

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390042

研究課題名(和文)ミトコンドリアNa-Ca交換蛋白(NCLX)の構造と機能連関に関する研究

研究課題名(英文)Study on structure and function of mitochondria Na-Ca exchange(NCLX)

研究代表者

松岡 達(MATSUOKA, Satoshi)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00263096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：培養Bリンパ球において、ミトコンドリアNa-Ca交換体(NCLX)は、ミトコンドリアCa排出、小胞体Ca量調節、抗原受容体刺激で誘発される小胞体Ca放出、ストア作動性Ca流入、ケモタクシスに関与することが明らかになった。培養心筋細胞(HL-1細胞)においては、リンパ球と同様に、NCLXはミトコンドリアCa排出と筋小胞体Ca量調節に関与するのみならず、細胞収縮周期にも関連することが明らかになった。これらの結果は、Bリンパ球細胞数理モデル、HL-1細胞数理モデル、心臓洞房結節細胞数理モデルにおいて、再現できた。NCLXはミトコンドリアから筋小胞体/小胞体へのCa供与体として作動すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In B lymphocyte cell lines (A20 and DT 40), it was demonstrated that mitochondrial Na/Ca exchanger (NCLX) is associated with mitochondrial Ca extrusion, modulation of endoplasmic reticulum Ca content, endoplasmic reticulum Ca release upon BCR-stimulation, store-operated Ca entry and chemotaxis. In cardiomyocyte cell line (HL-1), it was also demonstrated NCLX extrudes mitochondrial Ca and modulates sarcoplasmic reticulum Ca content. Additionally, it was found that NCLX modulates spontaneous beating frequency. These results were well reproduced by mathematical models of B lymphocyte, HL-1 cell and sinoatrial node cell. Taken together, it was suggested that NCLX act as a Ca provider from mitochondria to sarco- and endo-plasmic reticulum.

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：トランスポーター ミトコンドリア カルシウム 心筋細胞 リンパ球 シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

松岡は、ゲノム検索から見つかり Na-Ca,K 交換体の一つのサブタイプとして報告された NCLX (または NCKX6) が、B リンパ球 (DT40) においてミトコンドリアに発現し、ミトコンドリアの Na-Ca 交換体であることを発見していた。研究当初、リンパ球、心筋細胞における NCLX の役割は明らかでなかったが、予備的実験から、NCLX はミトコンドリアのみならず小胞体の Ca²⁺量を制御する蛋白であるとの仮説を得ていた。

2. 研究の目的

本研究においては、上記仮説を検証するとともに、NCLX がミトコンドリアと小胞体の Ca²⁺量を制御するメカニズムを明らかにする。さらに、Ca²⁺が周期的に変化する心筋細胞において、NCLX を介するミトコンドリア・小胞体コミュニケーションが、興奮収縮連関において果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

非興奮性細胞であるリンパ球 (DT40 B 細胞, A20 B 細胞) と興奮性細胞である心筋細胞 (株化培養心筋細胞 HL-1 細胞) を用いて、ミトコンドリア Na-Ca 交換蛋白 NCLX の機能解析を行う。平行して、ミトコンドリア・(筋)小胞体コミュニケーションの数理モデル作成と解析を行う。

4. 研究成果

培養 B リンパ球 (A20, DT0) において、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換体遺伝子 (NCLX) をノックアウトまたはノックダウンすると、ミトコンドリア Ca²⁺排出が著明に抑制されるのみならず、小胞体 Ca²⁺含量の減少、小胞体 Ca²⁺ポンプ (SERCA) による Ca²⁺取り込みの減少、小胞体からの Ca²⁺リークの増加がおこり、その結果、細胞膜抗原受容体刺激で誘発される小胞体 Ca²⁺放出が著明に抑制された (図 1)。既存のミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換体阻害薬も同様の効果を示した。

