

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：33939

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790215

研究課題名（和文） 褐色脂肪細胞における α 作用と β 作用の相互作用と肥満研究課題名（英文） Interaction of alpha- and beta-adrenergic activation
in the calcium dynamics in mouse brown adipocyte

研究代表者

早戸 亮太郎 (HAYATO RYOTARO)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教

研究者番号：60440822

研究成果の概要（和文）：褐色脂肪細胞は熱産生器官である。寒冷暴露により視床下部が刺激を受けると、交感神経活動が亢進することで褐色脂肪細胞にノルアドレナリンを放出し、熱産生を行う。褐色脂肪細胞膜は2種類にアドレナリン受容体(α 、 β 受容体)を発現する。私たちは、 α 受容体と β 受容体の相互作用について調べた。その結果、ノルアドレナリン α 作用が強いときには β 作用が抑制され、逆に α 作用が弱いときは、 β 作用が増強される事が示唆された。この2種類の受容体の活性化が、細胞内 Ca^{2+} を介して相互作用し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節を行っている事がわかった。

研究成果の概要（英文）：In brown adipocytes, α -adrenergic activation evokes Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) and store-operated Ca^{2+} entry (SOC) in brown adipocytes, while β -adrenergic activation causes mitochondrial Ca^{2+} release via uncoupling of oxidative phosphorylation, which activates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from the ER, SOC, and a novel uncoupling-linked Ca^{2+} entry. We studied how these two modes of adrenergic Ca^{2+} signaling pathways interact with each other by recording cytoplasmic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), mitochondrial membrane potential and the Ca^{2+} concentration in the ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) by fluorometry. The rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the reduction of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ evoked by phenylephrine was depressed under the full effect of a β -agonist, BRL37344, while they were enhanced under the weak action of BRL37344. On the other hand, the second and/or third components of the bi- or triphasic rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by BRL37344 was depressed under the effect of the subthreshold concentration of phenylephrine. Thus, when the α -action is strong enough to cause a large rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, it was suppressed during the late phase of the β -action for the decreased Ca^{2+} content in the ER. On the other hand, when the α -action is weak not enough to release Ca^{2+} from the ER presumably due to an inadequate rise in IP_3 concentration, the rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by mitochondrial Ca^{2+} release would boost the activation of IP_3 receptor at the ER membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：褐色脂肪細胞・アドレナリン受容体・Ca²⁺・肥満

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は熱産生器官であり、体温維持を担っている。寒冷暴露により視床下部が刺激を受けると、交感神経活動が亢進することで褐色脂肪細胞にノルアドレナリンを放出し、熱産生を行う。褐色脂肪細胞膜は2種類にアドレナリン受容体(α 、 β 受容体)を発現している。このうち、 β 受容体の活性化は、中性脂肪の分解により遊離脂肪酸を生成する。この遊離脂肪酸はミトコンドリアに作用し、電子伝達系を活性化することでミトコンドリア内膜のH⁺勾配を亢進すると同時に、ミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパクUCP1チャネルを活性化させ、内膜に存在するH⁺勾配のエネルギーを熱へと変換する。これにより熱産生を行う。このとき、ミトコンドリア内膜の脱分極に伴い、ミトコンドリアからCa²⁺が遊離する(β 作用)。この熱産生の際に発生する褐色脂肪細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、ミトコンドリア内NADH脱水素酵素を活性化させる事で熱産生への寄与が示唆されており、細胞内のCa²⁺濃度と熱産生量が比例関係にある事が示されている (Meis et al., 2010)。このように、褐色脂肪細胞内Ca²⁺濃度と熱産生量には正の相関関係が存在する事は知られていたが、どのようなメカニズムで細胞内Ca²⁺濃度上昇が引き起こされるかは、詳細は不明であった。

<引用文献>

de Meis L, Ketzler LA, da Costa RM, de Andrade IR, Benchimol M.

Fusion of the endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane in rats brown adipose tissue: activation of thermogenesis by Ca²⁺.

Plos one Mar 2;5(3):e9439. 2010

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞内Ca²⁺濃度の上昇が熱産生量に寄与する事から、褐色脂肪細胞のCa²⁺動態を調べる事で、効率的な肥満解消法を探索するのが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

ノルアドレナリン α 作用および β 作用による細胞内Ca²⁺動態および二つの作用による相互作用を調べるためCa²⁺-imaging法を用いて実験を行った。実験にはfura-2-AM、Cameleon、Rhod-5Nを細胞内、滑面小胞体内、ミトコンドリア内に負荷する事で、それぞれのCa²⁺濃度変化をそれぞれ調べた。

