

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291019

研究課題名(和文) 心筋ミトコンドリア 筋小胞体の三次元Caクロストークに関する研究

研究課題名(英文) Study on the mitochondria-sarcoplasmic reticulum 3D Ca crosstalk in cardiomyocytes

研究代表者

竹内 綾子 (Takeuchi, Ayako)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：00378704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋細胞におけるミトコンドリア-筋小胞体Caクロストークの分子メカニズムとその生理的意義を明らかにすることを目的とした。細胞実験および数理モデル解析により、以下の研究成果を得た。1. 電子顕微鏡像の解析から、心筋細胞のミトコンドリア-筋小胞体の配置を数値化した。2. HEK293細胞ならびに心室筋細胞を用いた実験から、ミトコンドリアNa/Ca交換輸送体NCLXと筋小胞体CaポンプSERCAが近傍に局在することが示唆された。3. 数理モデル解析から、ミトコンドリアエネルギー代謝制御におけるCaによる制御の寄与や、ミトコンドリア-筋小胞体クロストークの役割を予測した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to clarify physiological roles of mitochondria-sarcoplasmic reticulum 3D Ca crosstalk in cardiomyocytes. From combination study of experiments and mathematical simulations, we obtained following results. 1. Parameters explaining mitochondria-sarcoplasmic reticulum localization were obtained by analyzing electron microscopy data on mouse cardiomyocytes. 2. In vitro localization analyses were performed using HEK293 cells and mouse cardiomyocytes and it was suggested that mitochondrial Na/Ca exchanger NCLX and sarcoplasmic reticulum Ca pump SERCA were localized in close proximity to each other. 3. A mathematical model of a detailed mitochondrial oxidative phosphorylation was newly constructed. The model predicted the contribution of Ca-dependent regulations of mitochondrial energy metabolism with various compositions of energy substrates. In addition, the roles of mitochondria-sarcoplasmic reticulum crosstalk were also analyzed.

研究分野：細胞生理学、フィジオーーム

キーワード：ミトコンドリア 筋小胞体 心室筋細胞 心房筋細胞

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  排出を担う  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 NCLX が、(筋)小胞体に効率的に  $\text{Ca}^{2+}$  を供給することで、(筋)小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  含量を調整すること、培養心筋細胞 HL-1 の拍動リズムや B リンパ球細胞の抗原受容体刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答を制御することを見出した (Kim et al., *J Physiol*, 2012; Takeuchi et al., *Sci Rep*, 2013)。これは、ミトコンドリアと(筋)小胞体が、それぞれの膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送担体を介して連携し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態、ひいては細胞の生理機能を制御することを強く示唆する。しかし、両オルガネラ膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送担体群の構造的なクロストークについては不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に心筋細胞に着目し、ミトコンドリア・筋小胞体の配置と、両オルガネラ膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体分子間の相互作用などに関する構造・分子・機能解析を行う。これを、定量的実験データに立脚した心筋細胞数理モデルによるコンピュータシミュレーションと組み合わせることによって、心筋細胞におけるミトコンドリア・筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  クロストークの分子メカニズムとその生理的意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 心筋細胞内オルガネラの配置の電子顕微鏡像による解析

マウスの心臓から洞房結節周囲組織を単離し、固定・脱水・レジン包埋後、透過電子顕微鏡 (Hitachi 7650) あるいは三次元走査顕微鏡 (3View-Merlin Gatam-Zeiss; 自然科学研究機構 生理学研究所に設置) を用いて電子顕微鏡像を取得した。本実験は福井大学学術研究院医学系部門の飯野哲教授、堀口和秀准教授、深澤有吾教授の協力を得て行った。洞房結節細胞、ならびに心房筋細胞におけるミトコンドリア、筋小胞体の面積比、ならびに両オルガネラの近接する割合を計算した。

