

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790200

研究課題名(和文) 拍動心筋細胞におけるクロライドダイナミクスの生理的意義解明

研究課題名(英文) Chloride dynamics in beating cardiomyocytes

研究代表者 竹内 綾子

(TAKEUCHI AYAKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00378704

研究成果の概要(和文)：心筋における細胞内小器官を介した Cl⁻動態とその生理的意義を明らかにすることを目的として、細胞生理学実験及びコンピュータシミュレーションを行い、以下の研究成果を得た。1. 細胞内 Cl⁻動態測定法を確立した。2. 細胞内小器官 Cl⁻チャネルの候補遺伝子である CLIC2 に着目し、培養心筋細胞における発現を確認した。3. 包括的心筋細胞モデルを発展させ、細胞内小器官を介したイオンやエネルギー物質の動態解析ツールを開発した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify the mechanisms and significance of Cl⁻dynamics via intracellular organelle membranes in beating cardiomyocytes. To achieve these goals, cell physiological experiments in combination with computer simulation were performed and the following results were obtained. 1. Technique to measure the intracellular Cl⁻ dynamics was established. 2. Expression of CLIC2, an intracellular chloride channel, was analyzed in cell line of beating cardiomyocytes. 3. A comprehensive cardiomyocyte model was updated by incorporating pH homeostasis and detailed mitochondria to analyze dynamics of ions and energy substrates across the intracellular organelle membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：心筋細胞、包括的心筋細胞モデル、細胞内 Cl⁻動態

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞膜には複数種の Cl⁻輸送担体が発現しており、細胞内 Cl⁻濃度並びに細胞容積の制御因子として機能する。一方、心筋細胞は興奮-収縮を繰り返す動的な細胞である。これを担う細胞内 Ca²⁺動態は、細胞膜を介した流入と排出、並びに筋小胞体への取り込みと放出の総和から成り、各々の寄与を含

めて定量的な解析が進んでいる(Jo *et al.*, *J Mol Cell Cardiol*, 2006; Maak *et al.*, *Circ Res*, 2006)。細胞膜、細胞内小器官膜の Ca²⁺動態を議論する際には、細胞内環境の電気的中性を保持するために陽イオンとの交換輸送、あるいは陰イオンとの共輸送(カウンターイオン動態)を考慮する必要がある。しかし、筋小胞体、

ミトコンドリアなどの細胞内小器官を介したCl⁻動態に関する情報は殆どなく、また心筋興奮-収縮連関における細胞内Cl⁻動態の役割は不明である。

2. 研究の目的

心筋細胞内Cl⁻ダイナミクスが、心筋細胞全体としての生理機能、特に興奮-収縮連関にどのように関与するかを明らかにすることを目的とする。心筋細胞の大きな特徴のひとつが「拍動」である。そこで、単離マウス心筋細胞とともに、拍動培養心筋細胞(HL-1)を用いて、Cl⁻ダイナミクスの解析方法を確立する。また、従来から良く知られる心筋細胞膜チャンネル(容積依存性Cl⁻ channel やCFTR Cl⁻ channel など)に加えて、細胞内小器官を介したCl⁻動態を同定し、その制御機構を明らかにする。さらに、細胞生理学実験と包括的心筋細胞モデルを用いたコンピュータシミュレーションとを組み合わせた「システム生理学的アプローチ」によって、興奮-収縮連関や細胞容積調節など心筋細胞の生理機能における細胞内Cl⁻動態の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 単離マウス心筋細胞、拍動培養心筋細胞(HL-1)における細胞内Cl⁻動態の測定

Cl⁻感受性蛍光色素 MQAE を細胞に負荷し(1-5 mM, 30 分間)、フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡(ニコン、Eclipse TE2000PFS)、高感度 CCD カメラ(浜松ホトニクス、EM-CCD カメラ C9100)を用いて測定した。

(2) 単離マウス心筋細胞、拍動培養心筋細胞(HL-1)における細胞内Ca²⁺動態の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素 indo-1 を細胞に負荷し(10 μM, 30 分間)、フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡(ニコン、Eclipse TE2000PFS)、高感度 CCD カメラ(浜松ホトニクス、EM-CCD カメラ C9100)を用いて W-VIEW システム(浜松ホトニクス、AQUACOSMOS)を利用したレシオメトリーにより測定した。

Ca²⁺感受性蛍光色素 fluo-8 を細胞に負荷し(2.5 μM, 30 分間)、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス、FV500)を用いて、ラインスキャンにより Ca²⁺スパークを観察した。

