

ミトコンドリアによる洞房結節自動能の制御機構の解明

研究代表者： 竹田 有加里（医学系部門・助教）

共同研究者： 松岡 達（医学系部門・教授）

概 要	
	洞房結節細胞の自動能は細胞膜イオンチャネルの協調作用に起因すると考えられてきたが、我々はマウス洞房結節細胞のミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換が、筋小胞体リアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出 local Ca^{2+} release (LCR) および自動能に関与するとの知見を得た。本研究では洞房結節細胞の自動能におけるミトコンドリアの役割をさらに明らかにすることを目的とし、ミトコンドリアと LCR との関係を検討した。その結果、細胞収縮にともなってミトコンドリアが脱分極すること、膜電位の深いミトコンドリアが集積する部位で LCR の発生頻度が高いこと、高グルコース刺激で LCR 振幅の増加や不規則な収縮パターンを惹起することが観察された。これらの結果から、ミトコンドリアの代謝が洞房結節自動能制御に関与すると考えられた。
関連キーワード	洞房結節、自動能調節、ミトコンドリア、local Ca^{2+} release

研究の背景および目的

ほ乳類心臓の拍動は、洞房結節の心筋細胞（洞房結節細胞）が自発的に活動電位を発生することで生じる。従来、洞房結節細胞の自動能は、細胞膜イオンチャネルの協調作用に起因すると考えられてきたが、筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体 (RyR) からの自発的かつ局所的な Ca^{2+} 放出 “local Ca^{2+} release (LCR)” によって細胞膜 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (NCX) を活性化することが自動能制御に関与するという説が提唱されている (Bogdanov, et al., Circ. Res., 2001)。

申請者は、平成 29 年度「ライフサイクル医学」推進学部長裁量経費により購入した ORCA-Flash4.0 V3 (Hamamatsu Photonics) を用いて、高速・高解像での単離マウス洞房結節細胞の Ca^{2+} イメージングを行い、LCR の記録に成功した。その結果、1) すべての洞房結節細胞において LCR が観察されること、2) Ca^{2+} トランジェントから LCR 発生までの時間 (LCR period) と Ca^{2+} トランジェントの周期長 (CL) には、正の相関が認められること、3) β 受容体刺激では、LCR および

Ca^{2+} トランジェントの振幅が増加し、LCR period が短縮すると共に CL は短縮することを見いだした (論文準備中)。これらのことから、マウス洞房結節細胞の自動能に LCR が関与すると考えられた。さらに、ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (NCXm) を薬理的に抑制すると、LCR の発生頻度および拍動頻度が減少することを見いだした。NCXm の抑制は LCR および Ca^{2+} トランジェントの振幅も減少させたことから、SR の Ca^{2+} が減少していると考えられた。つまり、NCXm を介するミトコンドリアの Ca^{2+} 放出とそれに続く SR の Ca^{2+} 取り込みによって SR の Ca^{2+} 量を維持することが洞房結節の自動能発生に重要であると考えられた。

Ca^{2+} がミトコンドリアの代謝を活性化することを考慮すれば、ミトコンドリアの Ca^{2+} 動態もしくはミトコンドリア代謝が洞房結節細胞の自動能を調節していることが示唆される。本研究では、これまでの研究を発展させて、洞房結節細胞の自動能におけるミトコンドリアの役割をさらに明らかにすることを目的とする。

研究の内容および成果

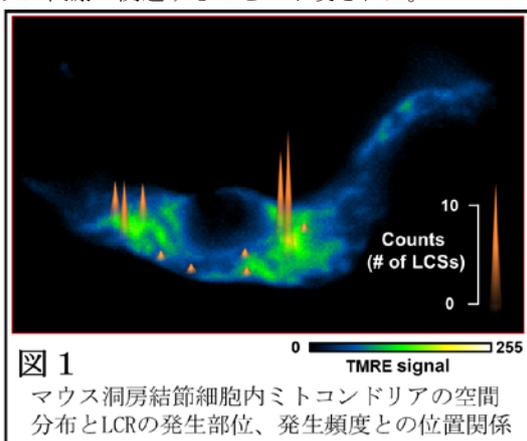
マウス心臓の洞房結節から酵素処理によって洞房結節細胞を単離した。

まず、ミトコンドリア膜電位と自動能との関係を調べるため、ミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 TMRE をマウス洞房結節細胞に負荷し、ORCA-Flash4.0 V3 を装備した蛍光顕微鏡 (Eclipse Ti, Nikon) を用いて蛍光シグナルを 30 ms 毎に記録した。その結果、細胞収縮にともなっ