(2) タンパク質断片コンプリメンテーション法によるミトコンドリア NCLX と筋小胞体 SERCA、細胞膜 NCX1 との共局在の検出

CoralHue Fluo-chase kit (Amalgaam 社) を用いて、蛍光タンパク質 mKG の N 末あるいは C 末と NCLX、SERCA1、SERCA2A、SERCA2B、SERCA3、ならびに NCX1 の融合タンパクを発現するプラスミドコンストラクトを作成した。全ての組み合わせで HEK293 細胞にトランスフェクションし、蛍光の検出により共局在を評価した。

(3) マウス心室筋細胞における NCLX、RyR、SERCA2 局在の検出

マウスランゲンドルフ灌流心にコラゲナーゼを灌流し、心室筋細胞を単離した。PFA 固定後、Triton X-100 処理により細胞膜を透

過させ、抗 NCLX 抗体 (カスタムポリクローナル抗体)、抗リアノジン受容体 (RyR) 抗体 (ThermoFisher Scientific, MA3-916)、抗 SERCA2 抗体 (Santa Cruz, sc376235)、抗  $\beta$ -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich, T4026) を用いて免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SPII) または超解像顕微鏡システム (ニコン株式会社; N-STORM) を用いて画像を取得した。

(4) proximity ligation assay による NCLX-SERCA、NCLX-RyR 共局在の検出

Duolink in situ PLA (Sigma-Aldrich 社) を用いて、proximity ligation assay による NCLX-SERCA、NCLX-RyR の共局在を共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SPII) を用いて検出した。

(5) 数理モデルの構築・解析

ミトコンドリアと筋小胞体の面積比、両オルガネラの共局在の割合を考慮した、詳細なミトコンドリア・筋小胞体クロストークモデルを作成し、細胞数理モデルと統合した。これを用いて、心筋細胞機能におけるミトコンドリア・筋小胞体構造的クロストークの寄与を解析した。また、ミトコンドリアエネルギー代謝モデルを作成した。これを用いて、ミトコンドリア・筋小胞体クロストークにおいて重要な役割を果たす  $\text{Ca}^{2+}$  に着目し、これによるエネルギー代謝制御メカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

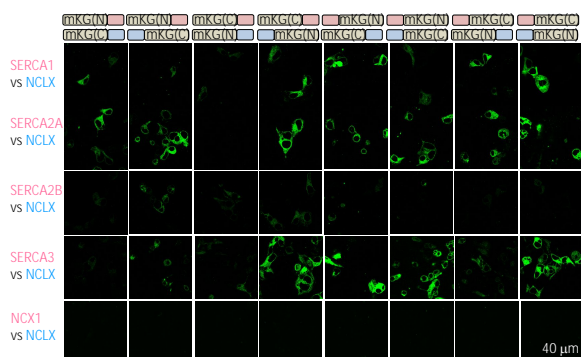
(1) 心筋細胞内ミトコンドリア・筋小胞体の構造的クロストーク

電子顕微鏡像の解析から、ミトコンドリアと筋小胞体は、洞房結節細胞ではそれぞれ  $14.65 \pm 1.40\%$ 、 $3.85 \pm 0.59\%$  であった。一方、心房筋細胞ではそれぞれ  $17.25 \pm 2.50\%$ 、 $4.55 \pm 0.71\%$  であった。また、いずれの細胞においても、ほぼ全てのミトコンドリアが筋小胞体と近接 ( $< 50 \text{ nm}$ ) していたのに対し、筋小胞体がミトコンドリアと近接する割合は、洞房結節細胞、心房筋細胞でそれぞれ  $34.55 \pm 11.50\%$ 、 $39.71 \pm 6.74\%$  であった。さらに、三次元走査顕微鏡による立体再構築から、洞房結節細胞では細胞膜直下に存在する T 管がほとんど存在しないことが明らかとなった。

(2) HEK293 細胞におけるミトコンドリア NCLX と筋小胞体 SERCA、細胞膜 NCX1 との共局在

NCLX、SERCA および NCX1 と蛍光タンパク断片との融合プラスミドを HEK293 細胞に発現させたところ、NCLX-SERCA1、NCLX-SERCA2A、NCLX-SERCA2B、NCLX-SERCA3 のいずれの組み合わせでも蛍光が観察された (図 1)。ただし、NCLX-SERCA2B については蛍光強度が小さい傾向にあった。したがって、NCLX と