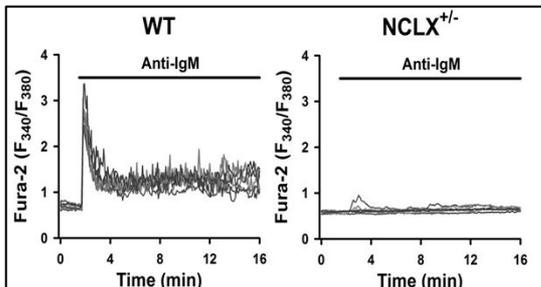


図1 NCLX^{+/−}DT40 Bリンパ球では、抗原受容体刺激後の細胞質Ca²⁺応答が抑制される。

た。

B リンパ球の Ca²⁺動態を再構築した数理モデルにおいても再現され、NCLX が SERCA への Ca²⁺供与体として働くことが明らかになった。また、小胞体 Ca²⁺枯渇により

誘発されるストア作動性 Ca²⁺流入にともなう細胞質 Ca²⁺増加も著明に抑制された。しかし、細胞質 Ca²⁺増加の初速度低下はわずかであるので、NCLX ヘテロノックアウトにより相当量の Ca²⁺がミトコンドリアにトラップされるために、細胞質 Ca²⁺増加が抑制される

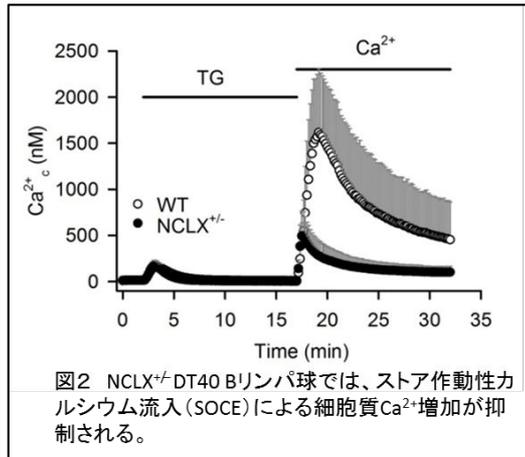


図2 NCLX^{+/−}DT40 Bリンパ球では、ストア作動性カルシウム流入 (SOCE) による細胞質Ca²⁺増加が抑制される。

と考えられた (図 2)。

さらに、A20 における NCLX ノックダウンは、ランダムな細胞運動を増加させ、CXCL12 に向かうケモタクシスを抑制した。リンパ球において NCLX が多様な細胞機能に關与することが示唆された。

自動能を有する興奮性細胞である株化培養心筋細胞 (HL-1 細胞) を用いて、NCLX の機能解析を進めた。リンパ球と同様に、NCLX ノックダウンは、ミトコンドリア Ca²⁺排出を抑制し、筋小胞体 Ca²⁺含量を減少させた。その結果、細胞質 Ca²⁺トランジエント立ち上がりと活動電位立ち上がりの遅延を引

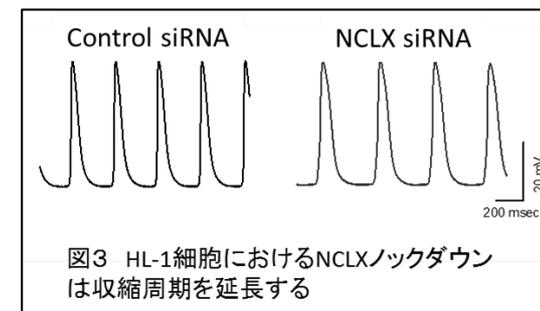


図3 HL-1細胞におけるNCLXノックダウンは収縮周期を延長する

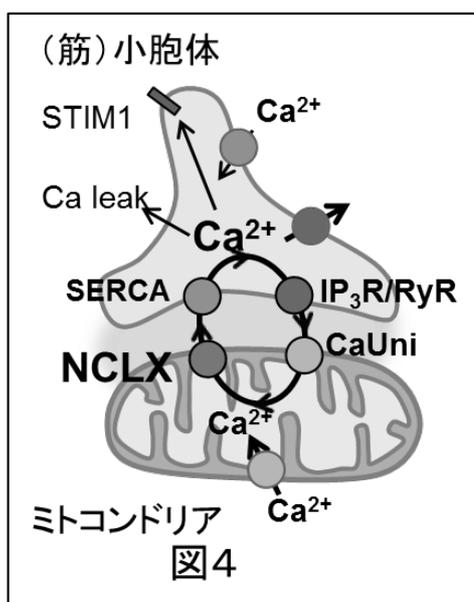
き起こし、収縮周期を延長した (図 3)。

HL-1 細胞の興奮-収縮連関の数理モデルを構築し解析したところ、HL-1 細胞は筋小胞体からの Ca²⁺の自発的な放出により拍動ベースが制御される“Ca²⁺ クロック”メカニズムにより駆動することが判明し、NCLX は HL-1 細胞の“Ca²⁺ クロック”に關与すると考えられた。

