

グラントNo.: L S I 2 0 1 0 3

ライフサイエンスイノベーションセンター
「令和2年度重点プロジェクト研究および学内共同研究等研究費助成」

脳ミトコンドリアにおける新規 Na⁺-Ca²⁺交換輸送体の同定

研究代表者: 竹内 綾子 (医学系部門・准教授)

概要	
ミトコンドリア Ca ²⁺ は、エネルギー代謝、細胞質 Ca ²⁺ シグナル伝達、細胞死など多様な細胞機能を調節する。近年、ミトコンドリア Ca ²⁺ 動態を規定する分子群の同定が進んできたが、その全容は未だ明らかでない。竹内は、未同定の Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送体が脳ミトコンドリアで機能するという研究シーズを得た。ミトコンドリアからの Ca ²⁺ 排出・流入に相当する順方向・逆方向 Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送活性について、その生物物理学的特性を解析したところ、輸送活性が K ⁺ 依存性であること、既存の輸送体阻害剤に非感受性の成分が存在することを見出した。また、この未同定輸送体の責任分子の候補として、K ⁺ 依存性 Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送体ファミリーの一員である NCKX3 および NCKX5 がミトコンドリアに発現することを発見した。	
関連キーワード	脳、ミトコンドリア、Ca ²⁺ 、Na ⁺ 、輸送体

研究の背景および目的

ミトコンドリア Ca²⁺動態は、種々の細胞機能を制御する。特に、神経活動に伴い細胞質 Ca²⁺濃度が頻繁に増減する神経細胞では、細胞質 Ca²⁺の緩衝や神経活動に必要な ATP 供給を制御するために、ミトコンドリア Ca²⁺動態は極めて重要な役割を果たす。これまでに、ミトコンドリアへの Ca²⁺流入にはミトコンドリア Ca²⁺ユニポータ (MCU) が、ミトコンドリアからの Ca²⁺排出には Na⁺-Ca²⁺交換輸送体 (NCLX; SLC8B1) および H⁺-Ca²⁺交換輸送体 (Letm1) が主に関与することが知られている。しかし、これらの分子以外にも、細胞膜 Na⁺-Ca²⁺交換輸送体 NCX1-3 や小胞体 Ca²⁺チャネル RyR のミトコンドリアでの発現が報告されるなど、ミトコンドリア Ca²⁺動態を規定する分子群の全容は未だ明らかでない。

竹内は、マウス心臓および脳からのミトコンドリア Ca²⁺排出が、ミトコンドリア外 Na⁺に強く依存し、この順方向の Na⁺-Ca²⁺交換輸送を NCLX が主に担うことを明らかにした (Takeuchi et al., *Sci Rep*, 2013; Takeuchi et al., *J Physiol Sci*, 2015; Islam et al., *J Physiol Sci*, 2020)。一方、ミトコンドリア Ca²⁺過負荷の原因となる逆方向の Na⁺-Ca²⁺交換輸送活性が、脳では心臓に比べてはるかに高いという研究シーズを得た。すなわち、脳のミトコンドリア特異的にはたらく未同定の Na⁺-Ca²⁺交換輸送体の存在が強く示唆される。

本研究では、マウスの脳ミトコンドリアで機能する未同定の Na⁺-Ca²⁺交換輸送体を明らかにし、その生理的・病態生理的意義を解明することを目的とする。

研究の内容および成果

1. マウス脳単離ミトコンドリアにおける Ca²⁺動態制御分子の生物物理学的特性

(1) 順方向 Na⁺-Ca²⁺交換活性

分画遠心法により単離したマウス脳ミトコンドリアを用い、ミトコンドリア外 Ca²⁺を蛍光色素 Calcium Green 5N で測定した。代謝基質 (ピルビン酸、リンゴ酸) 存在下ではミトコンドリア膜電位が深く保持され、ミトコンドリア外に 50 μM Ca²⁺を添加するとミトコンドリア外 Ca²⁺は速やかに減少した。この Ca²⁺減少は MCU 阻害剤 Ru360 (5 μM) 存在下で完全に抑制されたことから、MCU がミトコンドリアへの Ca²⁺流入を担うことが示された。Ca²⁺をミトコンドリアに負荷した後、5 μM Ru360

を添加すると、ミトコンドリア外 Ca²⁺は増大した。10 mM Na⁺存在下における Ca²⁺増大速度は Na⁺非存在下の約 7 倍であり、脳ミトコンドリアでは H⁺-Ca²⁺交換ではなく順方向の Na⁺-Ca²⁺交換が主として Ca²⁺排出を担うことが明らかとなった。ミトコンドリアに予め Na⁺を負荷した条件では、Na⁺依存性 Ca²⁺排出速度は細胞膜 NCX 阻害剤 (30 μM SN-6, 1 μM SEA0400) の影響を受けず、NCLX 阻害剤 (20 μM CGP-37157) で完全に抑制された (図 1A)。一方、ミトコンドリアに Na⁺を負荷しない条件では、Na⁺依存性 Ca²⁺排出速度は細胞膜 NCX 阻害剤 (30 μM SN-6, 1 μM SEA0400) の影響を受けず、NCLX 阻害剤 (20 μM CGP-37157) で著しく抑制されたも