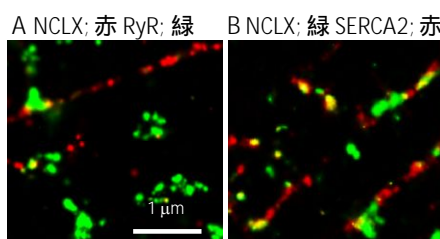
SERCA1、SERCA2A、SERCA2B、SERCA3  
いずれのアイソフォームも、HEK293 細胞に  
発現させると近傍に局在することが示唆され  
た。一方、NCLX-NCX1 の組み合わせでは  
蛍光が観察されなかったことから、NCLX と  
NCX1 は HEK293 細胞では近傍に局在しない  
ことが示唆された ( 図 1 )。



**図1. タンパク質断片コンプリメンテーション法による  
NCLX-SERCA1、NCLX-SERCA2A、NCLX-SERCA2B、NCLX-  
SERCA3、NCLX-NCX1 の共局在の評価。** monomeric  
Kusabira Green (mKG)断片のN末あるいはC末にSERCA1、  
SERCA2A、SERCA2B、SERCA3、NCX1(マゼンタ)あるい  
はNCLX(青)を融合させたプラスミドを作成し、図上に示  
す組み合わせでHEK293細胞にトランスフェクションした。  
共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を検出した。

### (3) マウス心室筋細胞における NCLX と SERCA2 のクロストーク

実心室筋細胞における NCLX と SERCA の  
構造的クロストークについて調べるために、  
免疫染色を行った。その結果、使用した抗  
NCLX 抗体は一部β-tubulin との交差反応を示  
したものの、NCLX のミトコンドリアへの局  
在を確認することができた。また、超解像顕  
微鏡システム ( N-STORM ) を用いた解析から、  
NCLX は RyR よりも SERCA2 の近傍に  
局在する傾向にあった ( 図 2 )。



**図2心室筋細胞におけるNCLXの局在解析。**  
NCLXはRyR(A)よりも、SERCA2(B)の近傍に  
局在する傾向にあった。

そこで、NCLX と SERCA の共局在につい  
てさらに調べるために、proximity ligation  
assay を行った。しかし、NCLX-SERCA2、  
NCLX-RyR いずれの組み合わせでも共局在  
のシグナルを検出することができなかった。

以上の結果から、NCLX と SERCA2 は、そ  
れぞれミトコンドリアと筋小胞体の隣り合  
う面に局在するものの、proximity ligation  
assay で共局在のシグナルが得られるほど近

傍には局在しないこと、おそらくはミトコン  
ドリア外膜がその共局在を阻んでいること  
が示唆された。

### (4) 数理モデルによるミトコンドリア - 筋 小胞体クロストークの解析

ミトコンドリアと筋小胞体の面積比、両オ  
ルガネラの共局在の割合を考慮した、詳細な  
ミトコンドリア - 筋小胞体クロストークモ  
デルを作成し、洞房結節細胞数理モデルと統  
合し、解析を行った。その結果、ミトコンド  
リア - 筋小胞体の構造的クロストークが大  
きいほど、洞房結節細胞の自動能発生にお  
ける NCLX の寄与が大きくなることが予測さ  
れた。

さらに、詳細なミトコンドリアエネルギー  
代謝数理モデルを作成した。ミトコンドリア  
- 筋小胞体クロストークの制御因子のひと  
つである  $Ca^{2+}$  を中心に、エネルギー代謝制御  
のメカニズムについて解析を行った。その結  
果、基質の組成によってミトコンドリアエネ  
ルギー代謝の  $Ca^{2+}$  依存性の寄与が異なること、  
これは、 $Ca^{2+}$  による制御を受けるリンゴ酸 -  
アスパラギン酸シャトルの寄与が基質組成  
に依存するためであることをモデルから導  
き出した。