これまでの研究から、ミトコンドリアに存在する NCLX と筋小胞体 / 小胞体に存在する Ca²⁺ポンプ (SERCA) は極めて近い位置に局在すると推測される。そこで、CoralHue/Fluo-chase Kit を用いて、SERCA1-3 と NCLX の局在化の有無を

HEK293 細胞において検討したところ、SERCA と NCLX は極めて近い位置に局在することが示唆された。また、ミトコンドリアと筋小胞体 / 小胞体間サブスペースを組み込んだ数理モデルを作成し、B リンパ球数理モデルと心臓洞房結節細胞数理モデルに実装した。サブスペースのないこれまでの数理モデルに比べて、B リンパ球数理モデルにおいては BCR 刺激後の細胞内 Ca^{2+} 増加が、心臓洞房結節細胞数理モデルにおいては細胞収縮頻度が、より NCLX 機能に依存した。ミトコンドリアと筋小胞体 / 小胞体間サブスペースは、細胞機能に重要な役割を担うことが示唆された。

本研究により、NCLX はミトコンドリア Ca^{2+} 排出のみならず、筋小胞体 / 小胞体への Ca^{2+} 供与体として働くことで、筋小胞体 / 小胞体 Ca^{2+} 量を調節することが明らかになった (図 4)。その結果、B リンパ球では、抗原受容体刺激時の細胞内 Ca^{2+} 応答、培養心筋細胞では収縮リズムに寄与することが明ら



かになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Uosaki H, Magadam A, Seo K, Fukushima H, [Takeuchi A](#), Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, [Matsuoka S](#), Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK. Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(6):624-33. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000330.

[Takeuchi A](#), [Kim B](#), [Matsuoka S](#). The mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1

cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2013;3:2766. doi: 10.1038/srep02766. 査読有

Otsuka A, Nakajima S, Kubo M, Egawa G, Honda T, Kitoh A, Nomura T, Hanakawa S, Sagita Moniaga C, [Kim B](#), [Matsuoka S](#), Watanabe T, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun*. 2013;4:1738. doi: 10.1038/ncomms2740. 査読有

[Kim B](#), [Takeuchi A](#), Koga O, Hikida M, [Matsuoka S](#). Mitochondria Na^{+} - Ca^{2+} exchange in cardiomyocytes and lymphocytes. *Adv Exp Med Biol*. 2013;961:193-201. doi: 10.1007/978-1-4614-4756-6-16. 査読有

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(2):431-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.041. 査読有

[Kim B](#), [Takeuchi A](#), Koga O, Hikida M, [Matsuoka S](#). Pivotal role of mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchange in antigen receptor mediated Ca^{2+} signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *J Physiol*. 2012;590(3):459-74. doi: 10.1113/jphysiol.2011.222927. 査読有

Bahrudin U, Morikawa K, [Takeuchi A](#), Kurata Y, Miake J, Mizuta E, Adachi K, Higaki K, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Yoshida A, Kato M, Yamamoto K, Nanba E, Morisaki H, Morisaki T, [Matsuoka S](#), Ninomiya H, Hisatome I. Impairment of Ubiquitin-Proteasome System by E334K cMyBPC Modifies Channel Proteins, Leading to Electrophysiological Dysfunction. *J Mol Biol*. 2011;413(4):857-78. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.006. 査読有

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(9):e25538. doi: 10.1371/journal.pone.0025538. 査読有

Quinn TA, Granite S, Allesie MA, Antzelevitch C, Bollensdorff C, Bub G, Burton RA, Cerbai E, Chen PS, Delmar M, Difrancesco D, Earm YE, Efimov IR,

