

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590207

研究課題名（和文） 心筋リバース EC カップリングにおける細胞膜 Ca ポンプと Na/Ca 交換の機能連関

研究課題名（英文） Functional interaction between the plasma membrane Ca-ATPase and the Na/Ca exchanger in reverse EC coupling in heart cells.

研究代表者

塩谷 孝夫（SHIOYA TAKAO）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20253594

研究成果の概要（和文）：心筋の細胞膜には、細胞膜 Ca ポンプ (PMCA) と Na/Ca 交換 (NCX) の 2 種類のカルシウム輸送体が存在する。本課題ではマウス心筋細胞からのホールセルクランプ記録と局所 Ca^{2+} 濃度分布のコンピュータシミュレーションを用いてこれらの機能連関を調べ、次の結論を得た。1) 心筋細胞の PMCA は自身の近傍の細胞内 Ca^{2+} 濃度を低く維持し、その局所 Ca^{2+} 濃度をシグナル媒体として NCX を調節する。2) この NCX 調節はリバース EC カップリングを抑制し、活動電位の過度な延長を防止する。

研究成果の概要（英文）：Heart cells have two distinct Ca-transporters on their plasma membrane: the plasma membrane Ca-ATPase (PMCA) and the Na/Ca exchanger (NCX). This study sought for the functional cooperation between them, using the whole-cell clamp recording from mouse heart cells and the computer simulation of local Ca^{2+} concentration profile. This study concludes: 1) the PMCA in heart cells maintains a low intracellular Ca^{2+} level nearby itself, and regulates the NCX using the local Ca^{2+} level as the signal medium. 2) This NCX regulation suppresses the reverse EC coupling, preventing the excess prolongation of the action potential.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、カルシウムシグナリング、心筋活動電位、リバース EC カップリング、Na/Ca 交換、細胞膜 Ca ポンプ

1. 研究開始当初の背景

リバース EC カップリングは 2001 年に P. A. Boyden らによって提唱された概念であり、心筋において細胞内カルシウムシグナルが活動電位波形へフィードバックされる現象を

指す。この現象は、虚血性心疾患や心不全などの病態において、細胞内カルシウム動態の異常が心室性不整脈をもたらす不整脈性の機序だと考えられている。

リバース EC カップリングにおいて、細胞内カルシウム動態を活動電位波形に反映するメカニズムは細胞膜の Na/Ca 交換(NCX)である。これは、心筋の主要な細胞内カルシウム汲み出し機構として豊富に発現している。Na/Ca 交換は、3 個の Na⁺イオンと 1 個の Ca²⁺イオンを交換輸送するが、このとき交換輸送されるイオン電荷の不均衡により、NCX は膜電流を発生する。従って心筋では、細胞内カルシウム濃度が活動電位波形に、特にプラトー相に強く反映される。

一方、細胞膜カルシウムポンプ(PMCA)も、一般的なイオントランスポーターとして、心筋への発現が報告されている。しかし、その細胞内カルシウム汲み出しへの寄与は NCX の数十分の一に過ぎないとされており、心筋 PMCA の生理的機能はこれまで不明確であった。

それでは、心筋細胞の細胞膜にはなぜ NCX と PMCA の両方が備えられているのか。この疑問に関して研究代表者は、心筋細胞からホールセル記録した NCX 電流振幅が、PMCA の選択的阻害によって増強することを発見した。この発見は、PMCA が NCX 活性を調節していることを示しており、さらに、その NCX 調節が心筋のリバース EC カップリングに影響をおよぼす可能性が考えられた。

そこで本課題では、心筋細胞における PMCA と NCX の機能連関と、そのリバース EC カップリングへの関与を解明すべく研究を行った。

2. 研究の目的

本課題は上の発見を発展させるべく、次の二つを目的として実施した。1) 心筋 PMCA による NCX の調節メカニズムを解明すること。2) PMCA によるリバース EC カップリングの変化が心筋活動電位波形におよぼす影響を解明すること。

3. 研究の方法

心筋細胞からのリアルタイム RT-PCR を行い、PMCA と NCX の発現レベルを定量した。成獣マウス(C57BL/6J 系)の心臓をコラゲナーゼ処理して、単離心筋細胞を調製した。この細胞標本から全 RNA を抽出し、逆転写反応によって心筋細胞の cDNA を調製した。これをテンプレートに用いてリアルタイム PCR を行い、mRNA の発現を定量した。

心筋細胞からホールセルクランプ法によって NCX 電流を記録し、PMCA による NCX 活性の調節について調べた。上記のマウス単離心筋細胞を体温(37℃)の生理的塩類溶液で灌

