

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06869

研究課題名(和文) 心筋細胞におけるミトコンドリア機能の細胞内不均一性とその生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological role of mitochondrial heterogeneity in ventricular myocytes

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・准教授

研究者番号：00378704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心室筋細胞におけるミトコンドリア機能の細胞内不均一性とその生理的意義を明らかにすることを目的とし、以下の研究成果を得た。1. ミトコンドリアNa-Ca交換輸送体(NCLX)が筋小胞体SERCA2>筋小胞体RyR>細胞膜Na-K ATPaseの順に近傍に局在すること、2. NCLXが起電性であり、順回転に比べて逆回転が極めて遅いこと、3. 細胞中央部に比べて端ではミトコンドリア膜電位が脱分極しており、H勾配を消失させる脱共役剤に対する応答に差があること、を見出し、4. pH変動とミトコンドリアイオン動態を計算できる新規心室筋細胞数理モデルを構築し、実験結果のメカニズム解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ミトコンドリアNa-Ca交換(NCLX)が起電性であることが証明され、起電性が否かという長年の議論に終止符をうつことができた。また、心室筋細胞内の部位によるミトコンドリア機能の不均一性は、特に心不全などの細胞内構造のリモデリング時に重要となると予想される。今後の研究展開によって、ミトコンドリア機能の不均一性をターゲットとした新たな細胞機能制御法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to clarify physiological roles of functional heterogeneity of mitochondria in ventricular myocytes. We obtained following results. 1. mitochondrial Na-Ca exchanger (NCLX) was localized near sarcoplasmic reticulum SERCA2>sarcoplasmic reticulum RyR>sarcolemmal Na-K ATPase, 2. NCLX was electrogenic, and reverse mode of Na-Ca exchange activity was much slower than forward mode, 3. mitochondrial membrane was more depolarized and response to uncoupler FCCP was slower at cellular edge than those at central part. Then we constructed a new mathematical model of ventricular myocyte which can calculate pH and mitochondrial ion dynamics, to analyze mechanisms explaining experimental data.

研究分野：細胞生理学

キーワード：心室筋細胞 ミトコンドリア トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マウス心室筋細胞において、ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体分子 (NCLX) の分布が、T管・筋小胞体近傍と細胞膜直下とに分かれることを見出した。また、数理モデル解析から、心室筋細胞内部位によってミトコンドリア機能が異なり、一部のNCLX輸送の方向性が逆転するとの仮説を得た。しかし、実心室筋細胞において、ミトコンドリア機能に細胞内不均一性が認められるかについては不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、電気生理学実験・細胞生理学実験・生化学実験と数理モデル解析を組み合わせたフィジオーム研究を展開し、分子局在 - ミトコンドリア機能 - 心室筋細胞機能の連関解析を行う。これによって、心室筋細胞におけるミトコンドリア機能の細胞内不均一性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) 心室筋細胞および単離心筋ミトコンドリアにおけるNCLX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。また、分画遠心法により、マウス心室筋からミトコンドリアを単離した。PFA固定、Triton X-100による膜透過処理後、抗NCLX抗体(カスタムポリクローナル抗体)を用いて免疫染色を行った。ミトコンドリアとの共局在はサンプルにMitoTracker Orange CMTMRos (1 μM)を負荷することにより、筋小胞体 Ca^{2+} 輸送体 (SERCA2 や RyR) や細胞膜 Na^+ - K^+ ATPase $\alpha 1$ subunit との共局在はこれらの輸送体に対する市販の抗体を抗NCLX抗体と同時に処理することにより評価した。画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SPII またはオリンパス FV-1200) を用いて取得した。

(2) ミトコンドリアパッチクランプ法によるミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換電流の測定

分画遠心法により単離した心室筋ミトコンドリアを低浸透圧溶液で処理してミトコンドリア外膜を破壊し、ミトコンドリア内膜からなるミトプラストを得た。ピペット内 0-10 μM Ca^{2+} 存在下でホールミトプラストパッチクランプ実験を行い、ミトコンドリア外 Na^+ 誘発内向き電流 (順方向 Na^+ - Ca^{2+} 交換電流) を測定した (モレキュラーデバイス社; Axopatch 200B, Digidata 1440A)。ピペット内 Ca^{2+} 濃度依存性、ミトコンドリア外 Na^+ および阻害剤感受性を調べた。また、ピペット内 100 mM Na^+ 存在下でミトコンドリア外 Ca^{2+} 誘発外向き電流 (逆方向 Na^+ - Ca^{2+} 交換電流) の検出を試みた。

