

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：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689011

研究課題名(和文)細胞内Clダイナミクスタンパクをターゲットとした新規細胞機能制御法の開発

研究課題名(英文)Controlling cellular function via modulating cytosolic chloride dynamics

研究代表者

竹内 綾子 (Takeuchi, Ayako)

福井大学・医学部・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) 18,100,000円、(間接経費) 5,430,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「細胞内Cl-Caダイナミクス連関」とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。興奮性細胞として心筋細胞を、非興奮性細胞としてBリンパ球細胞を選択し、細胞生理学実験及びコンピュータシミュレーションを行うことにより、以下の研究成果を得た。1. 細胞内にClストアが存在し、細胞内Clダイナミクスに寄与することを示した。2. 細胞内Cl-Caダイナミクス連関の存在を明らかにした。3. ミトコンドリアが細胞内Cl-Caダイナミクスに關与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify the mechanisms and significances of "cellular Cl-Ca dynamics coupling". To achieve the goals, I picked up two kinds of cells, cardiomyocytes and lymphocytes as typical excitable and non-excitable cells, respectively, and performed a combination study of cellular physiological experiments and mathematical simulations. As a result, I obtained following achievements. 1. There is an intracellular Cl store which is involved in the cellular Cl dynamics. 2. "Cellular Cl-Ca dynamics coupling" do exist. 3. Mitochondria are major organelle which participate in the "cellular Cl-Ca dynamics coupling".

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：Clダイナミクス Caダイナミクス 細胞内小器官

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、細胞内 Cl⁻濃度、細胞容積変化が相関すること、細胞膜 Ca²⁺輸送担体が細胞膜電位変化を介して間接的にこれらを制御することを明らかにしてきた (Kuzumoto et al., *Prog Biophys Mol Biol*, 2008; Takeuchi et al., *Ann NY Acad Sci*, 2007; Takeuchi et al., *J Gen Physiol*, 2006; Terashima et al., *Phil Transact Roy Soc A*, 2006)。一方、細胞内 Ca²⁺動態の多くは (筋)小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官を介したフラックスに依っている。電気的中性則を考慮すると、細胞内小器官を介して Cl⁻が Ca²⁺のカウンターイオンとして動いている可能性があり、細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ダイナミクス連関の存在が示唆される。

2. 研究の目的

細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ダイナミクス連関のメカニズムを明らかにするとともに、細胞の生理機能発現における細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ダイナミクス連関の役割を調べる。

3. 研究の方法

(筋)小胞体を介した Ca²⁺放出機構が大きく異なる二種類の細胞 (興奮性細胞である心筋細胞; リアノジン受容体、非興奮性細胞であるリンパ球細胞; IP₃ 受容体) を選択し、以下の検討を行った。

(1) 細胞内 Cl⁻動態の測定

細胞内 Cl⁻センサーである FRET タンパク clomeleon (Kuner and Augustine, *Neuron*, 2000) を細胞にトランスフェクションし、フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡、高感度 CCD カメラを用いて W-VIEW システム (浜松ホトニクス、AQUACOSMOS) を利用したレシオメトリーにより測定した。

(2) ミトコンドリア Cl⁻センサー

(clomeleon-mito) の作成

FRET タンパク clomeleon の N 末端にミトコンドリア標的シグナル配列 (MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHS L) を付加した。

(3) 細胞内小器官に発現する Cl⁻輸送体遺伝子の発現解析

細胞から total RNA を抽出し (QIAGEN, RNeasy mini kit)、RT-PCR (Roche, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, High Fidelity PCR System) を行った。

(4) 細胞質内 Ca²⁺動態の測定

心筋細胞; Ca²⁺感受性色素 indo-1 を細胞に負荷し (10 μM, 30 分間) フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡 (ニコン、Eclipse TE2000)、高感度 CCD カメラ (浜松ホトニクス EM-CCD カメラ C9100) を用いて W-VIEW システム (浜松ホトニクス、AQUACOSMOS) を

