

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790211

研究課題名(和文) 未熟・成熟 B 細胞免疫応答におけるミトコンドリアの役割の解明

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

研究代表者 金 鳳柱

(KIM BONGJU)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：80511823

研究成果の概要(和文)：Bリンパ球における膜結合型 B 細胞レセプターを介した Ca^{2+} 動態にミトコンドリア Na^+-Ca^{2+} 交換体の寄与を明らかにすることを目的として、細胞生理学実験を行い、以下の研究成果を得た。1. B 細胞のミトコンドリアと小胞体 Ca^{2+} 動態測定法を確立した。2. ミトコンドリア NCX の遺伝子である NCLX に着目し、DT40 B 細胞における発現を確認した。3. ミトコンドリア NCX は B リンパ球における小胞体の Ca^{2+} uptake に寄与することで小胞体 Ca^{2+} 含量を調節し、BCR 刺激後の Ca^{2+} 応答を調節することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify the role of mitochondrial NCX in BCR-mediated Ca^{2+} response on B lymphocytes. To achieve these goals, cell physiological experiments were performed and the following results were obtained. 1. Technique to measure the mitochondria and ER Ca^{2+} was established. 2. Expression of NCLX, the mitochondrial NCX, was analyzed in DT40 B cells. 3. Mitochondrial NCX supports ER Ca^{2+} filling and pivotal in BCR-mediated Ca^{2+} signaling in B lymphocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2011 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：未熟・成熟 B 細胞、ミトコンドリア、膜結合型 B 細胞レセプター、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体、細胞質 Ca^{2+}

1. 研究開始当初の背景

B 細胞上に発現する膜結合型 B 細胞レセプター (BCR) に抗原が結合すると、細胞質 Ca^{2+} の持続的かつ振動性上昇が引き起こされ

る。BCR 刺激後の細胞質 Ca^{2+} の上昇は分化段階に依存しない共通の現象であるが、未熟 B 細胞では細胞周期の休止及びアポトーシスを、成熟 B 細胞では細胞増殖を誘導する。こ

れまで研究から、B細胞分化段階に特異的な免疫グロブリンが同定され、分化段階によるBCRを介するシグナル伝達の違いが少しずつ明らかになりつつあるが、その全容は明らかでない。未熟DT40 B細胞において、抗IgM抗体(Anti-IgM)による膜結合型B細胞レセプター(BCR)刺激後に、細胞質Ca²⁺上昇が遅れてミトコンドリアCa²⁺が上昇することを見出した。また、筋肉・ニューロン等の興奮性細胞において、ミトコンドリアCa²⁺の主たる排出機構であるミトコンドリアNa⁺-Ca²⁺交換に対する特異的な阻害剤(CGP-37157)を投与すると、細胞質Ca²⁺の持続的上昇は著明に抑制され、BCR刺激で誘発されるアポトーシスも抑制された。しかし、ミトコンドリアへのCa²⁺流入の阻害剤は有意な影響はなかった。これらの実験データは、未熟B細胞においては、ミトコンドリアNa⁺-Ca²⁺交換を介するCa²⁺フラックスがBCR刺激後の細胞応答に強く関与することを示す。一方で、Quintanaら(Cell Calcium 2009, 45, 109-122)は成熟T細胞において、T細胞レセプター刺激後の細胞内Ca²⁺上昇に、ミトコンドリアからのCa²⁺フラックスは影響せず、ミトコンドリアCa²⁺流入阻害で、細胞質Ca²⁺上昇が著明に抑制されることを報告した。これは、DT40細胞を用いた結果と相反し、細胞種(T細胞 vs B細胞)もしくは分化段階によりミトコンドリアの関与に違いがあることが示唆される。

2. 研究の目的

BCR刺激後の細胞内Ca²⁺濃度変化と細胞応答(アポトーシスもしくは細胞増殖)に対するミトコンドリアCa²⁺輸送体(CaユニポータとNa⁺-Ca²⁺交換)の寄与が、B細胞分化により如何に違うかを、成熟B細胞株(Ramos、A20)、未熟B細胞株(DT40)及びマウス脾臓、

骨髄より単離した未熟、成熟B細胞を用いて定量的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成熟B細胞株(Ramos、A20)、未熟B細胞株(DT40)及びマウス脾臓、骨髄より単離した未熟、成熟B細胞における細胞内Ca²⁺動態の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素Fura-2 AMを細胞に負荷し(5 μM, 20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) 成熟B細胞株(A20)及び未熟B細胞株(DT40)におけるミトコンドリア内Ca²⁺動態の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素Rhod-2 AMを細胞に負荷し(5 μM, 20分間)、負荷した細胞を1-2分間サポニン処理することで細胞膜透過性にし、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス、FV500)を用いて、ミトコンドリアCa²⁺を観察した。

(3) 成熟B細胞株(A20)及び未熟B細胞株(DT40)における小胞体内Ca²⁺動態の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素MagFluo-4 AMを細胞に負荷し(20 μM, 60分間)、負荷した細胞を1-2分間サポニン処理することで細胞膜透過性にし、マルチプレートリーダー(モレキュラーデバイス、Flexstation3)を用いて小胞体内Ca²⁺を測定した。