の、30%残存成分が存在した（図 1B）。

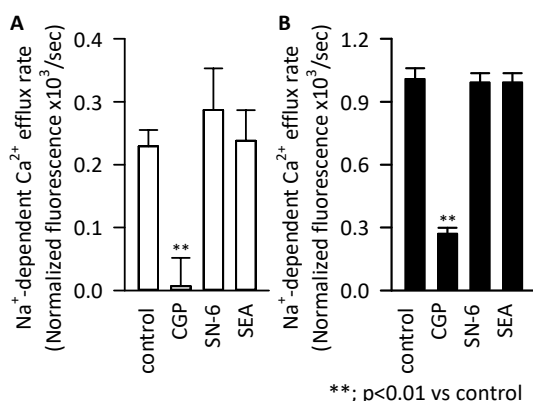


図1. マウス脳ミトコンドリアにおけるNa⁺依存性Ca²⁺排出活性。 A. ミトコンドリアNa⁺負荷条件。 B. ミトコンドリアNa⁺非負荷条件。 CGP; 20 μM CGP-37157, SN-6; 30 μM SN-6, SEA; 1 μM SEA0400。
**; p<0.01 vs control

これらの結果から、NCX、NCLX 以外の未同定の Na⁺-Ca²⁺交換輸送体が存在し、これがミトコンドリア内 Na⁺濃度が低い場合にのみ順方向で機能することが示唆された。さらに、Na⁺依存性 Ca²⁺排出速度が K⁺除去により著しく減少したことから、K⁺が allosteric あるいは輸送イオンとしてミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換に関与することが示唆された。

(2) 逆方向 Na⁺-Ca²⁺交換活性

分画遠心法により単離したマウス脳ミトコンドリアを用い、ミトコンドリア内 Ca²⁺を蛍光色素 Fluo-8 で測定した。10 μM antimycin A および 2 μM oligomycin 添加によりミトコンドリア膜電位を脱分極させ、10 μM ruthenium red 添加により既存のミトコンドリアへの Ca²⁺流入経路を阻害した条件で、ミトコンドリア外に 20 μM Ca²⁺を添加した。すると、予めミトコンドリアに Na⁺を負荷した条件では、ミトコンドリア内 Ca²⁺は速やかに増大した。すなわち、逆方向 Na⁺-Ca²⁺交換活性を認めた。この速度は心臓ミトコンドリア (Islam et al., *J Physiol Sci*, 2020) に比べて著しく高く、心臓では NCLX 阻害剤 (20 μM CGP-37157) で完全に抑制されたのに対し、脳では NCX、NCLX いずれの阻害剤も影響しなかった。ミトコンドリアへの Ca²⁺流入に寄与するミトコンドリア膜遷移孔 (mPTP) の阻害剤 (5

μM cyclosporin A) の影響を調べたが、逆方向 Na⁺-Ca²⁺交換活性は変化しなかったため、mPTP の寄与はないと考えられる。

2. マウス脳単離ミトコンドリアにおける未同定 Na⁺-Ca²⁺動態制御分子の探索

未同定ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換輸送体の候補分子として、細胞膜において K⁺依存的に Na⁺-Ca²⁺交換輸送を担う NCKX ファミリーを想定した。細胞内 K⁺濃度は 140 mM 程度と高いため、NCKX がミトコンドリアに発現した場合、Ca²⁺をミトコンドリアに流入するのに有利にはたらくと考えられる。細胞膜に発現する NCKX の混入を防ぐため、ミトコンドリア外膜 TOM22 に対する抗体を利用した磁気ビーズ法により、純度の高いミトコンドリアを得て、Western blot 解析に供した。その結果、NCKX3 および NCKX5 が脳ミトコンドリアに発現することが明らかとなった（図 2）。

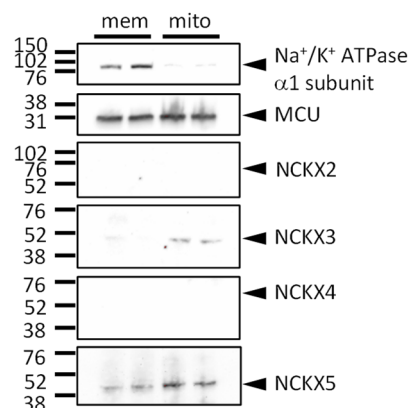


図2. マウス脳ミトコンドリアにおけるK⁺依存性 Na⁺-Ca²⁺交換輸送体 (NCKX) ファミリーの発現。 mem; crude membrane, mito; mitochondria.

今後、NCKX3、NCKX5 を中心にミトコンドリアにおける生理機能特性を解析し、ミトコンドリア Ca²⁺の過負荷やそれに伴う神経細胞死におけるこれらの輸送体の寄与を明らかにしたい。将来的には、ミトコンドリア Ca²⁺過負荷の関与が示唆されるアルツハイマー病などの神経疾患の新たな治療法開発につながると期待される。

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. Takeuchi A, Matsuoka S. Minor contribution of NCX to Na⁺-Ca²⁺ exchange activity in brain mitochondria. *Cell Calcium*, 96:102386, 2021.
2. Takeuchi A, Matsuoka S. Contributions of NCLX and NCX to mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange in mouse brain. 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 98 回日本生理学会大会 合同大会、2021 年 3 月 28 日～30 日、名古屋 (オンライン)

「特記事項」

本助成の申請への足掛かりとなった論文「Islam MM, Takeuchi A, Matsuoka S. Membrane current evoked by mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange in mouse heart. *J Physiol Sci*, 2020」が第 11 回入澤宏・彩記念 JPS 心臓・循環論文賞を受賞した。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科研費・基礎研究 (B) 2021-2023 年度・「ミトコンドリア Ca²⁺動態を起点とした神経細胞機能制御の分子機序解明」・代表・申請中