

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390057  
 研究課題名（和文） ミトコンドリアNCXによるマトリックスイオン動態・エネルギー代謝制御機構の解明  
 研究課題名（英文） Studies on regulation of matrix ion dynamics and energy metabolism by mitochondria NCX  
 研究代表者  
 松岡 達 （ MATSUOKA SATOSHI ）  
 京都大学・医学研究科・特定准教授  
 研究者番号：00263096

## 研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリア機能の統合的解明を目指して、心筋細胞におけるミトコンドリア内及び細胞質のCa動態を、Ca感受性蛍光色素を用い解析した。その結果を基礎に、ミトコンドリアのCa、Na、Hイオン濃度変化を良く再現する数理ミトコンドリアモデルを開発し、酸化リン酸化・TCA回路等の代謝数理モデルと統合した包括的ミトコンドリア数理モデルを作成した。Ca及び無機リン酸による制御がエネルギー代謝バランスの維持に重要であることが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was quantitative elucidation of physiological function of mitochondria. Mitochondrial and cytoplasmic Ca dynamics were studied by using Ca-sensitive fluorescent dyes in cardiac myocytes. Based on these data and previously published data, a mathematical model of mitochondria which can well reproduce mitochondrial Ca, Na and H changes was newly developed. A comprehensive mitochondria model was accomplished by integrating the model with the metabolic model including oxidative phosphorylation and TCA cycle. It was suggested that Ca- and phosphate-dependent regulatory processes are important in keeping the balance of energy metabolites.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ミトコンドリア、シミュレーション、Na/Ca交換、カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

心臓のATP需要は心臓の前負荷・後負荷・心拍数変化等により絶えず変化するため、心筋細胞はATP需要に見合うようにATP産生を常に調節する必要がある。単離ミトコンドリ

アを中心とするこれまでの研究(Brookes et al. Am J Physiol Cell Physiol 2002, 287, C817-C833; Balaban J Mol Cell Cardiol 2002, 34, 1259-1271)と、単離心筋細胞及びコンピュータシミュレーションによる我々の研究

(Jo et al. J Mol Cell Cardiol. 2006; 40:394-404; Kim and Matsuoka, Ann N Y Acad Sci. 2007;1099:507-11) から、ADP と無機リン酸によるフィードバックコントロールに加えて、Ca イオンがミトコンドリアと興奮・収縮連関を結ぶ制御メカニズムとして重要な役割を担うことが明らかになってきた。我々は、モルモット心室筋細胞におけるミトコンドリア Ca、NADH、細胞収縮の測定実験、及び実験データに基づくコンピュータシミュレーション解析から、細胞収縮頻度の増加に伴う収縮力増強（陽性階段現象）の間に、ミトコンドリア Ca が増加し、Ca 依存性脱水素酵素が活性化され、NADH 産生が増加するという仮説を提唱した (Jo et al. J Mol Cell Cardiol. 2006; 40:394-404)。さらに、我々のコンピュータモデルは、Ca 感受性脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase) 以外にも Ca で活性化されるパスウェイが存在することを示唆し、これは F1FOATPase やアスパルギン酸/グルタミン酸交換体が Ca により活性化される可能性を示した実験報告 (Territo et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2000, 278, C423-C435.; Contreras et al. J Biol Chem. 2007, 282, 7098-106) と一致する。即ち、Ca によるミトコンドリア機能調節の全容は未だ明らかでなく、定量的に明らかにする必要がある。

生理的条件においては、心筋細胞ミトコンドリアへの Ca 流入は主に、Ca ユニポータを介して行われ、Ca 排出は主にミトコンドリア Na/Ca 交換 (NCX) によって行われる (Brookes et al. Am J Physiol Cell Physiol 2002, 287, C817-C833)。しかし、両者とも 2007 年現在未だ分子実体は不明であった (注：その後、両者とも分子実体が同定された)。特に、ミトコンドリア Na/Ca 交換に関しては、その膜電位依存性等の電気生理学的特性についての詳細は明らかでないが、松岡らのこれまでの研究は、ミトコンドリア Na/Ca 交換は起電性であり、このトランスポータを介するミトコンドリア内 Na と Ca イオン濃度の制御がミトコンドリア NADH 量に影響する可能性があることを示唆する。