### 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 13 件 )

Saito R, Takeuchi A, Himeno Y, Inagaki N,  
Matsuoka S. A simulation study on the  
constancy of cardiac energy metabolites  
during workload transition. *J Physiol*,  
594(23), 6929-6945, 2016. DOI:  
10.1113/JP272598. 査読有。

Kim B, Takeuchi A, Hikida M, Matsuoka S.  
Roles of the mitochondrial  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$   
exchanger, NCLX, in B lymphocyte  
chemotaxis. *Sci Rep*, 6, 28378, 2016. DOI:  
10.1038/srep28378. 査読有。

竹内綾子. ミトコンドリア - 小胞体  $Ca^{2+}$   
クロストークに関するフィジオーム研  
究. *膜(Membrane)*, 41(5), 215-220, 2016.  
DOI: 10.5360/membrane.41.215. 査読有。

Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y,  
Wuriyanghai Y, Kamakura T, Nishiuchi S,  
Hayano M, Harita T, Yamamoto Y,  
Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Itoh H,  
Kawamura M, Ohno S, Takeuchi A,  
Matsuoka S, Miura M, Sumitomo N, Horie  
M, Yamanaka S, Kimura T. Patient-specific  
human induced pluripotent stem cell model  
assessed with electrical pacing validates  
S107 as a potential therapeutic agent for  
catecholaminergic polymorphic ventricular  
tachycardia. *PLoS One*, 11(10), e0164795,  
2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0164795.

査読有.

Sakamaki K, Ishii TM, Sakata T, Takemoto K, Takagi C, Takeuchi A, Morishita R, Takahashi H, Nozawa A, Shinoda H, Chiba K, Sugimoto H, Saito A, Tamate S, Satou Y, Jung SK, Matsuoka S, Koyamada K, Sawasaki T, Nagai T, Ueno N. Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim Biophys Acta*, 1863(11), 2766-2783, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.010. 査読有.

Taniguchi K, Utaki H, Yamamoto D, Himeno Y, Amano A. Mechanisms underlying the effects of ventricular activation time on hemodynamic parameters: a simulation study. *Adv Biomed Eng*, 5, 94-104, 2016. DOI: 10.14326/abe.5.94. 査読有.

Utaki H, Taniguchi K, Konishi H, Himeno Y, Amano A. A method for determining scale parameters in a hemodynamic model incorporating cardiac cellular contraction model. *Adv Biomed Eng*, 5, 32-42, 2016. DOI: 10.14326/abe.5.32. 査読有.

Hasegawa Y, Shimayoshi T, Amano A, Matsuda T. Application of the Kalman filter for faster strong coupling of cardiovascular simulations. *IEEE J Biomed Health Inform*, 20(4), 1100-6, 2016. DOI: 10.1109/JBHI.2015.2436212. 査読有.

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The destiny of  $Ca^{2+}$  released by mitochondria. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(1), 11-24, 2015. DOI: 10.1007/s12576-014-0326-7. 査読有.

Punzalan FR, Kunieda Y, Amano A. Program code generator for cardiac electrophysiology simulation with automatic PDE boundary condition handling. *PLoS One*, 10(9), e0136821, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0136821. 査読有.

Shimayoshi T, Cha CY, Amano A. Quantitative decomposition of dynamics of mathematical cell models: method and application to ventricular myocyte models. *PLoS One*, 10(6), e0124970, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0124970. 査読有.

Himeno Y, Asakura K, Cha CY, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A. A human ventricular myocyte model with a refined representation of excitation-contraction coupling. *Biophys J*, 109(2), 415-27, 2015. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.06.017. 査読有.

Asakura K, Cha CY, Yamaoka H, Horikawa Y, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A. EAD and DAD mechanisms analyzed by developing a new human ventricular cell model. *Prog Biophys Mol Biol*, 116(1),

11-24, 2014. DOI:

10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.008. 査読有.

