{-4} E_1 \quad (2)$$

$$dE_2/dt = k_3 E_2^* - k_{-3} E_2 \text{Ca}_o^2 \text{Pi} - k_4 E_2 + k_{-4} E_1 \quad (3)$$

$$dE_1^*/dt = k_1 E_1 Ca_1^2 ATP - k_{-1} E_1^* ADP - k_2 E_1^* + k_{-2} E_2^* \quad (4)$$

$$dE_2^*/dt = k_2 E_1^* - k_{-2} E_2^* - k_3 E_2^* + k_{-3} E_2 Ca_0^2 Pi \quad (5)$$

(1)~(5)式で与えられる。Ca, ATP, E₁, E₁*などの記号は各化学種の濃度を表わす。今回は、in vivo の系を対象とし、関与する因子の数を減らすために、細胞外Ca²⁺濃度(Ca₀)と細胞内ATP, ADP, Piの化学種の濃度は一定で、ATPの加水分解によって生成されるADP, Piは、別の反応系によって速やかにATPに合成されると仮定した(表2)。今回のモデルでは細胞内Ca²⁺濃度(Ca₁)の変化に注目し、Ca²⁺-ATPaseによるCa²⁺の能動輸送とは逆向きの受動輸送の影響も考慮した。受動輸送は細胞膜のCa²⁺透過係数(Pc_a)と細胞内外のCa²⁺濃度勾配の積によって表現した。Ca²⁺-ATPaseのとり4つの状態は速やかに定常状態(すなわち、時間的に濃度変化がなくなる状態)に移行すると仮定した。定常状態の条件は、

$$dE_1/dt = dE_2/dt = dE_1^*/dt = dE = dE_2^*/dt = 0 \quad (6)$$

と定められる。また、

$$E_0 \text{ (定数)} = E_1 + E_2 + E_1^* + E_2^* \quad (7)$$

と定め、(2)~(7)式からE₁, E₁*をE₀(定数)について数理し、その結果を(1)式に代入し、

$$\begin{aligned} dCa_1/dt = & -E_0(k_1 k_2 k_3 k_4 Ca_1^2 ATP - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} \\ & Ca_0^2 Pi ADP) / Z + Pc_a (Ca_0 - Ca_1) \\ Z = & (k_{-1} ADP + k_2) (k_3 k_4 + k_{-3} k_{-4} Ca_0^2 Pi) + \\ & (k_{-2} + k_3) (k_4 k_1 Ca_1^2 ATP + k_{-4} k_{-1} ADP) + \\ & (k_{-3} Ca_0^2 Pi + k_4) (k_1 k_2 Ca_1^2 ATP + k_{-1} k_{-2} \\ & ADP) + (k_{-4} + k_1 Ca_1^2 ATP) (k_2 k_3 + k_{-2} k_{-3} \\ & Ca_0^2 Pi) \end{aligned} \quad (8)$$

を得た。さらに、表2に示したパラメータの値を(8)式に代入、整理し、(9)式を導いた。

$$dCa_1/dt = -(2.46 \times 10^9 \times Ca_1^2 - 9.97 \times 10^{-5}) / (9.84 \times 10^9 \times Ca_1^2 + 2) + Pc_a (2 \times 10^{-3} - Ca_1) \quad (9)$$

III シミュレーションの結果

(9)式は細胞内Ca²⁺濃度(Ca₁)の時間的変化を表わす非線形微分方程式である。右辺の第1項がCa²⁺の外向きの流束を、第2項がCa²⁺の内向きの流束を表わす。この式を用いて、細胞内Ca²⁺濃度(Ca₁)、Ca²⁺の流束と細胞膜のCa²⁺透過係数(Pc_a)との間の関係について調べた。

まず、細胞内外を横切るCa²⁺の正味の流束が0となる定常状態条件を、dCa₁/dt=0とした(9)式から求め、定常状態の成立した時の細胞内Ca²⁺濃度(Ca₁)と細胞膜のCa²⁺透過係数(Pc_a)の関係を図1に示した。pCaが6以上ではPc_aはほぼ一定で低値を保っているが、pCaが6以下になるとPc_aは徐々に増加し、pCa3を漸近線にして増加していく。また、pCa3以下ではPc_aは負の値をとった。