4. 研究成果

褐色脂肪細胞内Ca²⁺動態を調べるため、 β 受容体アゴニストであるisoproterenolを投与し、 β 作用による細胞内Ca²⁺濃度変化を調べた。その結果、褐色脂肪細胞内で2-3相性のCa²⁺濃度上昇が見られた。(図1)

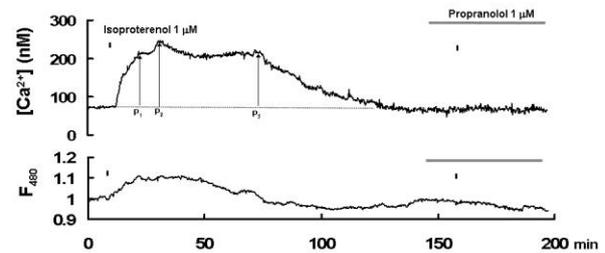


図1: β 作用による細胞内Ca²⁺濃度上昇および、ミトコンドリア膜電位の変化

そこで、2-3相性のCa²⁺濃度上昇を示す細胞に、今度はCa²⁺キレート剤であるEGTAを用いて細胞外Ca²⁺濃度をフリーにし、再びisoproterenolを与えた。その結果、1相目は変化が見られないが、2相目は減少が見られ、3相目は完全に消失した。(図2)

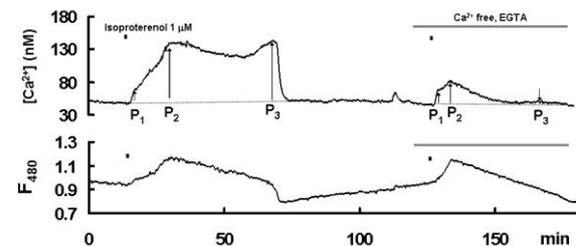


図2: Ca free 条件下での β 作用による細胞内Ca²⁺濃度上昇、およびミトコンドリア膜電位の変化

これらの結果は、 β 作用による細胞内Ca²⁺濃度上昇の第1相および第2相の一部が細胞内からのCa²⁺遊離によって、そして残りの第2相と第3相が細胞外からのCa²⁺流入によって引き起こされる事が示唆された。

そこで私たちは、1、2、3相目のそれぞれの細胞内Ca²⁺濃度上昇が、どのCa²⁺に由来するのかわかると。

第1相のCa²⁺濃度上昇がどの細胞内小器官によって引き起こされるか調べるため、ミトコンドリア内にCa²⁺感受性色素Rhod-5Nをミトコンドリア内に負荷し、 β 作用によるミトコ

ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度変化を調べた。その結果、 β 作用によりミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の減少が見られた(図3)。

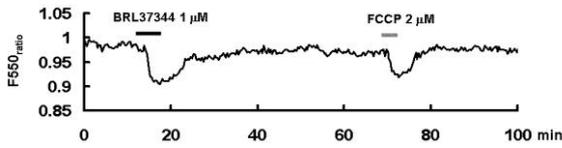


図3: Rhod-5N で調べた β 作用によるミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度変化

この結果は、 β 作用によりミトコンドリアから Ca^{2+} が遊離している事を示している。次に第2相の Ca^{2+} 濃度上昇がどの細胞内小器官から遊離するか調べるために、 Ca^{2+} 感受性タンパク質である Cameleon を褐色脂肪細胞内滑面小胞体に発現させ、 β 作用による滑面小胞体内 Ca^{2+} 濃度変化を調べた。その結果、 β 作用により、滑面小胞体内 Ca^{2+} 濃度減少が見られた。

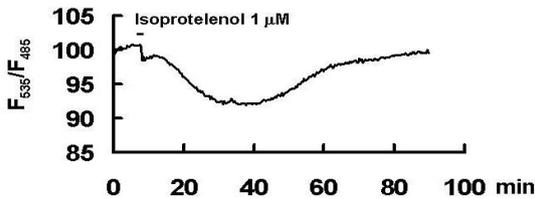


図4: Cameleon を用いて調べた β 作用による滑面小胞体内 Ca^{2+} 濃度変化

これらの結果から、褐色脂肪細胞の β 作用により第1相はミトコンドリアから、続く第2相は滑面小胞体から Ca^{2+} が遊離し、連続的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇する事がわかった。この事は、褐色脂肪細胞内でミトコンドリアと滑面小胞体が Ca^{2+} を介して相互作用し、持続的に Ca^{2+} 濃度を上昇している事を示唆している。そこで私たちは、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリア-滑面小胞体間の Ca^{2+} を介した相互作用を調べるため、 α 受容体アゴニスト: phenylephrine と、 β 受容体アゴニスト BRL37344 を用いて、 α 作用と β 作用の相互作用について調べた。褐色脂肪細胞に phenylephrine を投与し、大きな Ca^{2+} 濃度上昇が見られた後、続いて β 作用中で再度 phenylephrine を投与した結果、 β 作用中の α 応答が抑制されている事がわかった(図5)。

