

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007. 4. 1～2010. 3. 31  
 課題番号：19790171  
 研究課題名（和文）  
 褐色脂肪細胞でのミトコンドリアと滑面小胞体間のカルシウムカップリング機構  
 研究課題名（英文）  
 Calcium coupling between mitochondria and Endoplasmic Reticulum in brown adipocytes  
 研究代表者  
 日暮 陽子（HIGURE YOKO）  
 名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教  
 研究者番号：30325633

## 研究成果の概要（和文）：

単離培養褐色脂肪細胞のミトコンドリアと滑面小胞体間でのカルシウムカップリング機構について、褐色脂肪細胞へのノルアドレナリン  $\beta_3$  受容体の活性化（ $\beta$  作用）によってミトコンドリアからのカルシウム遊離が起こり、それによる細胞内カルシウム濃度の上昇が、PLC の活性化による細胞内カルシウム濃度上昇と ER からのカルシウム流出を起し、さらに細胞外からのカルシウム流入を引き起こすことがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

In brown adipocytes, activation of  $\beta_3$ -adrenergic causes mitochondria depolarization that causes  $\text{Ca}^{2+}$  releases from mitochondria, which further elicit CICR from the ER under the actions of locally produced  $\text{IP}_3$ . The resultant depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  in the ER activates store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,772,586 円	0 円	1,772,586 円
2008 年度	527,414 円	158,224 円	685,638 円
2009 年度	600,000 円	180,000 円	780,000 円
年度			
年度			
総計	2,900,000 円	338,224 円	3,238,224 円

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：褐色脂肪細胞・ミトコンドリア・滑面小胞体・カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアでの生体エネルギー分子である ATP は、TCA サイクルでの NADH 及び FADH<sub>2</sub> の産生からミトコンドリア内膜の電子伝達系と ATP シンターゼにより酸化リン酸化により合成される。この NADH 及び FADH<sub>2</sub> の産生には、

$\text{Ca}^{2+}$  が不可欠である。又、ミトコンドリアは、細胞質内の速い  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝機構として働き、急激な細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  を緩和する働きをするが、最近では滑面小胞体（ER）からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の制御やそれに続く細胞膜での容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入の維持（取り込み抑制による ER の  $\text{Ca}^{2+}$  枯

渴の維持)に関与することが示唆されている。

褐色脂肪細胞は、密な交感神経支配を受け、多くのミトコンドリアを持つ、発熱器官である。その $\beta_3$ 受容体の活性化は中性脂質の分解、TCAサイクルの活性化、更に産生された脂肪酸による脱共役タンパク質であるUCP1の活性化により、強力な発熱に至る。一方、 $\alpha_1$ 受容体の活性化は $IP_3$ を産生し、滑面小胞体(ER)からの $Ca^{2+}$ 放出を起し、それに伴い細胞外から容量性 $Ca^{2+}$ 流入を起し、細胞質 $Ca^{2+}$ 濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )の上昇を起す。このように、交感神経から放出されたノルアドレナリンは $\beta_3$ 受容体と $\alpha_1$ 受容体の活性化を介して、熱産生を有効に行えるように働いている。この機序には、ミトコンドリアとER間の密接な $Ca^{2+}$ を介する連関が働いていることが考えられる。最近の申請者らの実験から、ミトコンドリアの脱共役による $Ca^{2+}$ 遊離によるERからの $Ca^{2+}$ 遊離とERからの $Ca^{2+}$ 遊離によるミトコンドリアからの $Ca^{2+}$ 遊離が起こる両方向性のカップリングの存在が明らかになり、さらにERからの $Ca^{2+}$ 遊離による容量性 $Ca^{2+}$ 流入とミトコンドリアの脱共役に直接関連した細胞膜での $Ca^{2+}$ 流入が起こることが解っている。

## 2. 研究の目的

本研究では、褐色脂肪細胞のミトコンドリアとERがどの様に $Ca^{2+}$ を相互に制御しているかを正常マウスと肥満マウスで明らかにする。この目的の為に、褐色脂肪細胞の細胞質、ミトコンドリア、ERに $Ca^{2+}$ イメージング法を応用し、同時にミトコンドリアの膜電位変化や $FADH_2$ の蛍光を測定し、ミトコンドリアの酸化リン酸化の変化を記録する。ミトコンドリアとERの $Ca^{2+}$ 濃度変化は、 $Ca^{2+}$ 感受性タンパク質(cameleon)を特異的に発現させることにより測定する。

具体的には、①ミトコンドリア内膜の脱分極によるERからの $Ca^{2+}$ 遊離の活性化機構、②ERからの $Ca^{2+}$ 遊離によるミトコンドリアからの $Ca^{2+}$ 遊離及び取り込みの活性化機構、高脂肪食飼育(7週間)マウスと肥満予防効果がある胆汁酸飼育(7週間)マウスの褐色脂肪細胞における①と②の機構変化を調べる。

## 3. 研究の方法

褐色脂肪細胞の単離培養：

WKAH rat 4週齢オスを $5^\circ C$ の環境下で5-7時間飼育後、肩甲骨間の褐色脂肪組織を摘出し、酵素処理にて細胞を単離した。

蛍光測定：

細胞内カルシウム濃度変化はカルシウム感受性蛍光色素Fura-2/AMを $37^\circ C$ で30-50分負荷し、励起光340-380 nm・蛍光520 nmにより測定した。ミトコンドリア膜電位変化は、Rhodamin123を負荷、励起光480 nm・蛍光515 nmにより測定した。また、ミトコンドリア内カルシウム濃度変化は、Rhod-5N/AMを用い、励起光550 nm・蛍光580 nmにより測定した。