利用したレシオメトリーにより測定した。リンパ球細胞; Ca²⁺感受性色素 fura-2 を細胞に負荷し (5 μM, 20 分間) フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡 (ニコン、Eclipse Ti)、高感度 CCD カメラ (浜松ホトニクス EM-CCD カメラ ImagEM) を用いてレシオメトリーにより測定した。

(5) ミトコンドリア Ca²⁺動態の測定

Ca²⁺感受性色素 rhod-2 を細胞に負荷し (5 μM, 30 分間) サポニンまたは β-escin で細胞膜を透過後、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス、FV500) または高感度 CCD カメラを搭載した蛍光顕微鏡システムで測定した。

(6) (筋)小胞体 Ca²⁺動態の測定

(筋)小胞体 Ca²⁺センサーである FRET タンパク cameleon D1ER (Palmer et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004) を細胞にトランスフェクションし、フォーカスドリフト補正機能を有する顕微鏡、高感度 CCD カメラを用いて W-VIEW システムを利用したレシオメトリーにより測定した。

(7) コンピュータシミュレーション

ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、イオン動態などを実装した包括的心筋細胞モデル、包括的 B リンパ球細胞モデルを構築した。これらの包括的細胞モデルを用いて、細胞機能発現におけるミトコンドリアの寄与を解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内 Cl⁻ダイナミクスにおける細胞内 Cl⁻ストアの寄与

HL-1 細胞並びに A20 B リンパ球細胞に古典的な Cl⁻チャネルブロッカー (niflumic acid) を添加すると、細胞内 Cl⁻濃度の増大が認められた (図)。

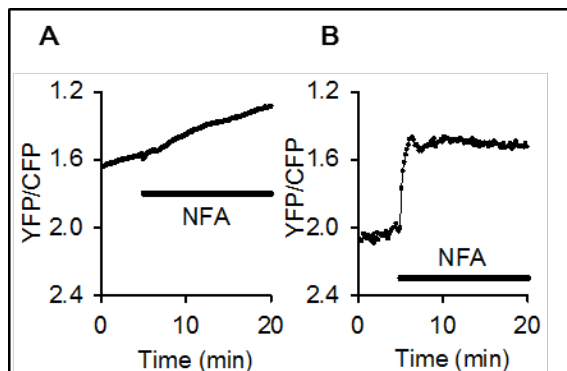


図. 100 mM niflumic acid (NFA) 添加により細胞内 Cl⁻濃度は増大する。A. HL-1 細胞。B. A20 B リンパ球細胞。YFP/CFP の減少は細胞内 Cl⁻濃度の増大を意味する。

特に効果が大きかった A20 細胞について、そのメカニズムを解析した。細胞外 Cl⁻濃度を変えたときの細胞内 Cl⁻濃度の変化は極めて

小さいことから、A20 B リンパ球の細胞膜 Cl⁻ コンダクタンスは小さいことが考えられた。従って、Cl⁻ チャネルブロッカー添加による細胞内 Cl⁻ 濃度増大は、細胞外からの Cl⁻ 流入ではなく、細胞内 Cl⁻ ストアからの放出に起因することが示唆された。

(2) 細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関と小胞体ならびにミトコンドリア

小胞体 Ca²⁺ ポンプ SERCA の阻害剤である thapsigargin を添加しても、細胞内 Cl⁻ 濃度に著明な変化は認められなかった。一方、ミトコンドリア脱共役剤 FCCP の添加によりミトコンドリア膜電位を脱分極させると、細胞内 Cl⁻ 濃度の著しい増大が認められた。また、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺ 交換体の阻害剤 CGP-37157 を添加すると、HL-1 細胞では細胞内 Cl⁻ 濃度の減少が、A20 B リンパ球細胞では細胞内 Cl⁻ 濃度の一過性の減少の後増大が観察された。さらに、BAPTA-AM を用いて細胞内 Ca²⁺ をキレートすると、細胞内 Cl⁻ 濃度は著しく増大した。これらの結果から、細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関が存在することを確認することができた。また、研究開始当初は(筋)小胞体 Ca²⁺ 動態と細胞内 Cl⁻ 動態の連関を想定していたが、細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関には主にミトコンドリアが関与することが強く示唆された。これらの成果について、現在論文準備中である。

