

令和元年6月24日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08565

研究課題名(和文) ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送システムの血管機能制御と病態形成における役割の解明研究課題名(英文) Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transporter in vascular function and vascular diseases

研究代表者

喜多 紗斗美 (Kita, Satomi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：10461500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ATP産生部位であるミトコンドリアは、細胞質Ca<sup>2+</sup>の貯蔵場所としても働く。これまでに、ミトコンドリアNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体(NCLX)遺伝子欠損マウスを開発し、低濃度アゴニストによる血管収縮反応が特徴的に抑制されることを見出した。本研究では、遺伝子改変マウスおよびCa<sup>2+</sup>センサーの作製により、血管機能調節におけるミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送体の分子制御機構の解明を試みた。MCU欠損マウスの血管収縮反応は野生型マウスと同程度であり、Ca<sup>2+</sup>汲み出しが重要であることが示された。さらに、これら遺伝子改変マウスを用いた各種血管病モデルの作製により、その病態機序にNCLXが関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアはATPを産生する重要なオルガネラであるとともに、アポトーシスの誘導、活性酸素種(ROS)の生成など、細胞の生死に関わる多彩な機能を担っている。ミトコンドリアの形態や機能の変化と細胞機能や病態への関与など多くの研究がなされているが、ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>動態とその機能的役割についてはこれまで明らかになっていない。本研究により、ミトコンドリアから細胞質へのCa<sup>2+</sup>放出が平滑筋収縮に機能的に働くことが示された。また、NCLXを介したCa<sup>2+</sup>放出が血管病に関与することが分かり、血管病の治療標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria, the crucial organelle in ATP production, can act as a Ca<sup>2+</sup> sink. Ca<sup>2+</sup> enters mitochondria mainly via MCU, a mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter, and is extruded by mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCLX). We created NCLX knockout mice and organelle-specific Ca<sup>2+</sup> sensor to study the role of NCLX in vascular function and vascular diseases. Phenylephrine-induced vasoconstriction were suppressed in NCLX knockout mice compared with wild-type and MCU knockout mice. In this study, we also found that mitochondrial Ca<sup>2+</sup> efflux via NCLX contribute to pathophysiology in vascular diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：ミトコンドリア Ca輸送体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋細胞において、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態は、筋収縮、細胞の分化や増殖などの細胞機能に重要な役割をしており、細胞膜やオルガネラに発現する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや輸送体により精密に制御されている。平滑筋細胞にアゴニストなどの刺激が入ると、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介して細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、それによって筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が惹起される。その後、増加した  $\text{Ca}^{2+}$  は細胞膜の  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (NCX) や  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプによって細胞外に汲み出されたり、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプによって筋小胞体に取り込まれたりして、増加した細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が元のレベルに戻り、筋収縮などの反応が終結する。

ミトコンドリアは ATP を産生する重要なオルガネラであるとともに、アポトーシスの誘導、活性酸素種 (ROS) の生成など、細胞の生死に関わる多彩な機能を担っている。また、ミトコンドリアは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を緩衝するために高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  を貯蔵できることが報告されている。ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増大すると、ATP 産生やアポトーシスが促進することが知られているが、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  のミトコンドリアへの取り込みや、ミトコンドリアから細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  放出が、細胞の生理機能や病態にどのように関与しているのかはよく理解されていない。ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、 $\text{Ca}^{2+}$  流入系と  $\text{Ca}^{2+}$  排出系のミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体の輸送バランスによって制御されているが、近年、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  輸送に関わる構成分子が相次いで同定された。ミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、主にミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  ユニポーター (MCU) が関与していること (Nature 476:336-340, 2011)、また、ミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  排出には、ミトコンドリア  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (NCLX) が重要な役割を果たすことが報告された (PNAS 107:436-441, 2010)。最近、MCU 欠損マウスの特徴が報告されたが、心血管機能はほぼ正常であり、心筋虚血/再灌流障害に対して保護的であることが示された (Nat Cell Biol 15:1464-1472, 2013; Cell Reports 12:15-22, 2015)。一方、NCLX 欠損マウスの血管系における表現型については未だ報告がない状況であり、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体 (MCU, NCLX) の生理学的・病態学的役割についてはまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

血管平滑筋の収縮や血管平滑筋細胞の分化・増殖において、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが重要であることは以前よりよく知られているが、近年では、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが時間的および空間的に巧みに制御されており、生理機能の発現・制御や病態形成に重要な役割をしていると考えられている。ミトコンドリアは ATP 産生の場としてだけでなく、 $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫としての役割もしており、細胞の生死を司る重要なオルガネラとして注目されている。特に、血管系での ATP 産生や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節は平滑筋収縮機能の維持に必須である。ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構の解明は血管系の機能維持や病態生理を理解する上で重要であり、血管病の創薬標的としても非常に興味深い。本研究では、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体 (MCLX, MCU) の遺伝子改変マウスおよびミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブを作製し、血管平滑筋細胞におけるミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  動態が血管機能や血管病にどのように関与するのかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) NCLX 遺伝子欠損マウスの作製