(3) 細胞内小器官 Cl⁻チャンネル候補遺伝子 CLIC2 の発現解析

細胞内小器官 Cl⁻channel CLIC ファミリーの一員である CLIC2 が、筋小胞体で Ca²⁺チャンネル RyR と相互作用し、細胞内 Ca²⁺動態を制御するという報告(Meng et al., *J Mol Biol*, 2009)を基に、CLIC2 遺伝子を単離した。CLIC2 のカルボキシル末端に蛍光タンパク RFP を融合させたプラスミドコンストラクトを作成した。このプラスミドを lipofection

法(Invitrogen、lipofectamine 2000)によって培養心筋細胞 HL-1 に導入し、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス、FV500)を用いて CLIC2-RFP の細胞内局在を調べた。また、CLIC2 cDNA を lipofection 法にて過剰発現させ、細胞内イオン動態を調べた。

(4) 膜輸送担体の構造-活性相関解析

心筋細胞の構成要素であり、細胞膜電位の制御を介して細胞内Cl⁻動態に深く関与する Na, K pump について、類似タンパクである筋小胞体 Ca²⁺ pump (SERCA) の既知の結晶構造を基にホモロジーモデルを構築した。オンラインの cavity search プログラムである MOLE (Petřek et al., *Structure*, 2007; <http://troll.chemi.muni.cz/whitezone/development/mole/online/moleonline1.3/>)を用いて、Na, K ポンプのホモロジーモデル内に存在する” tunnel ”を予測した。

(5) 包括的心筋細胞モデルの精緻化と発展

研究代表者らが開発した包括的心筋細胞モデル(京都モデル; Terashima et al., *Philos Transact A*, 2006; Takeuchi et al., *J Gen Physiol*, 2006; Kuzumoto et al., *Prog Biophys Mol Biol*, 2008)に、新たに細胞内 pH 調節モジュール(細胞膜 Na⁺/H⁺ exchanger、Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter、Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger、Cl⁻/OH⁻ exchanger、H⁺ buffer)を追加した。また、これまでの酸化的リン酸化を計算する簡易ミトコンドリアモデルを、TCA サイクルやミトコンドリア膜のイオン、基質輸送担体を含めたより詳細なミトコンドリアモデルへと発展させ、包括的心筋細胞モデルに新たに導入した。

4. 研究成果

(1) 単離心筋細胞における細胞内Cl⁻動態

静止状態の心筋細胞にβアドレナリン受容体刺激(100 nM isoproterenol)を加えると、MQAE 蛍光を指標とした細胞内Cl⁻濃度が減少した。一方、βアドレナリン受容体刺激を持続的に加えた状態で1 Hz の電気刺激を与えると、細胞内Cl⁻濃度が著しく増大し、この効果は細胞外低Cl⁻濃度(10 mM)条件でも変わらなかった。前者は細胞膜CFTR Cl⁻チャンネルの活性化による細胞内からのCl⁻排出に起因すると考えられ、研究代表者の過去の報告と良く対応した(Takeuchi et al., *J Gen Physiol*, 2006)。しかし、後者は細胞外低Cl⁻濃度でも認められたため、細胞膜を介したCl⁻輸送のみでは説明できない。すなわち細胞内小器官を介したCl⁻輸送の存在が強く示唆された。電気刺激に伴い興奮-収縮が持続して起こっている心筋細胞では、筋小胞体からのCa²⁺放出と取り込みが繰り返される。従って、本実験で認められた電気刺激感受性の細胞内小器官Cl⁻動態は、電気的中性を保持するために筋小胞体膜を介したCa²⁺動態に付随し

て起こる、カウンターイオン動態である可能性が考えられた。

(2) 単離心筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態に対する Cl^- channel の寄与

単離心筋細胞を用いて、fluo-8 蛍光を指標とした Ca^{2+} スパークの発生、すなわち筋小胞体からの自発的な Ca^{2+} 放出を観察した。すると、筋小胞体からの自発的な Ca^{2+} 放出は、 Cl^- channel ブロッカーである 100 μM niflumic acid の存在下で著しく抑制された。すなわち、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出には Cl^- channel が関与することが示唆された。