次に、(9)式よりCa²⁺の外向きの流束の項を抜きだして、注目してみると、

$$dCa_1/dt = -(2.46 \times 10^9 \times Ca_1^2 - 9.97 \times 10^{-5}) / (9.84 \times 10^9 \times Ca_1^2 + 2) \quad (10)$$

(10)式より、Ca²⁺の外向きの流束のCa²⁺濃度依存性は、in vitro モデルの中で取り扱ったdPi/dtの式(文献8の(12)式)と似た形をとっている。しかしながら、そのCa²⁺濃度依存性を調べると、図2のように、Ca²⁺の外向きの流束は細胞内Ca²⁺濃度の上昇に伴い増加し、in vitro のCa²⁺-ATPase活性(細胞内Pi濃度)が高Ca²⁺濃度領域では低下する⁸⁾のとは異なるパターンをとった。このことは、(10)式より、Ca²⁺の外向きの流束は(細胞内Ca²⁺濃度)²に対して双曲線の形(Michaelis-Menten型の反応)を示すことから分かる。また、Ca²⁺の内向きの流束についても、Pc_aが変化した場合を図2に示したが、細胞膜のCa²⁺透過係数の値が上昇すると内向きの流束も増加することが分かる。さらに、図1に示した定常状態は、図2では外向きの流束と内向きの流束の交点によって示され、Pc_aの上昇により細胞内Ca²⁺濃度が増加していくことがより明確になった。

最後に、細胞内Ca²⁺濃度が一過性に増加した後に、Ca²⁺濃度が一定の状態に移行していく過程を、数値シミュレーションによって調べた。方法は、(9)式をパーソナルコンピュータ(EPSON PC-286VF)を用い、ルンゲクッタ法⁹⁾によって近似的に数値解を求め、細胞内Ca²⁺濃度の経時変化とした。初期値は、時刻0秒の時、細胞内Ca²⁺濃度を10⁻³Mとした。また、Pc_a=0.1cm.s⁻¹(pCa7, 0が定常状態となる条件を図1により求めた)と定めた。プログラム言語はBASICによって記述した。計算結果を図3に示したが、細胞内Ca²⁺濃度は時間とともに減少し、定常状態に移行していく過程が分かる。pCaが5以下ではCa²⁺濃度は時間とともに急速に下降していくが、pCaが7に近づくにつれ減少の程度は小さくなった。

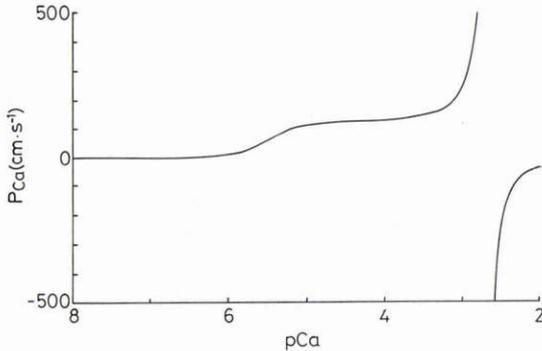


図1 定常状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度 (pCa) と細胞膜の Ca^{2+} 透過係数 (P_{Ca}) との関係、曲線は(9)式より $d\text{Ca}_i/dt=0$ を解いて求めた理論曲線である。

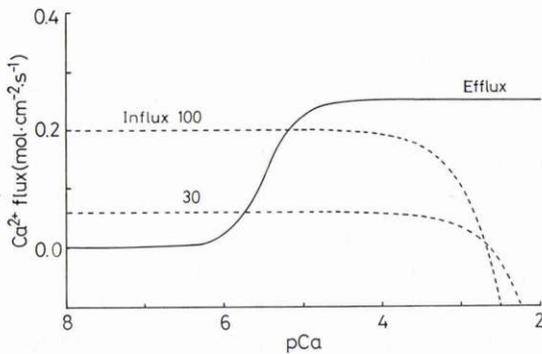


図2 Ca^{2+} の外向きの流束、内向きの流束と、細胞膜の Ca^{2+} 透過係数 (P_{Ca}) との関係、外向きの流束は実線で、内向きの流束は破線で示した。各曲線は(9)、(10)式より求めた理論曲線である。破線に添えた数字は P_{Ca} の値で、これが上昇すると内向きの流束も増加する。