一方で、ミトコンドリアのマトリックスイオン環境と NADH 及び ATP 産生能は、細胞質イオン環境及び細胞 ATP 消費量に強く依存する。それ故、細胞質イオン恒常性及び細胞全体の ATP バランスを常に考慮して考察しなければならない。そのためには、実験データに基づくコンピュータモデルを構築し、複雑系としての心筋細胞・ミトコンドリア機能協関を解析するシステム生物学的アプローチが、この研究には不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア Na/Ca 交換機能の定量的解析と、エネルギー代謝・膜興奮・収縮連関モデルの構築及びシミュレーション解析を行う。これによって、i) ミトコンドリア Na/Ca 交換と関連トランスポータがミトコンドリアマトリックス内イオン (Ca, Na) 濃度を制御するメカニズム、ii) マトリックスのイオン濃度変化によりミトコンドリア NADH 産生及び ATP 産生が制御される機構、及び、iii) ミトコンドリア機能と心筋細胞膜興奮-収縮連関の機能協関を制御するメカニズムについて、心筋ミトコンドリア内イオンとエネルギー代謝に関する実験的解析とエネルギー代謝・膜興奮・収縮連関モデルの精緻化とシミュレーション解析から、定量的に説明する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究ではミトコンドリア Na/Ca 交換の定量的機能解析、ミトコンドリア Na/Ca 交換によるミトコンドリア内 Ca と Na の調節メカニズムの解析、コンピュータシミュレーションによるイオン・ATP 恒常性維持のメカニズムの解析を行い、ミトコンドリア機能と心筋細胞膜興奮・収縮連関の機能協関を制御するメカニズムの解明を目指す。そのために二つの研究テーマを設定する。テーマ I : 心筋ミトコンドリア内イオンとエネルギー代謝に関する実験的解析: ミトコンドリア膜電位、Ca、Na、H を蛍光色素を用いて計測し、ミトコンドリア Na/Ca 交換のキネティクス及び、ミトコンドリア内イオン (Ca, Na, H) 調節メカニズムを明らかにする。電気生理学的手法を用いてミトコンドリア Na/Ca 交換の定量的解析を試みる。テーマ II : エネルギー代謝・膜興奮・収縮連関モデルの精緻化とシミュレーション解析: ミトコンドリア、筋小胞体、収縮機構を含む 包括的心筋細胞コンピュータモデルを精緻化する。エネルギー (ATP) 代謝、イオンバランスについての包括的シミュレーション解析を行い、常に収縮を繰り返す心筋細胞というシステムの中での、エネルギー代謝制御機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

ラット単離心筋細胞及び自動能を有する培養心筋細胞 HL-1 における Ca 感受性蛍光色素を用いた解析から、ミトコンドリア Na/Ca 交換を介するミトコンドリアからの Ca フラックスは、筋小胞体への Ca 供与としても働くことが、ミトコンドリア Na/Ca 交換の阻害剤である CGP-37157 を用いた抑制実験から明らかになった。CGP-37157 は Ca トランジェントを抑制し、ミトコンドリア Na/Ca 交換が、筋

小胞体の Ca 量を調節する因子の一つになっている可能性がある。

蛍光色素を使わずに、FRET を利用した新規カルシウム蛍光タンパク質で、ミトコンドリア Ca 変化を測定使用と試みたが、この蛋白を発現させた、心筋細胞及び培養リンパ球細胞においては、種々の試薬に対する細胞内 Ca 濃度上昇を検出することは出来なかった。また、膨化ミトコンドリア (mitoblast) からジャイアントパッチ法を応用して、inside-out パッチを作成し、ミトコンドリア Na/Ca 交換電流を測定することを試みたが、安定した結果が得られなかった。

興奮性細胞との比較のために、非興奮性細胞であるリンパ球を用いて、ミトコンドリア Na/Ca 交換活性を、細胞質 Na 依存性のミトコンドリア Ca 減少として測定した。心筋細胞と同様に、リンパ球においてもミトコンドリアからの Ca 排出の大部分は細胞質 Na に依存していることが明らかになった。リンパ球においても、ミトコンドリア Na/Ca 交換はミトコンドリア機能を制御する重要な蛋白であると推測された。