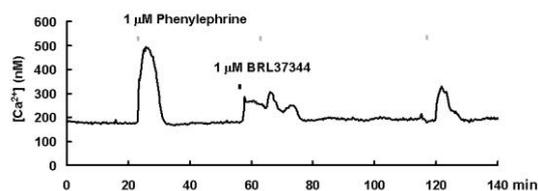


図5: α 作用と β 作用の相互作用(抑制)

この結果を裏付けるため、次に私たちは Cameleon を用いて滑面小胞体内 Ca^{2+} 濃度を指標として、同様に相互作用が見られるか実験した。その結果、滑面小胞体内 Ca^{2+} 濃度も同様に、通常の α 作用に比べ、 β 作用中の α 作用の応答が抑制されている事がわかった。

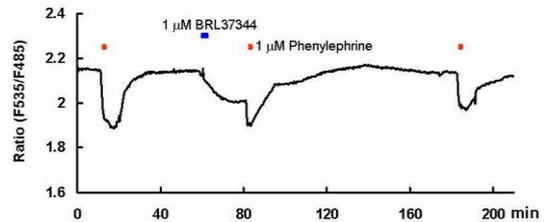


図6: Cameleon を用いて調べた α 作用と β 作用の相互作用(抑制)

また、これらとは逆の反応も見られた。今度は通常の α 作用が弱いときに、この応答が β 作用中にどう変化するか調べた。その結果、通常の α 作用が弱いとき、 β 作用中で α 作用を引き起こすと、今度は増強される事がわかった(図7)。

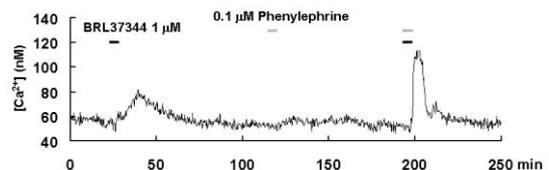


図7: α 作用と β 作用の相互作用(増強)

このように褐色脂肪細胞内では β 作用によりミトコンドリアから遊離した Ca^{2+} が、滑面小胞体へと作用し、元々の滑面小胞体からの Ca^{2+} 遊離量が低ければ、 β 作用がそれを増強し、滑面小胞体からの Ca^{2+} 遊離量が高ければ、 β 作用がそれを抑制する事が示唆された。これらの結果は、 α 作用が弱いときでも β 作用が滑面小胞体から Ca^{2+} 遊離を増強する事により、熱産生量を上昇させ、体温維持に寄与していると考えられる。

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 1 件)

Hayato R, Higure Y, Kuba M, Nagai H, Yamashita H, Kuba K.

β_3 -Adrenergic activation of sequential Ca^{2+} release from mitochondria and the endoplasmic reticulum and the subsequent Ca^{2+} entry in rodent brown adipocytes.

Cell Calcium 査読あり 2011 Jun;49(6):400-14.

[学会発表] (計 6 件)

早戸亮太郎、日暮陽子、久場雅子、長井宏樹、山下均、久場健司

The mechanisms of Ca^{2+} entry elicited by mitochondrial uncoupling in rodent brown adipocytes

日本生理学会(2012) 2012年3月29日 松本市

Hayato R, Higure Y, Kuba M, Nagai H, Yamashita H, Kuba K.

Activation of IP_3 receptor by mitochondrial Ca^{2+} release in response to β -adrenergic uncoupling in brown adipocyte.

Society for Neuroscience (2011) 2011年11月12日 Washington DC.

早戸亮太郎、日暮陽子、久場雅子、長井宏樹、山下均、久場健司

褐色脂肪細胞におけるカルシウムを介したミトコンドリア-滑面小胞体連関:発熱維持機構での役割
西日本生理学会 2011年10月14日 佐賀市

早戸亮太郎、日暮陽子、久場雅子、長井宏樹、山下均、久場健司

β_3 -Adrenergic activation of sequential Ca^{2+} release from mitochondrial and the endoplasmic reticulum and the subsequent Ca^{2+} entry in rodent brown adipocytes

日本生理学会 2011年3月28日 横浜市

Hayato R, Higure Y, Kuba M, Nagai H, Kuba K. Interaction of α - and β -actions on intracellular Ca^{2+} dynamics of mouse brown adipocytes

IUPS (国際生理学会) 2009年7月28日 京都市

Hayato R, Higure Y, Kuba M, Nagai H, Kuba K. Ca^{2+} entry activated by β -adrenergic mitochondrial uncoupling in brown adipocytes

Society for Neuroscience 2009年10月18日 Chicago, USA

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早戸 亮太郎 (HAYATO RYOTARO)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教

研究者番号：60440822

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：