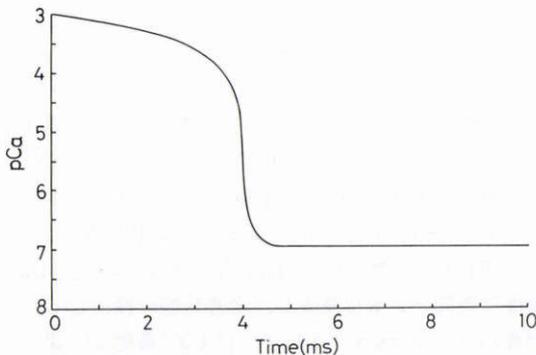


図3 一過性に上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度が、定常状態に戻る過程。曲線は(9)式に基づく理論曲線である。初期値 $p\text{Ca}=3$, $P_{\text{Ca}}=0.1\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ とした。

IV 考 按

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} 濃度勾配に従い拡散によって細胞外から細胞内へ流入する受動輸送と、ATPの加水分解によって得た化学的エネルギーに依存して、濃度勾配に逆らい細胞内 Ca^{2+} を流出する能動輸送の2つの因子によって規定されていると考えられる。以下、こうした特性が数理モデルの中でどのような形で表現されているか検討した。

水晶体における受動輸送は、細胞膜に Ca^{2+} チャンネルの存在が確認されていないが、非特異的なイオンチャンネルを通じて Ca^{2+} が細胞内へ流入することが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。したがって、細胞膜の Ca^{2+} 透過係数は、非特異的なイオンチャンネルの開閉の確率によって規定されていると考えられる。我々は、(9)式より定常状態の成立した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ca_i) と細胞膜の Ca^{2+} 透過係数 (P_{Ca}) のあいだの関係を求め、細胞内 Ca^{2+} 濃度を低値に保つためには、細胞膜の Ca^{2+} 透過係数が低いこと、すなわちイオンチャンネルが活性化する確率が低いことが必要条件であることを示した(図1)。一方、細胞内 Ca^{2+} は膜の安定化に重要で、 Ca^{2+} 以外の様々な陽イオンの膜透過性と関係があり^{11)~13)}、老化に伴い水晶体の細胞内の Na^+ や Ca^{2+} などのイオン濃度が増加するのは、 Ca^{2+} によってイオンチャンネルが活性化されやすくなるためとも考えられている。以上の考察より、細胞膜の Ca^{2+} 透過係数が Ca^{2+} 及び Ca^{2+} 以外の細胞内イオン濃度の調節に関与している可能性が推測された。

一方、水晶体における能動輸送は、主に Ca^{2+} -ATPase が関与して細胞内 Ca^{2+} を細胞外に排出している。今回、*in vivo* の数理モデルの解析から、 Ca^{2+} の外向きの流束は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に対して Michaelis-Menten 型の反応を示すことが分かった。このことは、前報⁸⁾ の *in vitro* 数理モデルから得られた Ca^{2+} -ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度依存性と、一見すると矛盾するような印象を与える。しかし、このことは、*in vitro* と *in vivo* では数理モデル化のためにとった方法が、はっきりと異なるためである。方法の相違点としては、1) *in vitro* のモデルでは、実験系^{4)~6)} に従って、細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配を考慮せずに、ATPの加水分解による P_i の生成速度を Ca^{2+} -ATPase 活性の指標とした。2) *in vivo* のモデルでは、実際の細胞内の状態を推定し、条件を設定した。すなわち、細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配を考慮し、内外の Ca^{2+} の移動に注