(3) 細胞内小器官 Cl⁻ 輸送体の候補遺伝子の探索

これまでの結果から、細胞内小器官、特にミトコンドリアに発現する Cl⁻ 輸送担体が、細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関に関与することが考えられた。そこで、その候補遺伝子を探索した。細胞内小器官での発現が報告されている Cl⁻ 輸送担体の候補としては、CLIC ファミリーと CLC ファミリーが挙げられる。HL-1 細胞並びに A20 B リンパ球細胞では、そのうち CLIC1, CLIC4, CLCN4 が共通して発現していた。これらの遺伝子について、A20 B リンパ球細胞を用いて siRNA による遺伝子ノックダウン実験を行った。しかし、いずれのノックダウン細胞でも細胞内 Cl⁻ 動態に変化は認められなかった。従って、新規 Cl⁻ 輸送タンパクが存在することが強く示唆された。ミトコンドリア内 Cl⁻ 濃度を選択的に評価するために、ミトコンドリア Cl⁻ センサー clomeleon-mito を作成し、ミトコンドリアへの局在を確認した。

(4) 細胞内小器官 Ca²⁺ ダイナミクスの基本動作原理

これまでの結果から、細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関にミトコンドリアが関与することが示唆されたため、ミトコンドリア Ca²⁺ 動態について調べた。2010 年、NCLX (slc24a6) が、ミトコンドリアからの Ca²⁺ 排出を担うミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺ 交換体の責任遺伝子で

あることが報告された (Palty et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010)。研究代表者は、培養心筋細胞 HL-1 細胞並びに培養 B リンパ球細胞 DT40, A20 細胞を用いて、NCLX 遺伝子ヘテロノックアウトならびに siRNA による NCLX 遺伝子ノックダウン実験を行った。その結果、NCLX ヘテロノックアウト、NCLX ノックダウン細胞では、ミトコンドリアからの Na⁺ 依存性 Ca²⁺ 排出が著明に低下すること、(筋)小胞体 Ca²⁺ 含量が減少することを明らかにした。また、HL-1 細胞では自発興奮周期の延長が惹起され、A20 ならびに DT40B リンパ球細胞においては、抗 IgG、IgM 抗体による細胞膜抗原受容体刺激で誘発される小胞体 Ca²⁺ 放出の抑制が惹起されることを見出した。さらに、コンピュータシミュレーションによるメカニズム解析から、NCLX が(筋)小胞体 Ca²⁺ 動態を修飾することで、細胞機能を制御することを示した (Kim et al., *J Physiol*, 2012; Kim et al., *Adv Exp Med Biol.*, 2013; Takeuchi et al., *Sci Rep*, 2013)。従って、ミトコンドリア Cl⁻ 動態も細胞内 Cl⁻-Ca²⁺ ダイナミクス連関を介して、これらの細胞機能に関与することが推察された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Scientific Reports*. 3, 2766, 2013. DOI: 10.1038/srep02766. 査読有
Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. Mitochondria Na⁺-Ca²⁺ Exchange in Cardiomyocytes and Lymphocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 961, 193-201, 2013. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 419(2): 431-435, 2012. 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⁺-Ca²⁺ exchange in antigen receptor mediated Ca²⁺ signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *The Journal of Physiology*. 590(Pt 3):459-474, 2012. 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. *Journal of Molecular Biology*. 413(4): 857-878, 2011. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.006. 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* 6(8): e23657, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023657. 査読有