(3) 細胞内小器官 Cl^- チャンネル候補遺伝子 CLIC2 の発現・機能解析

文献検索から、筋小胞体 Cl^- channel 遺伝子の候補として CLIC2 が関与する可能性が高いと考えた。CLIC2 は可溶性型一膜貫通型コンフォメーションをとり (Littler et al., *FEBS Lett*, 2010)、可溶性型の精製 CLIC2 タンパクは筋小胞体 Ca^{2+} チャンネル RyR と結合しその機能を修飾する (Meng et al., *J Mol Biol*, 2009)。しかしインタクトな心筋細胞における CLIC2 の細胞内局在やその機能は不明であった。細胞内 Cl^- 動態をはじめとする心筋細胞機能における CLIC2 の寄与を調べるためには、遺伝子導入が容易な培養細胞が必要である。現在入手可能かつ拍動する株化培養心筋細胞はマウス心房筋由来の HL-1 のみである。そこで、培養筋細胞 HL-1 の安定培養系を確立した。

CLIC2 に蛍光タンパク RFP を融合したプラスミドを HL-1 にトランスフェクションし、細胞内局在を調べたところ、CLIC2-RFP は細胞質、筋小胞体、細胞膜に広く分布していた。しかし、CLIC2 遺伝子を過剰発現させた HL-1 細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 、 Cl^- 動態の測定を行ったところ、HL-1 の Ca^{2+} トランジェントの大きさや Cl^- 濃度に大きな変化は認められなかった。従って、筋小胞体 Cl^- channel としては、CLIC2 以外の CLIC ファミリーの一員あるいは全く異なるタンパクが関与する可能性が推察された。

(4) Na, K pump のイオン通過経路の解明

Na, K pump は心筋細胞のみならずほぼ全ての動物細胞に発現しており、細胞膜電位の制御を介して細胞内 Cl^- 動態に深く関与する (Armstrong, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; Terashima et al., *Philos Transact A*, 2006)。既に研究代表者が発表した論文では、Na, K pump の膜貫通部位に存在するアミノ酸について網羅的なシステインスキャンを行った。その結果を類似タンパク SERCA の既知の結晶構造を基に構築したホモロジーモデルにマッピングし、一本の連続するイオン通過経路を可視化した (Takeuchi et al., *Nature*, 2008)。

この電気生理学実験—ホモロジーモデ

ル解析から予測されたイオン通過経路の妥当性を調べるために、新たにホモロジーモデルを用いて cavity search を行った。得られた "tunnel" についてシステインスキャンの結果と比較解析したところ、両者は良く対応していた。すなわち、Na, K pump 内の孔は膜貫通部位 1, 2, 4, 6 で囲まれていた。また Na, K pump 内から細胞膜外に至るイオンの通路は、細胞外環境に面した井戸型構造の底面を構成する 506 番目のスレオニン近辺で大きく広がっていた。以上の電気生理学実験とモデル解析から、膜輸送担体のイオン輸送のメカニズムを構造的観点から理解することができた。この知見は、他の膜輸送タンパク構造・活性相関解析にも応用できると考える。これらの成果について論文発表 (Takeuchi et al., *Channels*, 2009)、学会発表を行い、第 11 回日本生理学会若手奨励賞を受賞した。

(5) 包括的心筋細胞モデルを用いた細胞内 Cl^- 動態シミュレーション

① 虚血再灌流傷害における細胞内 Cl^- 動態と膨化

利尿薬 bumetanide は、心筋の虚血再灌流傷害に対して保護効果を呈する (Ramasamy et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001)。しかし、そのメカニズムの詳細については不明の点が多い。そこで、研究代表者らが開発した包括的心筋細胞モデルを用いて、シミュレーション解析を行った。bumetanide が Na^+ , K^+ , 2Cl^- 輸送体 NKCC1 の阻害剤であることから、包括的心筋細胞モデルの構成要素のひとつである NKCC1 について、機能分子数を「0」とし、虚血再灌流時における心筋細胞内 Na^+ 、 Cl^- 動態と細胞容積との相関を解析した。その結果、NKCC1 の抑制によって細胞内への Cl^- 流入が著しく抑制され、結果として膨化が抑制されるという新たなメカニズムがモデルから導き出された。この成果について学会発表を行った。

② Na, K pump 阻害時における細胞内 Cl^- 動態と心筋細胞膨化メカニズムの解析

研究代表者らの開発した包括的心筋細胞モデルは、数百の変数が連立微分方程式の中で相互に依存関係を有する複雑系である。しかし、その複雑さゆえに、肝心の動作原理を把握することが困難になりつつある。そこで、「Na, K pump 阻害時における細胞内 Cl^- 動態と細胞膨化メカニズム解明」というテーマを例に、効率的なモデル解析法を提案した。