目した。また、解糖系によってADPとPiからATPの再合成が速やかに行なわれ細胞内のリン酸化合物の濃度に変動がないとした、Ca²⁺-ATPase活性の指標としては、Piの生成速度の代わりに能動輸送によるCa²⁺の外向きの流束を用いた。したがって、上記の異なる結果は、Ca²⁺-ATPaseが、Ca²⁺の動態に対してin vitroとin vivoでは異なる特性を示すことを意味するのではなく、むしろ、in vitroでの実験結果がそのままin vivoでのCa²⁺-ATPaseの反応特性(Ca²⁺の能動輸送)を必ずしも直接反映するのではないことを示唆していると考えられる。

生体内では、しばしば細胞内Ca²⁺濃度がパルス状に反復して増加減少のサイクルを繰り返すという現象¹⁴⁾が知られているが、水晶体においてもこうした現象が生じているであろう。この現象は、おそらく、イオンチャンネルが活性化されCa²⁺が細胞内へ流入し、一過性にCa²⁺透過係数が上昇し細胞内Ca²⁺濃度が増加した後、チャンネルが再び閉じてCa²⁺透過係数が元に戻り定常状態の細胞内Ca²⁺濃度へと移行していく過程と推測される。そこで、これらの過程をシミュレーションしてみたが(図3)、得られた細胞内Ca²⁺濃度の経時的变化からも、細胞内Ca²⁺濃度の増加により、Ca²⁺-ATPase活性が上昇し、Ca²⁺の外向きの流束が増加する効果が作用していると考えられた(図2)。

以上の考察より、細胞内Ca²⁺濃度の調節は、調節のための上位機構がなくとも、Ca²⁺能動輸送機構のCa²⁺濃度依存性と細胞膜のCa²⁺透過性の安定性という2つの因子によって行われることが理論的に説明できると結論された。

本研究は文部省科学研究費補助金(課題番号01771425, 02857247)の補助を受けた。付記して感謝の意を表す。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 岩田修三, 竹鼻 真, 中村正雄: ヒト白内障水晶体の生化学的研究. 第1報. 水晶体混濁状態におけるヒトと動物との陽イオン変動の比較. 眼紀 29: 362-368, 1978.
- 2) Iwata S: Process of lens opacification and membrane function: A review. Ophthal Res 6: 138-154, 1974.
- 3) Hightower KR, Duncan G, Harrison SE:

Intracellular calcium concentration and calcium transport in the rabbit lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1032-1034, 1985.

- 4) Hightower KR, Leverenz V, Reddy VN: Calcium transport in the lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 1059-1066, 1980.
- 5) Iwata S, Shirai E, Takehana M: Activator of Ca²⁺-transport in the lens. Curr Eye Res 3: 717-721, 1984.
- 6) Borchmann D, Delamere NA, Paterson CA: Ca-ATPase activity in the rabbit and bovine lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 982-987, 1988.
- 7) 今泉雅資, 古嶋正俊, 中塚和夫, 他: 水晶体Ca²⁺-ATPase活性に対するATPの効果—シミュレーションによる解析—. あたらしい眼科 6: 1847-1850, 1989.
- 8) 今泉雅資, 古嶋正俊, 中塚和夫, 他: 水晶体のCa²⁺濃度調節機構に関する理論的考察—Ca²⁺-ATPase活性のCa²⁺濃度依存性—. 日眼会誌 94: 135-140, 1990.
- 9) 近藤次郎: 応用数学1. 常微分方程式. 東京, 培風館, 161-179, 1979.
- 10) Christensen D: Medication of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. Nature 330: 66-68, 1987.
- 11) Duncan G, Hightower KR, Grandolfi SA: Human lens membrane cation permeability increases with age. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1855-1859, 1989.
- 12) Cooper KE, Tang JM, Rae JL, et al: A cation channel in frog lens epithelia responsive to pressure and calcium. J Memb Biol 93: 259-269, 1986.
- 13) Lucas VA, Duncan G, Davies PD: Membrane permeability characteristics of perfused human senile cataractous lenses. Exp Eye Res 42: 151-165, 1986.
- 14) Niall M, Woods KS, Cuthbertson R, et al: Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. Nature 319: 600-602, 1986.
- 15) Greiner JV, Kopp SJ, Mercola JM, et al: Organophosphate metabolites of the human and rabbit crystalline lens: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis. Exp Eye Res 34: 545-552, 1982.