(3) 単離ミトコンドリアを用いたミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送特性の解析

0.5 μM Calcium Green-5N で単離ミトコンドリア外 Ca^{2+} を評価することによって、50 μM Ca^{2+} をミトコンドリア外に添加した直後のミトコンドリア外 Ca^{2+} 増加に続く減少 (Ca^{2+} ユニポータ MCU によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込み) と、その後の MCU 阻害剤 (5 μM Ru360) 添加によるミトコンドリア外 Ca^{2+} 増加 (ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出) を測定した (Perkin Elmer 社; マルチモードプレートリーダー-Enspire)。 Na^+ および阻害剤感受性を調べ、 Na^+ 依存性のミトコンドリア外 Ca^{2+} 増大成分を順方向 Na^+ - Ca^{2+} 交換活性とした。

単離ミトコンドリアに 20 μM Fluo 8, AM を負荷し、ミトコンドリア内 Ca^{2+} を測定した

(Enspire)。 Na^+ イオノフォア (4 μM monensin) および Na^+ - H^+ アンチポータ阻害剤 (100 μM ethylisopropylamiloride) 存在下でミトコンドリアに 125 mM Na^+ を負荷した後、10 μM antimycin A および 2 μM oligomycin を用いてミトコンドリア膜を脱分極させ、ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換の逆回転を誘発した。20 μM Ca^{2+} 添加によるミトコンドリア内 Ca^{2+} の増大を MCU 阻害剤 (10 μM ruthenium red) 存在下で調べ、 Na^+ 非負荷時との差を逆方向 Na^+ - Ca^{2+} 交換活性とした。

(4) 単離心室筋細胞におけるミトコンドリア機能の細胞内不均一性の解析

単離心室筋細胞のミトコンドリア機能の指標として、ミトコンドリア膜電位に着目した。ミトコンドリア膜電位の評価には、TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester; Molecular Probes)、TMRM (tetramethylrhodamine, methyl ester; Molecular Probes)、MT-1 (Dojindo) の3種類のミトコンドリア膜電位感受性色素を選択した。共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1200) あるいは蛍光顕微鏡 (ニコン Eclipse) を用いて、強拡大 (x60 ~ x100 対物レンズ) で心室筋細胞内ミトコンドリア膜電位の不均一性を測定した。また、脱共役剤 (10 μM FCCP) 添加によるミトコンドリア膜電位変化のタイムラプスイメージングを行った。

(5) 数理モデル構築・解析

上記実験で得られた FCCP に対する細胞応答を再現するために、既に構築した包括的心室筋細胞数理モデル (Kuzumoto, Takeuchi et al., *Prog Biophys Mol Biol*, 2008) の細胞膜および心筋ミトコンドリア代謝数理モデル (Saito, Takeuchi et al., *J Physiol*, 2016) に新たに H^+ 動態を導入し、

統合した。

4. 研究成果

(1) 心室筋細胞におけるミトコンドリア NCLX の局在

心室筋細胞の蛍光二重免疫染色を行い、ミトコンドリア NCLX と筋小胞体 SERCA2、筋小胞体 RyR、細胞膜 Na⁺-K⁺ ATPase α1 subunit との共局在解析を行ったところ、Manders' coefficient は SERCA2>RyR>Na⁺-K⁺ ATPase α1 subunit の順となり、NCLX と SERCA2 が最も近い位置に局在することが示唆された。また、心室筋から単離したミトコンドリアを用いて同様の検討を行ったところ、NCLX のミトコンドリア上の分布は均一ではなく一部分に局在すること、単離ミトコンドリアには相当量の筋小胞体が付着しており、NCLX は SERCA2 や RyR の近傍に局在すること、その割合は SERCA2>RyR の傾向にあることが明らかとなった。一方、単離ミトコンドリア上に細胞膜 Na⁺-K⁺ ATPase α1 subunit 由来のシグナルは認められなかった。