〔学会発表〕(計 16 件)

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達「リンパ球におけるミトコンドリア - 小胞体  $Ca^{2+}$  クロストークの役割に関するフィジオーム研究」第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 28 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

Takeuchi A, Saito R, Himeno Y, Matsuoka S「A theoretical study on the roles of  $Ca^{2+}$  in the energy metabolite stability during cardiac workload transition」61st Biophysical Meeting, 2017 年 2 月 12 日, New Orleans (USA)

Amano A, Utaki H, Taniguchi K, Himeno Y「Simulation of cardiac excitation propagation and the circulatory dynamics」

NOLTA 2016, 2016 年 11 月 27 日, ニュー

ウェルシティ湯河原 (静岡県・熱海市)  
竹内綾子, 齋藤隆太, 姫野友紀子, 松岡達「心臓仕事量増大時におけるエネルギー代謝産物安定性制御メカニズムに関する数理解析」第 63 回中部日本生理学会, 2016 年 11 月 4 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

竹内綾子, 齋藤隆太, 姫野友紀子, 松岡達「新規ミトコンドリアエネルギー代謝数理解析モデルを用いた心臓エネルギー代謝制御メカニズムの解析」生理学研究所研究会, 2016 年 10 月 25 日, 九州大学 (福岡県・福岡市)

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達「ミトコンドリア  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  交換輸送体 NCLX を介した B リンパ球細胞機能制御」生理学研究所研究会, 2016 年 9 月 8 日, 生理研研究所 (愛知県・岡崎市)

Takeuchi A, Saito R, Himeno Y, Matsuoka S「A simulation study on roles of  $Ca^{2+}$  in constancy of cardiac energy metabolites during workload transition」2016 Cardiac Physiome Workshop, 2016 年 8 月 24 日, Seoul (Korea)

竹内綾子, 松岡達「ミトコンドリア - 小胞体  $Ca^{2+}$  クロストークに関するフィジオーム研究」日本膜学会第 38 年会, 2016 年 5 月 11 日, 早稲田大学 (東京都・新宿区)

竹内綾子, 松岡達「ミトコンドリア - 筋小胞体構造的クロストークを考慮したマウス洞房結節細胞数理解析モデルの構築」第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 23 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Matsuoka S, Takeuchi A「Physiome study on mitochondrial  $Ca^{2+}$  dynamics」67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Physiological Society, 2015 年 10 月 22 日,

Busan (Korea)  
Takeuchi A, Horiguchi K, Iino S, Fukazawa Y, Matsuoka S 「Contribution of mitochondria to the generation of automaticity of sinoatrial node cells; a simulation study」 e-Heart シンポジウム, 2015年9月18日~19日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県・草津市)  
Takeuchi A, Matsuoka S 「Simulation analysis of automaticity of sinoatrial node myocytes」 Society of Mathematical Biology 2015 conference, 2015年7月2日, Atlanta (USA)  
竹内綾子, 堀口和秀, 飯野哲, 深澤有吾, 松岡達 「洞房結節細胞におけるミトコンドリア 筋小胞体クロストークの役割」 第92回日本生理学会大会, 2015年3月22日, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)  
竹内綾子, 松岡達 「ミトコンドリアモデル」 e-Heart シンポジウム, 2015年2月28日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県・草津市)  
竹内綾子, 松岡達 「心臓ペースメーカー機転におけるミトコンドリア-筋小胞体  $Ca^{2+}$  クロストークの寄与」 第53回日本生体医工学会, 2014年6月25日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)  
Shimayoshi T, Mishima M, Amano A, Matsuda T 「Nonlinear multiscale circulation model reproducible linear end-systolic pressure-volume relationship」 IEEE EMB Conference, 2014年8月30日, Chicago (USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

福井大学医学部統合生理学ホームページ  
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 綾子 (TAKEUCHI, Ayako)  
福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教  
研究者番号: 00378704

### (2) 研究分担者

天野 晃 (AMANO, Akira)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号: 60252491

### (3) 研究協力者

飯野 哲 (IINO, Satoshi)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授

堀口 和秀 (HORIGUCHI, Kazuhide)  
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授