流し、人工細胞内液を充填したガラス製パッチ電極を用いてホールセルクランプした。この生理的塩類溶液と人工細胞内液には適宜チャンネルブロッカーを投与し、NCX 電流以外の膜電流を阻害した。人工細胞内液の Ca²⁺濃度はカルシウム緩衝剤(BAPTA または EGTA)を用いて固定し、さらに Na 濃度を適宜調節して、実験中は NCX を平衡状態に維持できるようにした。細胞はパッチクランプ増幅器を用いてボルテージクランプし、細胞にランプパルスの膜電位コマンドを印加して NCX 電流を誘発した。より精密な記録のために、NCX 電流は 5 mM の塩化ニッケル投与で抑制される電流成分と定義する標準的な手法を用いて単離した。電流記録のデータはパーソナルコンピュータに取り込み、専用のソフトウェアを用いて解析した。

同様の実験装置を用いて、心筋細胞から、37℃で活動電位を記録した。心筋細胞は、生体内の組成とほぼ同じ生理的塩類溶液と人工細胞内液を用いて、細胞内カルシウムトランジェントと細胞収縮が観察される生理的な条件に維持した。細胞はパッチ電極を用いてホールセルクランプし、カレントクランプ下に電流パルス印加して活動電位を発生させた。活動電位記録の後に、パッチクランプ増幅器をボルテージクランプに切り替えて、細胞内カルシウムトランジェントにより誘発される NCX 電流を記録した。活動電位記録および NCX 電流記録の取り込みと解析は、パーソナルコンピュータを用いて上と同様に行った。

PMCA 分子の近傍の細胞内 Ca²⁺濃度の分布を、コンピュータシミュレーションによって求めた。E. Neher が導出した diffusible chelator model (1978)に基づく、細胞内 Ca²⁺濃度分布の数値計算プログラムを Octave 言語で作成し、リナックスを導入したパーソナルコンピュータ上で実行した。

4. 研究成果

(1) PMCA 阻害による NCX 活性の上昇と、そのメカニズム

PMCA の選択的阻害は、心筋 NCX 電流を増強した。この実験では、心筋細胞からランプパルスを用いて NCX 電流を記録し、バナジン酸の細胞内(パッチ電極内)投与によって PMCA を選択的に阻害して、それが NCX 電流の振幅に及ぼす影響を調べた。このとき、心筋細胞の細胞内 Ca²⁺濃度は、低濃度(0.1 mM)の BAPTA を用いて、さまざまなレベルに弱く固定した。

バナジン酸投与による PMCA の阻害は NCX

電流の振幅を濃度依存的に増大させ、PMCA が NCX の活性を抑制的に調節していることを示した。さらに興味深いことに、バナジウム投与によって増強した NCX 電流の細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性は、対象(バナジウム非投与)の条件で記録した NCX 電流よりも約 400 nM 低 Ca^{2+} 濃度側にシフトしていた(図 1)。

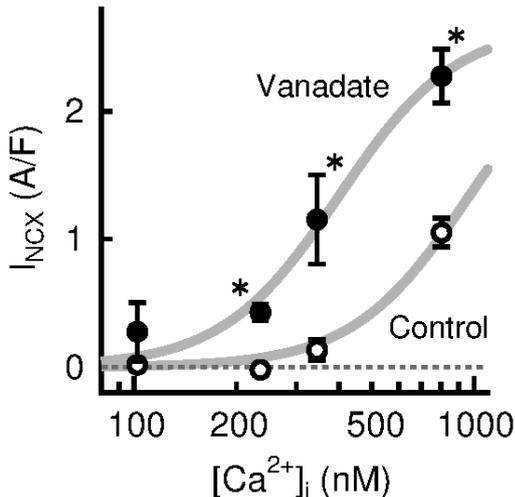


図 1: バナジウム投与による NCX 電流の細胞内 Ca 依存性の低濃度側へのシフト

NCX の活性は細胞内 Ca^{2+} 濃度に強い依存性を持つことが知られている。このことから、バナジウムによる NCX 電流の増強は、NCX 分子近傍の局所的な細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したためであることが示唆された。

上の結果は、より選択性の高い PMCA 阻害薬であるカルボキシエオシンを用いた実験でも同様に再現できた。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度を、高濃度(10 mM)の BAPTA を用いて強力的に固定した条件では、PMCA 阻害による NCX 電流振幅の増強や、その細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性のシフトは観察されなかった。これらの実験結果から、PMCA が NCX 活性を抑制的に調節しており、それが局所的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介することが確認された。

(2)心筋細胞における NCX と PMCA の発現レベルの定量

リアルタイム RT-PCR 法を用いて、心筋細胞における NCX の PMCA の発現について調べた(図 2)。実験では、マウス単離心筋細胞から調整した全 RNA を用いて、NCX1、NCX2、NCX3、PMCA1、PMCA2、PMCA3、および PMCA4 の発現について検討した。これらのうち、NCX1、PMCA1、および PMCA4 の発現が心筋細胞で確認できた。また、リアルタイム PCR 法で定量した PMCA1 の発現レベルは NCX1 の 30%程度で