NCLX の野生型ゲノム断片をクローニングし、その exon1 および exon2 にネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を挟んだ配列を挿入した相同組換え用のターゲティングベクターを構築した。ES 細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組換えを起こした ES 細胞を選択して、常法に従いマウス初期胚に導入し、キメラマウスを得た。キメラマウスと C57BL/6J マウスとの交配により NCLX ヘテロマウスを得た。さらにヘテロマウス同士の交配により、NCLX ホモノックアウトマウスを得た。遺伝子欠損の確認は、尻尾より抽出したゲノム DNA を用い、PCR 法により解析した。さらに、野生型およびホモノックアウトマウスの胸部大動脈を摘出し、定量的リアルタイム PCR を行い、ホモノックアウトマウスの血管において NCLX 遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていることを確認した。また、平滑筋  $\alpha$ -アクチンプロモーターを用いることにより、血管平滑筋特異的 NCLX 高発現マウスを作製した。

#### (2) MCU 遺伝子改変マウスの作製

MCU の野生型ゲノム断片をクローニングし、その exon5 および exon6 にネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を挟んだ配列を挿入した相同組換え用のターゲティングベクターを構築した。ES 細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組換えを起こした ES 細胞を選択して、常法に従いマウス初期胚に導入し、キメラマウスを得た。キメラマウスと C57BL/6J マウスとの交配により MCU ヘテロマウスを得た。さらに、ホモノックアウトマウスを得るためにヘテロマウス同士を交配したが、MCU ホモノックアウトマウスは胎生致死であった。したがって、実験には MCU ヘテロマウスを用いた。遺伝子欠損の確認は、尻尾より抽出したゲノム DNA を用い、PCR 法により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) アゴニスト収縮反応におけるミトコンドリア $\text{Ca}^{2+}$ 制御機構の関与

NCLX ノックアウトマウスは成獣まで成長し、体重、無麻酔下での収縮期血圧および心拍数は野生型マウスと比較してほとんど差がなかった。野生型およびホモノックアウトマウスの胸部大動脈を摘出し、定量的リアルタイム PCR を行い、ホモノックアウトマウスの血管において

NCLX 遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていることを確認した。また、MCU、SERCA2 および RyR2 の遺伝子発現についても解析したが、両マウス間で有意な差はみられなかった。NCLX ノックアウトマウスに麻醉下で  $\alpha_1$  受容体アゴニストを静脈内投与したときの血圧の上昇は、野生型マウスに比べて有意に低下した。NCLX ノックアウトマウスの大動脈リング標本を用いて  $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮反応を比較したところ、その用量反応曲線は野生型マウスに比べて右側にシフトしており、NCLX ノックアウトマウスでは  $\alpha_1$  受容体アゴニストに対する血管収縮反応が低下することが分かった。一方、MCU ノックアウトマウスを用いて同様の検討を行った結果、MCU ノックアウトマウスでは  $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮が野生型マウスと同程度であった。これらの結果より、NCLX がアゴニストによる血管収縮に関与していることが示された。また、 $\alpha_1$  受容体アゴニスト刺激時の血管平滑筋の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を測定したところ、 $Ca^{2+}$ -free 条件下での細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が NCLX ノックアウトマウスの大動脈で抑制された。また、カフェイン添加時の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇も NCLX ノックアウトマウスで低下したことから、筋小胞体の  $Ca^{2+}$  の低下が  $\alpha_1$  受容体アゴニスト収縮抑制の機序の一つであると考えられる。また、NCLX ノックアウトマウスを用いて幾つかの血管病モデルを作製したところ、野生型マウスの場合と比べて病態の進行に有意な差がみられたことから、現在詳細なメカニズムを解析中である。

## (2) 蛍光 $Ca^{2+}$ センサーを用いたオルガネラ $Ca^{2+}$ の測定

オルガネラ蛍光  $Ca^{2+}$  センサー (CEPIA) の変異部位およびミトコンドリア・筋小胞体局在配列 (*Nat Commun* 5:4153, 2014) を高蛍光強度・高速の赤色  $Ca^{2+}$  センサー-R-CaMP2 (*Nat Methods* 12:64-70, 2015) に導入・付加することにより、改良型 CEPIA (R2-CEPIAmt, R2-CEPIAer) を独自に作製した。これら  $Ca^{2+}$  センサーを血管平滑筋細胞 A7r5 に導入し、細胞質 (緑色 GCaMP6) - ミトコンドリア (赤色 R2-CEPIAmt) 間および細胞質 (緑色 GCaMP6) - 筋小胞体 (赤色 R2-CEPIAer) 間の  $Ca^{2+}$  シグナルの 2 色同時測定を行い、細胞質  $Ca^{2+}$  とオルガネラ  $Ca^{2+}$  の同時測定が可能であることを検証した。本研究期間中に R2-CEPIAmt、R2-CEPIAer および GCaMP6 を血管平滑筋特異的に発現導入した可視化マウスを作製した。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 10 件 )

Moriguchi S, [Kita S](#), Fukaya M, Osanai M, Inagaki R, Sasaki Y, Izumi H, Horie K, Takeda J, Saito T, Sakagami H, Saido TC, Iwamoto T, Fukunaga K. Reduced expression of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers is associated with cognitive deficits seen in Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, 131:291-303, 2018. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.037.