滑面小胞体内カルシウム濃度変化測定：

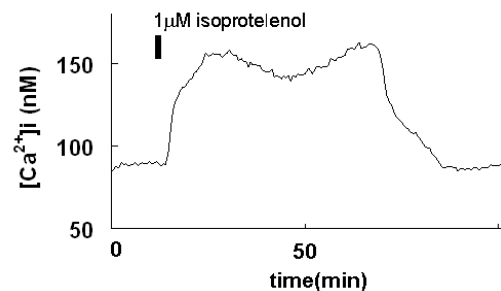
カルシウム感受性蛍光タンパク質(cameleon)を褐色脂肪細胞に発現させ、励起光440 nm・蛍光485 nm / 535 nmにより測定した。

## 4. 研究成果

褐色脂肪細胞における $\beta$ 作用：

ノルアドレナリン $\beta$ 受容体作動薬であるイソプロテレノールを褐色脂肪細胞に投与することによって、ミトコンドリア膜電位の脱分極が起こり、細胞内カルシウム濃度の上昇がした。これは、 $\beta$ 受容体の活性化によりACが活性化し、cAMPが産生される。それにより、褐色脂肪細胞では中性脂肪から遊離脂肪酸が産生され、脱共役タンパク質UCPを活性化する。UCPの活性化により、ミトコンドリア膜での $H^+$ の濃度勾配が短絡により、ミトコンドリア内に $H^+$ が流入する。この短絡に伴って、褐色脂肪細胞では熱産生が起こる( $\beta$ 作用)。また、その際にはミトコンドリア膜電位は脱分極する。

図1 イソプロテレノールによる細胞内カル



シウム濃度変化

この上昇は2層性であった(図1)。1層目の上昇は $\beta_3$ 受容体の活性化によって、ミトコンドリア膜電位が脱分極し、それに伴うミトコンドリアからのカルシウム遊離であった。2層目の上昇はミトコンドリアから遊離したカルシウムが滑面小胞体からのカルシウム遊離を起し、その結果細胞外からSOCによるカルシウム流入あることが分かった。2層目の上昇は、PLC活性の阻害薬であるU-73122を存在させることで、抑制されることから、

ミトコンドリアからのカルシウム遊離は、細胞内で  $IP_3$  を産生し、その  $IP_3$  が滑面小胞体からのカルシウム遊離をさらに起こすことが示唆された。

$\beta$  作用に対する滑面小胞体内のカルシウム濃度変化：

イソプロテレノール投与において、滑面小胞体内のカルシウム濃度は減少した。(図2)

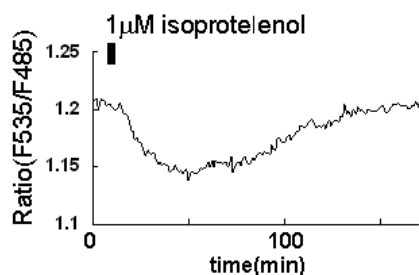


図2 イソプロテレノール投与による滑面小胞体内のカルシウム濃度変化

$\beta$  作用によるミトコンドリア内カルシウム濃度変化：

ミトコンドリア内のカルシウム濃度変化は、高親和性カルシウム蛍光色素である Rhod-5N/AM を用いて測定した。この色素での測定では脱共役剤である FCCP を投与し、カルシウム濃度変化が減少することを確認した (FCCP 投与ではミトコンドリアからのカルシウム遊離が起こるため)。 $\beta_3$  受容体の特異的な BRL37344 の投与はミトコンドリア内のカルシウム濃度を減少させたこのことにより、 $\beta$  作用時にミトコンドリア内より細胞質にカルシウム遊離が起こっていることが示唆された。

本研究では、 $\beta$  作用時の細胞内カルシウム濃度変化、滑面小胞体内カルシウム濃度変化そしてミトコンドリア内カルシウム濃度変化を個々に測定した。これらの結果により、褐色脂肪細胞は、ミトコンドリア-滑面小胞体間でカルシウムのカップリングが起こっていること。さらに細胞外よりカルシウム流入を起こすことが示唆された。今後、 $\beta$  作用時におけるそれぞれのカルシウム濃度濃度変化を同時に測定し、直接変化のふるまいを比較する必要があると考えた。

また、褐色脂肪細胞での  $\beta$  作用におけるカルシウムカップリング機構が、正常マウス及び肥満マウスでどのような違いを持つかを明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計5件)

- ① R. Hayato, Y. Higure, M. Kuba, H. Nagai, K. Kuba,  $Ca^{2+}$  entry activated by  $\beta$ -adrenergic mitochondrial uncoupling in brown adipocytes, Society for Neuroscience 2009, Chicago
- ② Ryotaro Hayato, Yoko Higure, Masako Kuba and Kenji Kuba, Interaction of alpha- and beta-actions on intracellular calcium dynamics of mouse brown adipocytes, The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, Kyoto
- ③ Hiroki Nagai, Ryotaro Hayato, Masako Kuba, Yoko Higure and Kenji Kuba, Bile acid enhances sympathetic signaling processes in brown adipocytes and prevents obesity formation under high-fat diet, The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, Kyoto
- ④ 安藤祐、早戸亮太郎、日暮陽子、久場雅子、久場健司、胆汁酸吸着 resin による高脂肪食肥満の防止機構における褐色脂肪細胞の交換神経応答の役割に関する研究、第56回中部日本生理学会、2009、石川
- ⑤ Hayato Ryotaro, Higure Yoko, Kuba Masako, Kuba Kenji, Effect of high fat diet and cholic acids on adrenergic  $Ca^{2+}$  signaling and thermogenesis in brown adipocytes, The Proceedings of the 85th Annual Meeting (The physiological society of Japan), 2008, Tokyo

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日暮 陽子 (HIGURE YOKO)  
名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教  
研究者番号：30325633

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：