あり、心筋細胞における PMCA の発現は、NCX と比較しても遜色のないレベルにあることが確認された。

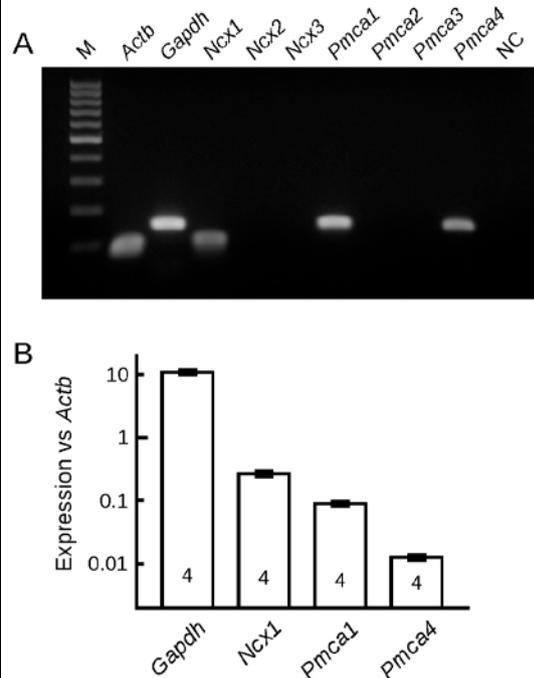


図 2: 心筋細胞における NCX と PMCA の発現

この結果は、従来考えられてきたように、ほとんど生理的な細胞内カルシウム汲み出しに寄与しないと考えるには不合理な量の PMCA が心筋に発現していることを示す。この発現レベルの実験も、PMCA による NCX の活性調節が起こることを支持する。

(3)PMCA 近傍の局所 Ca^{2+} 濃度分布のコンピュータシミュレーション

PMCA 分子の細胞内 Ca^{2+} 汲み出し速度は、毎秒 30 個程度と比較的小さな値が報告されている。この速度で Ca^{2+} の汲み出しを行う PMCA 分子の近傍の局所細胞内 Ca^{2+} 濃度が、どのような分布を示すのかをコンピュータシミュレーションを行って調べた。シミュレーションでは、E. Neher が導出した diffusible chelator model を仮定して、PMCA 分子からの距離と、その位置における Ca^{2+} 濃度との関係を数値計算によって求めた。

NCX 記録の実験条件や生理的な条件と同様な、細胞内 Ca^{2+} 濃度を弱く固定した条件では、毎秒 30 個の速度で Ca^{2+} 汲み出しを行う PMCA 分子の近傍に、すりばち状の細胞内 Ca^{2+} 濃度低下が生じることがシミュレーションから示された。また、実験で観測された 400 nM の Ca^{2+} 濃度の落ち込みは、PMCA 分子から半径 50 nm 程の距離で生じることが示された。この距離は、心筋細胞の細胞膜上における NCX 分子と PMCA 分子の距離と矛盾しないと考

られた。このコンピュータシミュレーションの結果は、PMCA がもたらす局所的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下が NCX 分子に受容され、NCX の活性を抑制的に調節することを支持した。

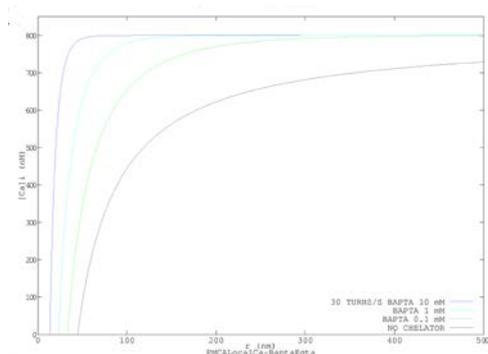


図 3: PMCA 近傍の Ca^{2+} 濃度分布のシミュレーション

(4) PMCA がリバー EC カップリングに及ぼす影響

以上の結果は、心筋 PMCA が NCX を抑制的に調節することを示す。このことは、PMCA が NCX によるリバー EC カップリングにも影響をおよぼすことを示唆する。この点を検証するため、マウス心筋細胞から生理的な条件で活動電位を記録し、細胞内にバナジウム酸を投与して PMCA を阻害する実験を行った。

活動電位のオーバーシュートの持続時間は PMCA 阻害によって影響されなかったが、プラトー相の長さは PMCA 阻害によって延長した(図 4)。また、同じ細胞から記録した、細胞内カルシウムトランジェント誘発性の Na/Ca 交換電流は減衰が遅延して増強していた。この結果は、PMCA 阻害による NCX 活性の増強がリバー EC カップリングを促進して活動電位プラトーを延長することを示す。これから、PMCA は NCX の生理的な調節を行っており、従ってリバー EC カップリングにも影響を及ぼすことが示された。