4. 研究成果

(1) 成熟B細胞株(Ramos、A20)、未熟B細胞株(DT40)及びマウス脾臓、骨髄より単離した未熟、成熟B細胞における細胞内Ca²⁺動態

B細胞株と単離したB細胞に抗IgM及び

IgG 抗体による膜結合型 B 細胞レセプター刺激を行うと、Fura-2 蛍光を指標とした細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、細胞質 Ca^{2+} の持続的上昇がみられた。ミトコンドリア Ca^{2+} Uniporter の抑制剤である Ru360 前処理群では抗 IgM 及び IgG 抗体による細胞質 Ca^{2+} の上昇に明らかな影響はしなかった。一方、ミトコンドリア NCX に対する特異的な阻害剤 (CGP-37157) を前処理した条件では抗 IgM 及び IgG 抗体による細胞質 Ca^{2+} の上昇を著しく抑制した。この結果は研究代表者の研究開始の報告と良く対応した。しかし、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出の抑制で BCR 刺激を介した細胞内 Ca^{2+} 動態の全てを説明できない。すなわち細胞内小器官を介した Ca^{2+} 動態の変化が強く示唆された。小胞体からの Ca^{2+} 放出と取り込みがミトコンドリア NCX と関連することが推測された。従って、本実験で認められた細胞内 Ca^{2+} 動態は、ミトコンドリアから排出された Ca^{2+} で調節される可能性が考えられた。

(2) 成熟 B 細胞株 (A20) 及び未熟 B 細胞株 (DT40) におけるミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態

Rhod-2 蛍光を指標とした B 細胞株を細胞膜透過性にし、Free Ca^{2+} 10 μM を加え、 Ca^{2+} をミトコンドリアに負荷した後にミトコンドリア NCX を活性化する (無 Ca^{2+} と 10 mM NaCl の置換) とミトコンドリア Ca^{2+} が減少した。このミトコンドリア Ca^{2+} の減少は CGP-37157 と 無 NaCl 下で大部分抑制し、B 細胞においてもミトコンドリア Ca^{2+} の主たる排出機構であることが強く示唆された。

(3) 成熟 B 細胞株 (A20) 及び未熟 B 細胞株 (DT40) における小胞体内 Ca^{2+} 動態

BCR 刺激後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化にミトコンドリア NCX の寄与を明らかにするために小胞体 Ca^{2+} 含量を定量的に測定した。Fura-2 蛍光を指標とした B 細胞株を用いて、無 Ca^{2+} 条件下で 1 μM のカルシウムイオノホアを加

えると細胞内の Ca^{2+} が上昇した。この上昇は Thapsigargin (小胞体の SERCA 抑制剤) 存在下では無くなったことでカルシウムイオノホアによる細胞内 Ca^{2+} の上昇は小胞体の Ca^{2+} 含量であることが示唆された。CGP-37157 前処理条件ではこの上昇が 30% 減少し、ミトコンドリア NCX が小胞体の SERCA を通じて Ca^{2+} 提供することが考えられた。

MagFluo-4 蛍光を指標とした B 細胞株を用いて細胞膜を透過性にし、小胞体への Ca^{2+} Uptake を測定した。ミトコンドリアが脱分極の状態では 0.1 mM MgATP と 100 nM Ca^{2+} を加えると小胞体 Ca^{2+} の上昇が見られた。この上昇は CGP-37157 で抑制しなかった。しかし、ミトコンドリアが正常の状態では 0.1 mM MgATP と 100 nM Ca^{2+} による小胞体 Ca^{2+} の上昇が CGP-37157 存在下で約 50% 減少した。

これらの結果からミトコンドリア NCX は成熟と未熟 B リンパ球における小胞体の Ca^{2+} uptake に寄与することで小胞体 Ca^{2+} 含量を調節し、BCR 刺激後の Ca^{2+} 応答を調節することを明らかにした。

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 3 件)

- ① Hattori H, Takeshita D, Takeuchi A, Kim B, Shibata M, Matsuoka S, Obata K, Mitsuyama S, Zhang GX, Takaki M. NHE-1 blockade reversed changes in calcium transient in myocardial slices from isoproterenol-induced hypertrophied rat left ventricle. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:431-5. 査読有
- ② Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M,

and Satoshi Matsuoka. Pivotal role of mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange in antigen receptor mediated Ca²⁺ signalling in DT40 and A20 B

lymphocytes. J Physiol
2012;590:459-474. 査読有

- ③ Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Nakae S, Miyachi Y, Kabashima K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. PLoS one, 2011;6:e25538. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Bongju Kim. Role of mitochondrial NCX on CXCL12-induced chemotaxis in B lymphocytes. 第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 30 日、長野
- ② Bongju Kim. Role of mitochondrial Na-Ca exchange on BCR-mediated Ca²⁺ signalling in B lymphocytes. Biophysical Society 56th Annual Meeting、2012 年 2 月 28 日、San Diego
- ③ Bongju Kim. Role of mitochondrial Na-Ca exchange on BCR-mediated Ca²⁺ signaling in B lymphocytes. 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)
- ④ Bongju Kim. Role of mitochondrial Na-Ca exchange on B cell Receptor-mediated Ca²⁺ signaling in DT40 and A20 B lymphocytes. 2011 年日光シンポジウム、2011 年 12 月 17 日、日光
- ⑤ 金鳳柱. リンパ球抗原受容体刺激で誘発される細胞内 Ca²⁺増加に対するミトコンドリア

NCX の役割、第 103 回近畿生理学談話会、2010 年 10 月 2 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 鳳柱 (KIM BONGJU)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号 : 80511823