(2) ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換輸送体の生物物理学的特性

心室筋から単離したミトコンドリアを用いてホールミトプラストパッチクランプ実験を行い、世界で初めてミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換電流の測定に成功した。ピペット内 1 μM Ca²⁺存在下でミトコンドリア外に 50 mM Na⁺を添加すると、内向き電流が発生した。この Na⁺誘発内向き電流は、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換の阻害剤である 2 μM CGP-37157 によって約 67% 阻害された。また、Na⁺の K_d 値は 35.6 mM であった。さらに、ピペット内 Ca²⁺非存在下では Na⁺誘発内向き電流は発生せず、10 μM Ca²⁺存在下では電流が増加した。これらの結果から、Na⁺誘発内向き電流は順方向の Na⁺-Ca²⁺交換電流であると考えられ、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換が起電性であることが明らかとなった。一方、ピペット内 100 mM Na⁺存在下でミトコンドリア外 Ca²⁺誘発外向き電流（逆方向の Na⁺-Ca²⁺交換電流）の測定を試みたが、明らかな外向き電流は検出されなかった。

そこで、蛍光色素を用いた生化学的解析により、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換輸送特性を評価した。その結果、ミトコンドリア外 Ca²⁺ (Calcium Green-5N) の蛍光測定によって、順方向の Na⁺-Ca²⁺交換機能を検出できた (図 1; *J Physiol Sci*, 2020)。一方、ミトコンドリア内 Ca²⁺ (Fluo 8, AM) の蛍光測定によって、CGP-37157 感受性の逆方向 Na⁺-Ca²⁺交換機能を検出できたが、その速度は脳由来ミトコンドリアに比べて著しく遅いことが明らかとなった (図 2; *J Physiol Sci*, 2020, *Cell Calcium*, 2021)。これらの結果から、逆方向 Na⁺-Ca²⁺交換が極めて遅いため、ホールミトプラストパッチクランプ実験では電流測定が困難であったと考えられた。

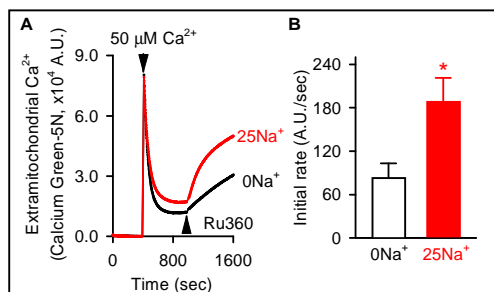


図1. 順方向ミトコンドリアNa⁺-Ca²⁺交換活性の評価。
A. 単離ミトコンドリア外に50 μM Ca²⁺を添加すると、Ca²⁺はすぐにMCUによってミトコンドリアに取り込まれる。MCU阻害剤(5 μM Ru360)を添加すると、ミトコンドリアからCa²⁺が排出される。B. ミトコンドリアからのCa²⁺排出速度は、Na⁺非存在下(0Na⁺)に比べ、25 mM Na⁺存在下(25Na⁺)で二倍程度大きい。
*, p<0.05 vs 0Na⁺

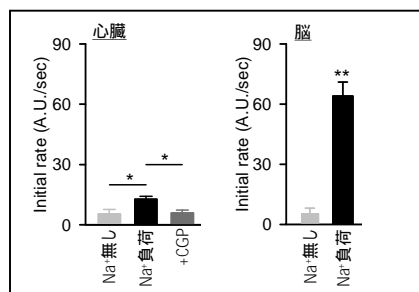


図2. 逆方向ミトコンドリアNa⁺-Ca²⁺交換活性の評価。 Na⁺を負荷し、脱分極させた単離ミトコンドリアにMCU阻害剤(10 μM ruthemium red)存在下で20 μM Ca²⁺を添加すると、Ca²⁺はミトコンドリアに取り込まれる。心臓では脳に比べ、単離ミトコンドリアへのNa⁺依存性Ca²⁺取り込み速度が極めて遅い。
*, p<0.05; **, p<0.01 vs Na⁺無し

(3) 心室筋細胞内ミトコンドリア機能の不均一性

ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換が起電性であることから、心室筋細胞内 NCLX 分布の不均一性は、ミトコンドリア膜電位に何らかの影響を与えると予想される。蛍光色素 TMRE を用いてミトコンドリア膜電位を評価したところ、細胞内の位置による TMRE 蛍光強度の不均一性は検出されなかった。そこで、細胞内構造リモデリング時など、細胞に負荷を与えた条件ではミトコンドリア機能の細胞内不均一性が表れるのではないかと考え、心室筋細胞を 1.5 M ホルムアミド処理することにより、T 管を破壊した。膜電位感受性蛍光色素 di-8-ANEPPS を負荷したホルムアミド処理細胞では、sarcolemma 由来のシグナルは保持したまま T 管由来のシグナルがほぼ完全に消失することを確認した。しかし、T 管破壊細胞においても、TMRE 蛍光強度の不均一性は検出されなかった。次に、細胞内保持性が高いミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 MT-1 を用いて、ミトコンドリア膜電位を評価した。その結果、MT-1 由来蛍光強度は細胞の端が高く、中央付近が低いという細胞内不均一性を検出できたが、脱共役剤(10 μM FCCP)に対する応答が二相性となり、心室筋細胞特有の artefact の可能性が示唆された。最後に、TMRE に比べて非特異的の反応が小さいという利点をもつ TMRM を用いて検討を行った。すると、TMRM