(5) 研究成果のまとめ

本課題の成果から、1)心筋 PMCA 分子は Ca^{2+} の汲み出しにより、自身の近傍に細胞内 Ca^{2+} 濃度が局所的に低下した微小領域をつくること、2)その領域内の Ca^{2+} 濃度がシグナルとなって、心筋 NCX の活性が抑制的に調節されること、3)PMCA によるこの NCX 活性の調節は心筋のリバー EC カップリングにも影響をおよぼし、活動電位波形を調節していることが明らかになった。PMCA は ATP によって駆動される分子であることから、細胞内の代謝の状態を、リバー EC カップリングに反映す

る役割を担っている可能性が考えられた。

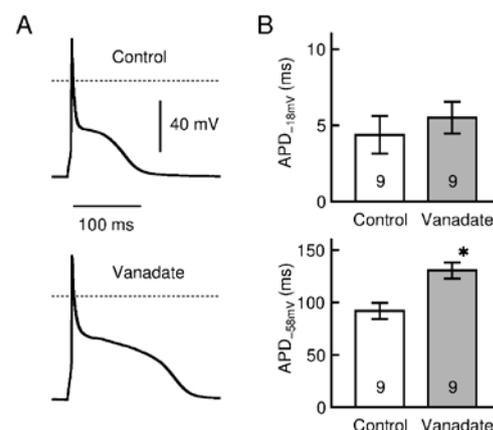


図 4: バナジウム酸による PMCA の抑制が活動電位波形に及ぼす影響

本課題の成果は、心筋 PMCA に、細胞内の代謝状態をカルシウムシグナリングによって反映する情報変換分子としての全く新しい役割があることを強く示唆するものである。

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 0 件)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 塩谷孝夫、Regulation of cardiac Na/Ca exchanger by local Ca signaling mediated by PMCA、第 90 回日本生理学会大会、2013、J Physiol Sci. 63 (suppl. 1): S200. 2013. 3. 28 タワーホール船堀 (東京都)
- ② 塩谷孝夫、PMCA が媒介する心筋ローカル Ca シグナリングと Na/Ca exchanger、2012 年度生理学研究所研究会、2012、生理学研究所年報、34 巻. 2012. 11. 21 岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- ③ 塩谷孝夫、心筋 PMCA 近傍の $[Ca]_i$ 分布の数値シミュレーション、第 63 回西日本生理学会、2012、日本生理学雑誌 75: 60. 2012. 10. 19 全労済ソレイユ (大分県)
- ④ 塩谷孝夫、Regulation of cardiac Na/Ca exchanger by PMCA is mediated by local calcium、第 89 回日本生理学会大会、2012、J Physiol Sci. 62 (suppl. 1): S147. 2012. 3. 20 松本市総合体育館 (長野県)
- ⑤ 塩谷孝夫、マウス心筋 NCX 電流の細胞内カルシウム緩衝能依存性、第 62 回西日本生理学会、2011、日本生理学雑誌 74: 82. 2011. 10. 15 佐賀大学 (佐賀県)
- ⑥ 塩谷孝夫、Regulation of reverse E-C coupling in mouse heart cells by PMCA、

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、J Physiol Sci. 61 (suppl. 1): S270. 2011. 3. 30 パシフィコ横浜 (神奈川県) (紙上開催)

- ⑦ Takao Shioya、Local control of cardiac sodium-calcium exchanger by PMCA in submembrane microdomain in mouse heart cells、Biophysical Society 55th Annual Meeting、2011、Biophys. J. 100(3): 554a. 2011. 3. 9 Baltimore Convention Center (米国メリーランド州ボルチモア市)
- ⑧ 塩谷孝夫、マウス心筋細胞における PMCA と NCX の機能連関と活動電位波形、2010 年度生理学研究所研究会、2010、生理学研究所年報、32 巻、p. 238. 2010. 11. 5 岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- ⑨ 塩谷孝夫、PMCA によるマウス心筋 Na/Ca 交換の調節と活動電位波形、第 61 回西日本生理学会、2010、日本生理学雑誌、71: 146-147. 2010. 10. 15 長崎大学医学部良順会館 (長崎県)
- ⑩ 塩谷孝夫、Local control of the cardiac Na/Ca exchanger functions by PMCA: a regulation via sub-sarcolemmal Ca^{2+} 、第 87 回日本生理学会大会、2010、J. Physiol. Sci. 60 (suppl. 1): S79. 2010. 5. 20 岩手県民情報交流センター (岩手県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.heartphysiol.med.saga-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩谷 孝夫 (SHIOYA TAKAO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：20253594

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：