

## Bリンパ球細胞機能を制御する新規Cl<sup>-</sup>輸送体の同定

研究代表者： 竹内 綾子（医学部・特命助教）

概 要	細胞内 Cl <sup>-</sup> 動態は、Bリンパ球の様々な機能（抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca <sup>2+</sup> 応答性や走化性、ミトコンドリア機能など）と密接に関与する。しかし、既存の Cl <sup>-</sup> 輸送担体の遺伝子ノックダウン、過剰発現では、これらの Bリンパ球機能に変化が認められないことから、新規 Cl <sup>-</sup> 輸送体の存在が強く示唆される。本研究では、Bリンパ球機能を制御する新規 Cl <sup>-</sup> 輸送体の同定を目指して、細胞生理学的・分子生物学的実験を行い、以下の知見を得た。新規 Cl <sup>-</sup> 輸送体は、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度やミトコンドリア膜電位による制御を受けた。細胞内 Cl <sup>-</sup> 濃度、ミトコンドリア膜電位を指標にフローサイトメトリーにより細胞を分取し、DNAマイクロアレイに供した。その結果、細胞内 Cl <sup>-</sup> 動態への関与が予測される候補遺伝子を抽出した。
関連キーワード	Bリンパ球、Cl <sup>-</sup> 輸送体、ミトコンドリア、DNAマイクロアレイ、クローニング

### 研究の背景および目的

我々は、種々の Cl<sup>-</sup>輸送体を幅広く阻害する niflumic acid (NFA) の添加により、培養 Bリンパ球細胞 A20 の細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が著しく増大すること、それとともにミトコンドリア膜電位が脱分極することを見出した。また、NFA 存在下では、抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup>応答が減弱した。すなわち、細胞内 Cl<sup>-</sup>動態は、Bリンパ球細胞の機能と密接に関与する。しかし、既存の Cl<sup>-</sup>輸送体 (CLC や CLIC ファミリー) について、A20 Bリンパ球細胞における遺伝子ノックダウン及び過剰発現を行ったが、フェノタイプに違いは認められなかった。そこで、新規 Cl<sup>-</sup>輸送体が、「Cl<sup>-</sup>ダイナミクス-ミトコンドリア機能-Bリンパ球機能連関」を制御するとの考えに至った。Bリンパ球の機能（細胞内イ

オン濃度変化の程度や運動性など）には大きなばらつきが存在する。本研究では、このばらつきを利用して、フローサイトメトリーにより細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度、ミトコンドリア膜電位を指標に細胞を分取し、トランスクリプトーム解析と組み合わせる。これによって、新規 Cl<sup>-</sup>輸送体のクローニングに挑戦する。

本研究により、新規 Cl<sup>-</sup>輸送体を中心とした「Cl<sup>-</sup>ダイナミクス-ミトコンドリア機能-Bリンパ球機能連関」の全体像が明らかとなれば、Bリンパ球細胞機能を制御するメカニズムの理解が飛躍的に進展し、新たな免疫制御法の開発にもつながると期待される。

### 研究の内容および成果

#### 1. マウス由来培養 Bリンパ球細胞 A20 を用いた細胞内 Cl<sup>-</sup>動態-ミトコンドリア機能-細胞機能連関の解析

マウス由来 A20 Bリンパ球細胞に細胞内 Cl<sup>-</sup>センサーである FRET タンパク clomeleon をトランスフェクションし、種々の条件における細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の変化を測定した (図 1)。NFA の添加により、細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度は著しく増大した (A; clomeleon の YFP/CFP シグナルの減少は細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の増大に相当)。BAPTA-AM によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>をキレートすると、細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度は徐々に増大し、NFA による更なる増大は認められなかった (B)。FCCP によってミトコンドリア膜電位を脱分極させると、細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度は徐々に増大し、NFA による更なる増大は認められなかった (C)。細胞内 Cl<sup>-</sup>動態の修

飾によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度やミトコンドリア膜電位が変化するのみならず、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度やミトコンドリア膜電位によって、細胞内 Cl<sup>-</sup>動態が制御されることが明らかとなった。すなわち、「Cl<sup>-</sup>ダイナミクス-ミトコンドリア機能-Bリンパ球機能連関」が存在することを確認できた。

#### 2. 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度、ミトコンドリア膜電位を指標とした細胞の分取

図 1A で示した NFA による細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度変化の大きさと、NFA 添加前の細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度には、相関が認められた。したがって、NFA 添加前の細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の大きさを指標に細胞を分取し、トランスクリプトーム解析によって *in silico subtraction* を行えば、NFA による細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度変化を担う新規 Cl<sup>-</sup>輸送体を同定できると考えた。そこで、セルソー