まず、細胞の構成要素から必要最小限の機能要素を抽出し Simple model を構築する (ここでは細胞容積調節に必要な単純な Na^+ , K^+ , Cl^- channel、容積依存性 Cl^- channel、CFTR Cl^- channel、NKCC1、Na, K pump、細胞膜水輸送、細胞容積変化)。これを用いてすべての細胞に共通のメカニズム (ここでは細胞容積調節メカニズム) について基本動作原

理を得る。次に、Simple model と包括的心筋細胞モデルとの比較によって、心筋細胞に特徴的な制御機構を予測する(ここでは、細胞膜 Ca^{2+} 輸送担体 NCX、PMCA が間接的に細胞容積を制御することが新たに明らかとなった (Takeuchi et al., *J Gen Physiol*, 2006; Takeuchi et al., *Ann NY Acad Sci*, 2007))。以上のモデルを利用した合理的な研究ストラテジーについて論文発表した(竹内綾子、野間昭典, *生物物理*, 2010)。

③ 詳細なミトコンドリアモデル構築と包括的心筋細胞モデルの発展

細胞内小器官のイオン動態と心筋細胞機能発現との相関をより正確に解析するために、包括的心筋細胞モデルをさらに発展させた。すなわち、心筋細胞の興奮・収縮・エネルギー代謝・細胞容積の計算に加え、細胞内 pH 調節に関する構成要素を追加した。

また、これまでの酸化的リン酸化を計算する簡易ミトコンドリアモデルを、TCA サイクルやミトコンドリア膜のイオン、基質輸送担体を含めたより詳細なミトコンドリアモデルへと発展させた。特に、文献情報を基に、ミトコンドリア Ca^{2+} 感受性脱水素酵素

(pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase) に加えて F1FOATPase, phosphate carrier, adenine nucleotide translocase, aspartate/glutamate carrier の Ca^{2+} による活性化を考慮した。この詳細な単離ミトコンドリアモデルは、Bose et al., (*J Biol Chem*, 2003) や Territo et al., (*Am J Physiol Cell Physiol*, 2000) による NADH 産生や酸素消費量などのリン酸依存性、 Ca^{2+} 依存性に関する実験結果をよく再現できた。

さらに、この詳細なミトコンドリアモデルを包括的心筋細胞モデルに新たに実装し、心筋細胞の興奮-収縮連関における細胞内小器官ミトコンドリアを介した調節機構についてコンピュータシミュレーションを行った。その結果、心筋仕事量変化時のエネルギー代謝産物 (phosphocreatine, ADP, inorganic phosphate, NADH) 濃度の安定化には、ミトコンドリア構成要素の Ca^{2+} 及び inorganic phosphate による制御が重要であることが明らかとなった。これによって、包括的心筋細胞モデルを用いた細胞内小器官イオン動態のより詳細なシミュレーションが可能となった。この成果を学会発表した。

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 2 件)

- ① 竹内綾子, 野間昭典 細胞モデル構築による心筋細胞容積調節のシステム生物学

物物理, 2010, 50, 248-251. 査読有

- ② Takeuchi A, Reyes N, Artigas P and Gadsby DC. Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump. *Channels* 3(6): 383-386, 2009. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takeuchi A. The transport pathway and gates of the Na/K-ATPase pump. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011 年 3 月 29 日、横浜(震災のため誌上開催)
- ② Takeuchi A. Role of Ca^{2+} -dependent mitochondrial regulation in E-C coupling. International Symposium "Computational physiology of cardiac and pancreatic β cells, 2011 年 1 月 30 日、京都
- ③ 竹内綾子. Na/K pump のイオン通過経路を可視化する. 生理学研究所研究会、2010 年 9 月 16 日、岡崎
- ④ Takeuchi A. Visualizing the ion pathway through the Na,K pump. 第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 20 日、盛岡
- ⑤ 竹内綾子. 心虚血再灌流傷害に対するループ利尿薬の効果: "Kyoto Model" を用いたシミュレーション解析. 第 3 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2009 年 11 月 14 日、福岡
- ⑥ Takeuchi A. Interaction of phosphate analogs with palytoxin-bound Na,K-ATPase pump-channels. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 31 日、京都

[図書] (計 1 件)

- ① 竹内綾子. 京都廣川書店、「トランスポートゾームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ-」 4 章 3-6 輸送体の構造解析 -Na,K-ATPase pump を例に. pp420-pp424, 2011 年

[その他]

包括的心筋細胞モデル (Kyoto model) のソースコードは、<http://jp.sim-bio.org/> に公開した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 綾子 (TAKEUCHI AYAKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 00378704