[学会発表](計 28 件)

Matsuoka S, Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M. 「Simulation study of Ca^{2+} response in lymphocytes」第 91 回日本生理学会大会(2014 年 3 月 17 日、シンポジウム、鹿児島)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Mitochondria-endoplasmic/sarcoplasmic reticulum Ca crosstalk and cellular function」第 91 回日本生理学会大会(2014 年 3 月 18 日、鹿児島)
竹内綾子, 松岡達 「細胞容積調節におけるチャネル・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、(2014 年 3 月 6 日、福井)
竹内綾子, 松岡達 「システム生理学研究による細胞内イオンダイナミクス—細胞生理機能連関の包括的理解」第 7 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、(2013 年 11 月 24 日、仙台)
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」2013 Cardiac Physiome Workshop (2013 年 10 月 17 日~19 日、Bar Harbor)
竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達 「拍動培養心筋細胞 HL-1 におけるミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX の役割」生理学研究所研究会、(岡崎、2012 年 11 月 21 日)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Mechanisms underlying NCLX reduction-mediated slowing of cardiomyocyte beating rate」Cardiac Physiome Workshop (2012 年 10 月 31 日~11 月 3 日、San Diego)
Kim B, Takeuchi A, Matsuoka S. 「Mitochondrial NCX controls directional migration of B lymphocytes」第 90 回日本生理学会大会(2013 年 3 月 27 日~29 日、東京)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Theoretical analysis of mitochondrial NCX(NCLX) mediated regulation of cardiac

automaticity」第 90 回日本生理学会大会(2013 年 3 月 27 日、東京)
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 3 日、Philadelphia)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Inhibition of a mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchanger, NCLX, slows beating rate of cardiomyocyte」第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(2012 年 11 月 23 日~24 日、京都)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Regulation of “Ca clock”-mediated cardiac automaticity by mitochondrial NCX (NCLX)」12th Symposium of the European Calcium Society (2012 年 9 月 9 日~12 日、Toulouse)
竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達 「心筋細胞の自動能発生におけるミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX の役割」第 7 回トランスポーター研究会(京都、2012 年 6 月 9 日~10 日)
Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 「Regulation of cardiomyocyte function via mitochondrial NCX (NCLX)」第 89 回日本生理学会大会(2012 年 3 月 29 日、シンポジウム、松本)
Kim B, Takeuchi A, Matsuoka S. 「Role of mitochondrial NaCa exchange on BCR-mediated Ca^{2+} signalling in B lymphocytes」56th Annual Meeting of Biophysical Society(2012 年 2 月 29 日、San Diego)
竹内綾子, 齊藤 隆太, 姫野友紀子, 野間昭典, 松岡達 「Theoretical analysis of the mechanisms underlying cardiac energy homeostasis」第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(2011 年 11 月 26 日~27 日、名古屋)
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^+ / Ca^{2+} Exchange 2011 (2011 年 10 月 1 日、Naples)
竹内綾子, Gadsby DC. 「リン酸アナログによる Na/K pump-channel の細胞質側ゲーティング制御」生理学研究所研究会、(2011 年 9 月 8 日、岡崎)
Takeuchi A, Saito R, Himeno Y, Noma A, Matsuoka S. 「Simulation study of Ca^{2+} -dependent mitochondrial regulation in cardiac excitation-contraction coupling」4th Cardiac Physiome Workshop (2011 年 7 月 8 日、Oxford)

[図書](計 2 件)

松岡達, 竹内綾子. 心室筋細胞興奮収縮連関. In 生理学実習書. 日本生理学会教育

委員会 監修, 南江堂, 12 章-2, pp237-243,
2013. 総ページ数 296 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
Protocols, Tokyo, Chapter 14, pp207-218,
2012. 総ページ数 439 ページ.

〔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/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹内綾子 (TAKEUCHI, Ayako)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号 : 0 0 3 7 8 7 0 4