心筋細胞における Ca 感受性蛍光色素を用いた解析結果とこれまでの論文データを基に、ミトコンドリアの Ca、Na、H イオン濃度変化を良く再現する数理ミトコンドリアモデルを開発した。すなわち、既に開発していたミトコンドリア酸化的リン酸化過程の数理モデルに、Ca ユニポータ、K ユニポータ、Na/Ca 交換、Na/H 交換、K/H 交換機能を追加し、マトリックス内の Ca、Na、K 濃度変化をよく再現できるモデルを完成した。また、ミトコンドリア膜電位の計算方法を、生体膜における一般計算式である  $dV/dt = -I/C$  ( $V$ : ミトコンドリア膜電位;  $I$ : ミトコンドリア総膜電流;  $C$ : ミトコンドリア膜容量) で、計算するよう改良した。ミトコンドリア総膜電流は個々のイオントランスポータが運ぶ電荷の総和として求めた。これにより、膜電位変化を正確に再現することが可能となった。さらに、Ca によるアロステリック制御機構、及び無機リン酸による制御機構を組み込む事で、心筋ミトコンドリアのイオン動態・膜電位変化・NADH 変化、酸素消費量変化をより再現できる数理モデルが完成した。

ミトコンドリア機能と心筋細胞膜興奮-収縮連関の機能協関を定量的に解析するために、心筋細胞モデルにおいて以下の精緻化を行った。まず、心筋細胞活動電位と収縮の頻度依存性に関与する重要な因子の一つである Ca/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の詳細な数理モデルを完成し論文発表した (Chiba et al. Biophysical Journal. 査読有 2008, Vol195 No5, 2139-2149)。また、細胞内 Mg イオンの大部分は ATP に結合し、

遊離 Mg イオン濃度は 0.5-1 mM に維持されている。ミトコンドリア ATP 産生が低下するような状況では細胞質遊離 Mg 濃度が上昇し種々の影響を与えることが知られている。細胞内 Mg で制御されるタンパク質のうち、心筋細胞の静止膜電位と活動電位持続時間に強く影響する内向き整流性 K チャンネルと細胞間コミュニケーションに重要なギャップ結合蛋白について、Mg による詳細な制御モデルを作成し、ミトコンドリア代謝・Mg 濃度変化と心筋細胞活動との機能相関を解析できるコンピュータモデルを作成し論文発表した (Ishihara et al. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009, Vol147 No1:76-84; Matsuda et al. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2010, Vol103 No1, 102-110)。

包括的ミトコンドリア数理モデルの解析から、心筋ミトコンドリアのイオン動態・エネルギー代謝動態を再現するためには、ミトコンドリア Ca 感受性脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase) に加えて F1FOATPase、Phosphate carrier、Adenine nucleotide translocase、Aspartate/Glutamate Carrier の Ca による活性化が重要であることが示された。さらに、包括的ミトコンドリアモデルを組み込んだ心筋細胞数理モデルの解析から、心筋仕事量変化時のエネルギー代謝産物 (PCr, ADP, リン酸, NADH) 濃度の安定化には、ミトコンドリアにおける Ca による調節機構と無機リン酸による調節機構が重要であるという結論が得られた。

本研究では、実験面において当初の計画を一部修正したが、目的は遂行することができた。i) ミトコンドリア Na/Ca 交換と関連トランスポータがミトコンドリアマトリックス内イオン濃度を制御するメカニズム、及び ii) マトリックスのイオン濃度変化によりミトコンドリア NADH 産生及び ATP 産生が制御される機構については、実験データを基にそのキネティクスを数理モデルとして表現した包括的ミトコンドリアモデルを完成することができた。さらに、iii) ミトコンドリア機能と心筋細胞膜興奮-収縮連関の機能協関を制御するメカニズムについては、包括的ミトコンドリアモデルを心筋細胞モデルと統合したより精緻な心筋細胞モデルを作成することができた。モデルの数理解析の結果、心臓のエネルギー代謝産物の安定化には、ミトコンドリアにおける Ca 及び無機リン酸による調節機構が重要な役割を担うという知見が得られた。

## 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 9 件)

- ① Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-a. PLoS One. 査読有 2010, Vol6 No2, e16734
- ② Matsuda H, Kurata Y, Oka C, Matsuoka S, Noma A. Magnesium gating of cardiac gap junction channels. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 査読有 2010, Vol103 No1, 102-110.
- ③ Lin X, Jo H, Ishii TM, Fujita M, Fu M, Tambara K, Yamamoto M, Tabata Y, Komeda M, Matsuoka S. Controlled release of matrix metalloproteinase-1 plasmid DNA prevents left ventricular remodeling in chronic myocardial infarction of rats. Circulation Journal. 査読有 2009, Vol73 No12, 2315-2321.
- ④ Ishihara K, Sarai N, Asakura K, Noma A, Matsuoka S. Role of  $Mg^{2+}$  block of the inward rectifier  $K^+$  current in cardiac repolarization reserve: a quantitative simulation. Journal of molecular and cellular cardiology. 査読有 2009, Vol47 No1:76-84.
- ⑤ Wang J, Tsukashita M, Nishina T, Marui A, Yoshikawa E, Muranaka H, Matsuoka S, Ikeda T. Chronic partial unloading restores beta-adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in failing rat hearts. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 査読有 2009, Vol137 No2, 465-470.
- ⑥ Shimizu J, Yamashita D, Misawa H, Tohne K, Matsuoka S, Kim B, Takeuchi A, Nakajima-Takenaka C, Takaki M. Increased  $O_2$  consumption in excitation-contraction coupling in hypertrophied rat heart slices related to increased  $Na^+-Ca^{2+}$  exchange activity. Journal of Physiological Sciences. 査読有 2009, Vol59 No1, 63-74.