Egger M, Entcheva E, Fink M, Fischmeister R, Franz MR, Garny A, Giles WR, Hannes T, Harding SE, Hunter PJ, Iribe G, Jalife J, Johnson CR, Kass RS, Kodama I, Koren G, Lord P, Markhasin VS, Matsuoka S, McCulloch AD, Mirams GR, Morley GE, Nattel S, Noble D, Olesen SP, Panfilov AV, Trayanova NA, Ravens U, Richard S, Rosenbaum DS, Rudy Y, Sachs F, Sachse FB, Saint DA, Schotten U, Solovyova O, Taggart P, Tung L, Varró A, Volders PG, Wang K, Weiss JN, Wettwer E, White E, Wilders R, Winslow RL, Kohl P. Minimum Information about a Cardiac Electrophysiology Experiment (MICEE): Standardised reporting for model reproducibility, interoperability, and data sharing. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;107(1):4-10. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.001. 査読有
Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, Matsuoka S, Nakatsuji N, Yamanaka S, Yamashita JK. Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression. *PLoS One*. 2011;6(8):e23657. doi: 10.1371/journal.pone.0023657. 査読有

[学会発表](計 22件)

Matsuoka S, Takeuchi A, Mitochondria-Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Communication on the Rhythmicity of Sinoatrial Node Cells. Cardiac Physiome Workshop 2013 (招待講演)2013年10月17~19日, 2013. Bar Harbor Regency, Bar Harbor, ME
2) 松岡 達, 金 鳳柱, 竹内 綾子, 古賀 織絵, 疋田 正喜.リンパ球 Ca 応答の数理モデル解析 第91回日本生理学会大会シンポジウム”数理生理学の新たな展開“ 2014年3月16~18日 鹿児島市(鹿児島大学)
竹内 綾子, 松岡 達. ミトコンドリア $Na-Ca$ 交換体 NCLX を介した心筋ミトコンドリア-筋小胞体 Ca クロストークと自動能制御. 第91回日本生理学会大会シンポジウム”(興奮性細胞におけるオルガネラ特異的な Ca^{2+} シグナリングと生体応答“鹿児島大学 2014年3月16~18日 鹿児島市(鹿児島大学)
竹内 綾子, 金 鳳柱, 松岡 達. ミトコンドリア-(筋)小胞体 Ca^{2+} クロストークと細胞機能連関. 第91回日本生理学会大会 鹿児島大学 2014年3月16~18日 鹿児島市(鹿児島大学)

竹内綾子, 松岡達. 細胞容積調節におけるチャンネル・トランスポーターの寄与~包括的心筋細胞数理モデルと細胞生理実験によるイオン・水動態の解明~. 水シグナル研究会「水シグナリングの分子動態から病態へ」. 2014年3月5~6日. 福井市 アオッサ

Takeuchi A, Matsuoka S. Simulation analyses of the role of NCLX, a mitochondrial $Na^{+}-Ca^{2+}$ exchanger, on the regulation of automaticity in sinoatrial node cells. Cardiac Physiome Workshop 2013. 2013年10月17~19日, 2013. Bar Harbor Regency, Bar Harbor, ME. USA.

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. Contribution of Mitochondrial $Na^{+}-Ca^{2+}$ Exchanger, NCLX, in Making the Cardiac Rhythmicity. A Combination Study of Experiments and Simulations. The 2nd HD Physiology International Symposium: Multi-Level Systems Biology. 2013年6月28日 東京丸の内 MY PLAZA.

Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi, Bongju Kim. Fine-Tuning of Cardiac Automaticity by Mitochondria $Na^{+}-Ca^{2+}$ Exchange (NCLX). 2012 Cardiac Physiome Workshop (招待講演). 2012年10月30日~11月2日. San Diego USA.

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. Mechanism for NCLX reduction-mediated slowing of cardiomyocyte beating rate. 2012 Cardiac Physiome Workshop. 2012年10月30日~11月2日. San Diego USA.

Kim B, Takeuchi A, Matsuoka S. Role of mitochondrial NCX on CXCL12-induced chemotaxis in A20 B lymphocytes. 57th Annual Meeting of Biophysical Society. 2013年2月2~6日 Philadelphia, USA.
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S.