て TMRE 蛍光が減少すること、つまりミトコンドリアが脱分極することが観察された。このことから、収縮時におけるミトコンドリアユニポーター MCU を介した Ca^{2+} 取り込みと、NCXm を介する Ca^{2+} 放出によってミトコンドリア膜電位が脱分極する可能性が考えられた。

次に、マウス洞房結節細胞内のミトコンドリアの空間分布と LCR の発生部位との位置関係を検討

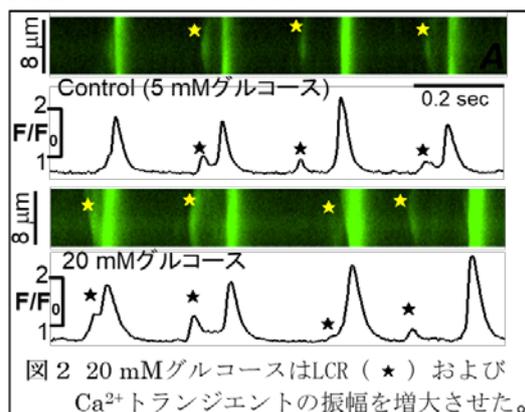
するため、TMRE および Ca^{2+} 指示薬 Calbryte™ 520 AM の同時負荷を行い、蛍光シグナルを 2.5 ms 毎に記録した。その結果、LCR は細胞内でランダムに発生しているのではなく、膜電位の深いミトコンドリアが集積する部位において、LCR の発生頻度が高いことが明らかとなった (図 1)。ミトコンドリアの膜電位はミトコンドリア代謝と深く関係していることから、LCR の発生にはミトコンドリア代謝が関連することが示唆された。



さらに、ミトコンドリア代謝と洞房結節細胞の自動能との関係を検討するために、マウス洞房結節細胞に高濃度 (20 mM) のグルコースを細胞外液に投与した。高グルコースによって解糖系が亢進し、ピルビン酸が増加することでミトコンドリア代謝も亢進すると考えられる。高グルコースを投与した一部の細胞では、一時的に収縮頻度が上昇し、さらに不規則な収縮パターンが惹起された。

また、Calbryte™ 520 AM を負荷した細胞において同様の実験を行ったところ、LCR および Ca^{2+} トランジェントの振幅増加が観察された (図 2)。

これらの結果は、高グルコースによってミトコンドリア代謝が活性化し、ミトコンドリア膜電位が深くなることでミトコンドリアから筋小胞体への Ca^{2+} フラックスが増加し、筋小胞体 Ca^{2+} 含量が増加したことに起因すると考えられる。筋小胞体 Ca^{2+} 含量の増加は、LCR の発生頻度を増加し、収縮頻度を増加させると推測された。



今後は、ミトコンドリア代謝による LCR および Ca^{2+} トランジェント制御機構の詳細を検討するため、ミトコンドリア代謝 (ATP 合成酵素、電子伝達系など) の阻害や、ミトコンドリア代謝基質 (ピルビン酸、アスパラギン酸、脂肪酸など) 濃度を变化したときの LCR の発生頻度及び自動能への影響についての解析を進めていく。

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

「主な成果発表」

- 1) **Takeda Y.**, Takeuchi A., and Matsuoka S. The mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchanger is involved in automaticity of murine sinoatrial nodal cells. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS) & the 96st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Mar, 2019.
- 2) **竹田有加里**, 竹内綾子, 松岡達. 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 交換の寄与. 第 65 回中部日本生理学会大会. 2018 年 11 月
- 3) **竹田有加里**, 竹内綾子, 松岡達. 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. 生理学研究所研究会 2018 「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」 2018 年 11 月

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 文部科学省科学研究費・基盤研究 (C) ・ 2019-2021 年度・糖尿病高血糖による洞房結節細胞 Ca 制御異常の解明・代表 (採択)
- 2) 文部科学省科学研究費・基盤研究 (B) ・ 2019-2021 年度・代謝イメージングによる心筋細胞における代謝-興奮-収縮連関の分子機構の解明・分担 (採択)