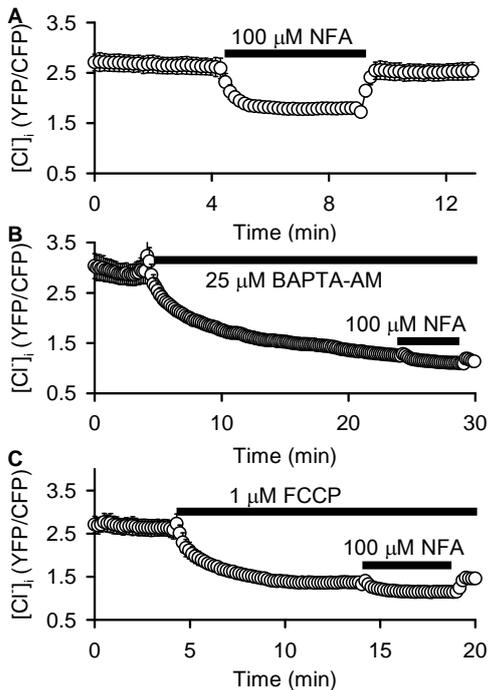


図1. 細胞内Cl動態は細胞内Ca<sup>2+</sup>やミトコンドリア膜電位によって制御される。A. NFAによって、細胞内Clは増大する(YFP/CFPの減少はClの増大に相当する)。B. BAPTA-AMで細胞内Ca<sup>2+</sup>をキレートすると細胞内Clは増大し、NFAの効果は消失する。C. FCCPでミトコンドリア膜電位を脱分極すると細胞内Clは増大し、NFAの効果は消失する。mean ±SE, N=3-7

ターFACS AriaII を用いて、細胞内 Cl 濃度及びミトコンドリア膜電位を指標として細胞を分取した。細胞内 Cl 濃度の検出は、Cl 感受性色素 SPQ (5 mM) を細胞に負荷することで行った。一方、ミトコンドリア膜電位の検出は、ミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 TMRE (25 nM) を負荷して行った。図 2 に示すように、細胞内 Cl 濃度 (SPQ 蛍光強度は細胞内 Cl 濃度と反比例する) とミトコンドリア

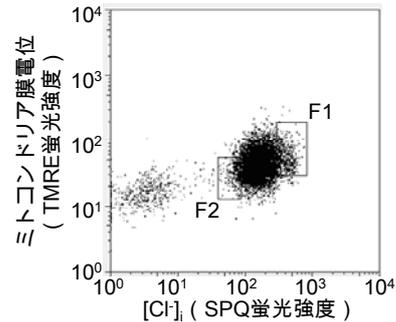


図2. 細胞内Cl濃度ならびにミトコンドリア膜電位を指標とした細胞の分取。F1 (細胞内Cl濃度が低く、ミトコンドリア膜電位が深い) ならびにF2 (細胞内Cl濃度が高く、ミトコンドリア膜電位が浅い) の2つのフラクションから細胞を分取した。

膜電位には弱い相関が認められた。そこで、F1 (細胞内 Cl 濃度が低くミトコンドリア膜電位が深い) ならびに F2 (細胞内 Cl 濃度が高くミトコンドリア膜電位が浅い) の 2 つのフラクションから細胞を分取した。

### 3. DNA マイクロアレイによる *in silico* subtraction

上記2つのフラクションから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Affymetrix 社; GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array) に供した。*in silico* subtraction の結果、発現量に 2 倍以上違いが認められる遺伝子は 564 あった。その中には、aquaporin 6 や sodium-hydrogen exchanger 9 などの Cl 輸送に間接的に関与する膜タンパクの他に、機能未知の膜タンパクも含まれていた。しかし、本 DNA アレイは F1, F2 それぞれ 1 サンプルずつを用いて予備的検討を行ったものであり、発現量が比較的小さい遺伝子については、発現量の違いが測定誤差の中に入ってしまった可能性もある。今後、サンプル数を増やし、統計解析を行うことで、候補遺伝子の絞込みを行い、Cl 輸送に関与する新規輸送体の同定につなげたい。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

1. Kim B, Takeuchi A, Hikida M, Matsuoka S. Roles of the mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, in B lymphocyte chemotaxis. (under revision)

ニズムの解明・代表・採択・100 万円

2. 科研費・挑戦的萌芽研究・2016~2017 年度・新規 Cl 輸送体同定とこれを介した B リンパ球機能制御メカニズムの解析・代表・申請・500 万円

### 「特記事項」

なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 公益財団法人 稲盛財団 研究助成・2016 年度・新規 Cl 輸送体による Cl ダイナミクスミトコンドリアと B リンパ球の機能連関の制御メカ