蛍光強度は細胞の中央付近に比べて端が低い（ミトコンドリア膜電位が浅い）傾向にあった。さらに、FCCP に対する応答を調べたところ、細胞の中央付近に比べて端では FCCP 添加による蛍光強度の減少速度、すなわちミトコンドリア膜電位の脱分極速度が遅い傾向にあった。

（４）数理モデルによるミトコンドリア機能の解析

包括的心室筋細胞数理モデルとミトコンドリア代謝数理モデルに、新たに pH 調節に関わる H^+ 代謝と H^+ 輸送体を組み入れ、統合した。これによって、FCCP 添加による H^+ 勾配の消失、ミトコンドリア脱分極等と細胞膜・ミトコンドリア Na^+ 、 Ca^{2+} 動態変化を同時に解析することが可能となった。また、虚血時のアシドーシスシミュレーションにより、特に Na^+ 動態を制御することが、ミトコンドリアエネルギー代謝の破綻を抑制するために必要であることが予測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Islam MM, Takeuchi A, Matsuoka S	4. 巻 70
2. 論文標題 Membrane current evoked by mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00752-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi A, Matsuoka S	4. 巻 96
2. 論文標題 Minor contribution of NCX to Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange activity in brain mitochondria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceca.2021.102386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi A, Matsuoka S	4. 巻 598
2. 論文標題 Integration of mitochondrial energetics in heart with mathematical modelling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1443 ~ 1457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP276817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S	4. 巻 85
2. 論文標題 Physiological functions of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchanger, NCLX, in lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceca.2019.102114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Contributions of NCLX and NCX to mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse brain
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Mohammed Moinul Islam, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Characteristics of Ca ²⁺ efflux from mitochondria.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mohammed Moinul Islam, Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Electrophysiological measurement of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart
3. 学会等名 64th Biophysical meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Mohammed M. Islam, Yukari Takeda, Ayako Takeuchi
2. 発表標題 Property and roles of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in heart
3. 学会等名 The 50th NIPS international symposium 「MIRACLES」 In Cardiovascular Physiology~Metabolism, Interactions, Regulation, Application, Chemical Biology, Longevity, Exercise and Signaling~ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohammed Moinul Islam、 竹内綾子、 松岡達
2. 発表標題 Electrogenicity of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart
3. 学会等名 第66回中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 脳ミトコンドリアからのCa ²⁺ 排出におけるNCLXおよびNCXの寄与
3. 学会等名 第66回中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 脳ミトコンドリアからのCa ²⁺ 排出メカニズム
3. 学会等名 第4回イオンチャネル研究会～チャネル花笠～
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Shimayoshi
2. 発表標題 Parameter uncertainty analysis of a mathematical ion channel model
3. 学会等名 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 The mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchanger is involved in automaticity of murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hinako Suzuki, Takuma Yoshizawa, Shunsuke Aoki, Saki Watanabe, Yukari Takeda, Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Evaluation of effects of empagliflozin on mouse ventricular myocytes
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Roles of mitochondrial Ca ²⁺ channels/transporters in cellular functions
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium Ion channels: looking back, seeing ahead (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田有加里、竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 マウス洞房結節細胞のlocal Ca releaseに対するミトコンドリアNa/Ca交換の関与
3. 学会等名 第65回中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田有加里、竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 マウス洞房結節細胞の自動能におけるミトコンドリアNa/Ca交換(NCLX)の寄与
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 モハメド・モイヌル・イスラム、竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 ミトコンドリアNa ⁺ -Ca ²⁺ 交換の電気生理学的測定
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学学術研究院医学系部門医学領域形態機能医科学講座統合生理学分野ホームページ
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	嶋吉 隆夫 (Shimayoshi Takao) (60373510)	九州大学・情報基盤研究開発センター・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	イスラム モハメド モイヌル (Islam Mohammed Moinul)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関