Prolongation of beating rate caused by reduction of NCLX, a mitochondrial $Na^{+}-Ca^{2+}$ exchanger, in HL-1 cardiomyocytes. 57th Annual Meeting of Biophysical Society. 2013年2月2~6日 Philadelphia, USA.

金 鳳柱, 竹内 綾子, 松岡 達. B細胞の走化性を調節するミトコンドリア NCX 第90回日本生理学会大会 2013年3月27~29日 東京

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達. ミトコンドリア NCX (NCLX) による心自動能制御-数理モデル解析による考察 第90回日本生理学会大会 2013年3月27~29日 東京

Satoshi Matsuoka, Bongju Kim, Ayako Takeuchi, Masaki Hikida.

Mitochondrial Na/Ca exchange in excitable and non-excitable cells. 4th Cardiac Physiome Conference (招待講演), 2011年7月8日. Merton College, Oxford UK.

Ayako Takeuchi, Ryuta Saito, Yukiko Himeno, Akinori Noma, and Satoshi Matsuoka. Simulation study of Ca²⁺-dependent mitochondrial regulation in cardiac excitation-contraction coupling. 4th Cardiac Physiome Conference, 2011年7月8日. Merton College, Oxford UK.

Satoshi Matsuoka, Bongju Kim, Ayako Takeuchi, Masaki Hikida. Roles of mitochondria NCX (NCLX) on antigen-receptor mediated Ca²⁺ signaling in B lymphocytes. 6th International Conference on Na⁺/Ca²⁺ Exchange 2011 (招待講演). 2011年10月1~5日, Lacco Ameno, Ischia Island, Naples, Italy.

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. Functional characterization of a mitochondrial Na/Ca exchanger (NCLX) in cardiac cell line, HL-1. 6th International Conference on Na⁺/Ca²⁺ Exchange 2011. 2011年10月1~5日, Lacco Ameno, Ischia Island, Naples, Italy.

Bongju Kim, Ayako Takeuchi, Orié Koga, Masaki Hikida, and Satoshi Matsuoka. Role of mitochondrial Na-Ca exchange on B Cell Receptor-mediated Ca²⁺ signaling in DT40 and A20 B lymphocytes. 日光シンポジウム: 膜輸送体研究の前衛を目指して 2011年12月17-18日, 日光市(日光東照宮晃陽苑) Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, and Matsuoka S. Role of mitochondrial Na-Ca exchange on BCR-mediated Ca²⁺ signalling in B lymphocytes. 56th Annual Meeting of Biophysical Society, 2012年2月25~29日, San Diego, California, USA.

Takeuchi A, Kim B and Matsuoka S. Regulation of cardiomyocyte function via mitochondrial NCX (NCLX). シンポジウム「心筋のE-Cカップリング: 心機能と病態を制御する新しいCa²⁺シグナル調節分子」第89回日本生理学会大会 2012年3月29-31日 松本市(松本文化会館)

② Kim B, Takeuchi A and Matsuoka S. 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29-31日 松本市(松本文化会館)

② Takeshita D, Hattoria H, Matsuoka S,

Shibata M, Kim B, Takeuchi A, Zhang G, Obata K, and Takaki M. Na⁺/H⁺ exchanger-1 blocker treatment reversed changes in calcium transient in myocardial slices from isoproterenol-induced hypertrophied rat left ventricles. 第89回日本生理学会大会 2012年3月29-31日 松本市(松本文化会館)

〔図書〕(計2件)

竹内綾子・松岡達 心室筋細胞興奮収縮連関のシミュレーション実習 新訂・生理学実習書 南江堂 2013年09月 310ページ

Matsuoka S, Takeuchi A. Giant patch and macro patch. In Patch clamp techniques. From beginning to advanced protocols. Edited by Okada Y. Springer, 2012. 439 pages.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ:
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/index.html>

<http://seiri2.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 達 (MATSUOKA, Satoshi)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 00263096

(2)研究分担者

竹内 綾子 (TAKEUCHI, Ayako)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号: 00378704

(3)連携研究者

金 鳳柱 (KIM, Bongju)
徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター・助教
研究者番号: 80511823