- ⑦ Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. Biochemical and biophysical research communications. 査読有 2009, Vol379 No1, 115-120.
- ⑧ Chiba H, Schneider NS, Matsuoka S, Noma A. A Simulation study on the activation of cardiac CaMKII delta-isoform and its regulation by phosphatases. Biophysical Journal. 査読有 2008, Vol195 No5, 2139-2149.
- ⑨ Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation. 査読有 2008, Vol118 No5, 498-506.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Satoshi Matsuoka. Mathematical modeling  $Ca^{2+}$  dependent regulation of cardiac mitochondria. International Symposium "Computational Physiology of Cardiac Myocytes and Pancreatic  $\beta$ -cells; Interaction between Energy Metabolism and Membrane Excitability". 2011年1月30日 京都市
- ② 松岡 達. コンピュータシミュレーションによる心臓機能の探索. 第27回日本心電学会学術集会. 2010年10月9日 大分市
- ③ Satoshi Matsuoka. A simulation study of compensated heart failure. BBSRC UK-Japan Collaboration "Cardiac Electro-Mechanical Function : Cell-Organ Cross-Talk Revealed via Integration of experiments and Models. 2010年9月7日 英国 オックスフォード
- ④ Ayako Takeuchi. Role of  $Ca^{2+}$ -dependent regulation in mitochondrial energy metabolism. BBSRC UK-Japan Collaboration "Cardiac Electro-Mechanical Function : Cell-Organ Cross-Talk Revealed via Integration of experiments and Models. 2010年9月6日 英国 オックスフォード

- ⑤ Satoshi Matsuoka. Simulation Study of Physiology and Pathology of Heart: An Integrated Cardiac Cell Model. 第74回日本循環器学会総会・学術集会. 2010年3月5日 京都市
- ⑥ Satoshi Matsuoka. Model and Experimental studies on regulation of mitochondrial Ca by mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. 36th International Congress of Physiological Science Satellite Symposium. 2009年8月3日 香川県 直島
- ⑦ 松岡 達. 心筋細胞におけるエネルギー代謝のシミュレーション. 第26回日本心電学会学術集会. 2009年7月4日 京都市
- ⑧ Bongju Kim, Satoshi Matsuoka. Role of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange on B cell receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> responses in DT40 cell. 36th International Congress of Physiological Sciences. 2009年7月28日 京都市
- ⑨ Matsuoka S. Computational integration of cardiac cell function. 2009 IUPS International Conference of Physiological Sciences. 2009年1月16日 韓国 Busan
- ⑩ 松岡 達. Kyoto Model: 心筋細胞機能の包括的シミュレーション. 自然科学研究機構「自然科学における階層と全体」平成20年度シンポジウム. 2008年12月17日 蒲郡市
- ⑪ Matsuoka S. Computational integration of cardiac cell function. 2008 Annual Conference of the Korean Association of Biological Sciences. 2008年8月20日 韓国 Mokpo
- ⑫ Matsuoka S. Cell/Biodynamics simulation project in Kyoto university: Medical systems biology of the heart. International Physiome Symposium2008 “Toward Holistic Medicine: Physiome and Oriental Medicine”. 2008年4月11日 韓国 Seoul

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 達 (MATSUOKA SATOSHI)  
 京都大学・医学研究科・特定准教授  
 研究者番号：00263096

### (2) 研究分担者

金 鳳柱 (KIM BONGJU)  
 京都大学・医学研究科・研究員  
 研究者番号：80511823

### (3) 連携研究者

高塚 賢二 (TAKATSUKA KENJI)  
 京都大学・医学研究科・研究員  
 研究者番号：70378701

竹内 綾子 (TAKEUCHI AYAKO)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：00378704