Moriguchi S, [Kita S](#), Yabuki Y, Inagaki R, Izumi H, Sasaki Y, Tagashira H, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Fukunaga K. Reduced CaM Kinase II and CaM Kinase IV Activities Underlie Cognitive Deficits in NCKX2 Heterozygous Mice. **Mol Neurobiol**, 55(5):3889-3900, 2018. 査読有

DOI: 10.1007/s12035-017-0596-1.

Bai X, Ihara E, Hirano K, Tanaka Y, Nakano K, [Kita S](#), Iwamoto T, Ogino H, Hirano M, Oda Y, Nakamura K, Ogawa Y. Endogenous hydrogen sulfide contributes to tone generation in porcine lower esophageal sphincter via  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 5(3):209-221, 2017. 査読有

DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.11.004.

Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, [Kita S](#), O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M. A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. **Sci Rep**, 7(1):3855, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-03994-1.

Nishiyama K, Tanioka K, Azuma YT, Hayashi S, Fujimoto Y, Yoshida N, [Kita S](#), Suzuki S, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T.  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger contributes to stool transport in mice with experimental diarrhea. **J Vet Med Sci**, 79(2):403-411, 2017. 査読有

DOI: 10.1292/jvms.16-0475.

Tashiro M, Watanabe Y, Yamakawa T, Yamashita K, [Kita S](#), Iwamoto T, Kimura J. Suppressive effect of carvediol on  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange current in isolated guinea-pig cardiac ventricular myocytes. **Pharmacology**, 99(1-2):40-47, 2017. 査読有

DOI: 10.1159/000450753.

Fujimoto Y, Hayashi S, Azuma YT, Mukai K, Nishiyama K, [Kita S](#), Morioka A, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Overexpression of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger 1 display enhanced relaxation in the gastric fundus. **J Pharmacol Sci**, 132(3):181-186, 2016. 査読有

DOI: 10.1016/j.jphs.2016.10.003.

Yamashita K, Watanabe Y, [Kita S](#), Iwamoto T, Kimura J. Inhibitory effect of YM-244769, a novel  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger inhibitor on  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange current in guinea pig cardiac ventricular

myocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 389(11):1205-1214, 2016. 査読有

DOI: 10.1007/s00210-016-1282-y

Nishiyama K, Azuma YT, Morioka A, Yoshida N, Teramoto M, Tanioka K, Kita S, Hayashi S, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Roles of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoforms NCX1 and NCX2 in motility in mouse ileum. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 389(10):1081-1090, 2016. 査読有

DOI: 10.1007/s00210-016-1271-1.

Wei J, Watanabe Y, Takeuchi K, Yamashita K, Tashiro M, Kita S, Iwamoto T, Watanabe H, Kimura J. Nicorandil stimulates a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger by activating guanylate cyclase in guinea pig cardiac myocytes. **Pflugers Arch**, 468(4):693-703, 2016. 査読有

DOI: 10.1007/s00424-015-1763-8.

〔学会発表〕(計5件)

喜多紗斗美、田頭秀章、岩本隆宏、ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>輸送体の心血管病発症機序への関与、第134回日本薬理学会近畿部会、2018年11月、大阪

三木 瞳、田頭秀章、岩本隆宏、喜多紗斗美、低酸素誘発肺高血圧症におけるミトコンドリア Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体の関与について、第13回トランスポーター研究会年会、2018年7月、福岡

S. Kita, H. Tagashira, T. Iwamoto. Functional analysis of vascular Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers using genetically engineered mice. 18th World congress of basic and clinical pharmacology. 2018年7月、京都。

喜多紗斗美、田頭秀章、岩本隆宏、血管平滑筋 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体の肺高血圧症における役割について、第10回トランスポーター研究会九州部会、2017年9月、熊本

喜多紗斗美、田頭秀章、永田 旭、阿部弘太郎、岩崎昭憲、岩本隆宏、低酸素誘発性肺高血圧症における血管平滑筋 NCX1 の関与、第132回日本薬理学会近畿部会、2017年11月、大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：奥田 裕子

ローマ字氏名：Hiroko Okuda

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：特定助教

研究者番号（8桁）：30709663

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。