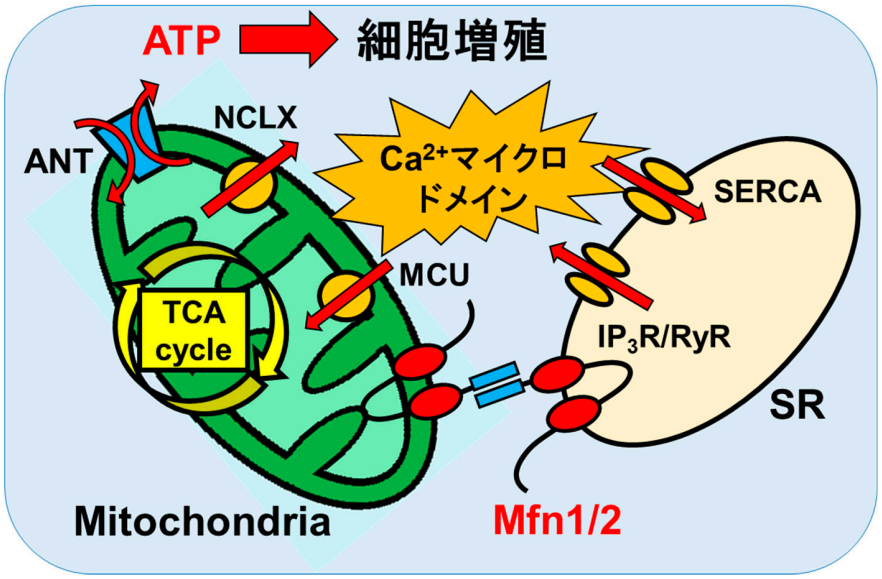
| 141　オルガネラ$Ca^{2+}$ネットワークの平滑筋増殖への関与 | 鈴木　良明 |
|---|---|

**【目的】**平滑筋増殖は様々な疾患の形成に重要であるが、その機構に関して未だ不明な点が多い。そこで我々は、この機構にオルガネラ間の$Ca^{2+}$シグナルの機能的ネットワーク（$Ca^{2+}$ネットワーク）が関与すると仮定した。本研究では、ミトコンドリアと筋小胞体（SR）の物理的連結に重要とされる mitofusin2（Mfn2）に着目し、Mfn2 の$Ca^{2+}$ネットワークおよび平滑筋増殖に対する役割を検証した。

**【方法】**ラット大動脈平滑筋細胞に対して、siMfn2 を導入し Mfn2 をノックダウンさせた。細胞質内・ミトコンドリア内・SR 内の$Ca^{2+}$濃度変化やミトコンドリア膜電位、ATP 濃度を共焦点レーザー顕微鏡により可視化解析した。また、平滑筋細胞増殖の測定にはイメージアナライザーを使用した。

**【結果】**Mfn2 をノックダウンした平滑筋細胞において、ミトコンドリアの断片化およびミトコンドリア-SR 間相互作用の減弱が観察された。さらに、アゴニスト刺激後の細胞質内$Ca^{2+}$濃度上昇の減衰速度が低下し、ミトコンドリアへの$Ca^{2+}$取り込みも減少した。また、Mfn2 のノックダウンにより、ミトコンドリア膜電位が減少し、ATP 濃度も低下した。細胞数を計測したところ、Mfn2 をノックダウンした細胞で増殖速度が低下した。以上より、Mfn2 は$Ca^{2+}$ネットワークの構築と ATP 産生を介して血管平滑筋細胞増殖に関与し、循環器疾患発症メカニズムの一端を担う可能性がある。

$Ca^{2+}$ネットワークによる平滑筋細胞増殖促進メカニズム



# 141. オルガネラ $Ca^{2+}$ネットワークの平滑筋増殖への関与

鈴木　良明

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

Key words：平滑筋，オルガネラ，$Ca^{2+}$イメージング，イオンチャネル，マイクロドメイン

## 緒　言

$Ca^{2+}$は種々のシグナル分子に作用して、筋収縮や神経伝達、細胞増殖など様々な生体現象を引き起こす。それ故、$Ca^{2+}$供給源である $Ca^{2+}$チャネルとシグナル経路の下流分子が近接化して $Ca^{2+}$マイクロドメインを形成することで、特定のシグナル経路のみが活性化される。我々はこれまでに、細胞膜上のカベオラ構造が電位依存性 $Ca^{2+}$チャネル（VDCC）と大コンダクタンス $Ca^{2+}$活性化 $K^+$（BK）チャネル、及び筋小胞体（SR）膜のリアノジン受容体（RyR）を近接化させて $Ca^{2+}$マイクロドメインを形成することを明らかにした［1］。さらにミトコンドリアが VDCC や RyR と近接し細胞質 $Ca^{2+}$濃度（$[Ca^{2+}]_{cyt}$）上昇を緩衝する役割があることも明らかにしてきた［2］。

一方で、平滑筋細胞の増殖は慢性閉塞性肺疾患や喘息、動脈硬化など様々な疾患の形成に重要であるが、その機構に関して未だ不明な点が多い。特に、細胞増殖時の持続的な $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇に対して、$Ca^{2+}$マイクロドメインがどのように関与するかは不明である。我々は、細胞膜だけでなく、ミトコンドリアや SR、核などの複数のオルガネラの $Ca^{2+}$マイクロドメインが $Ca^{2+}$シグナルの機能的ネットワーク（$Ca^{2+}$ネットワーク）を構築することで、代謝や転写因子の活性化、細胞周期の回転等を起こすと仮定した。本研究では、ミトコンドリアと SR の物理的連結に重要とされる mitofusin2（Mfn2）に着目し、各種 $Ca^{2+}$蛍光指示薬を用いて Mfn2 の $Ca^{2+}$ネットワークおよび平滑筋増殖に対する役割を検証した。

ラット大動脈平滑筋細胞に対して、siMfn2 を導入し Mfn2 をノックダウンした結果、ミトコンドリアの断片化およびミトコンドリア-SR 間の相互作用の減少が観察された。さらに、Mfn2 のノックダウンにより、バソプレシン刺激時の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇の減衰速度の低下とミトコンドリアへの $Ca^{2+}$取り込み量の減少が生じた。また、Mfn2 をノックダウンした平滑筋細胞において電位勾配（$\Delta\Psi m$）が減少し、ATP 濃度も低下していた。細胞増殖速度を測定したところ、Mfn2 ノックダウン群において有意に低下していた。以上より、Mfn2 は $Ca^{2+}$ネットワークの構築と ATP 産生を介して血管平滑筋細胞増殖に関与し、循環器疾患発症メカニズムの一端を担う可能性がある［3］。

## 方　法

### 1. 細胞

ラット大動脈平滑筋細胞株 A10 を 10%熱不活性化ウシ胎児血清（FBS）と抗生物質（ペニシリンとストレプトマイシン）を含む DMEM 培地にて培養した。また、6～9 週齢の雄性ラットより大動脈平滑筋細胞を単離し DMEM 培地にて培養した。細胞を増殖させて P3～10 の細胞を実験に使用した。siMfn2（20 nM）は RNAiMAX を用いて導入し、48～72 時間後に実験を行った。

### 2. $Ca^{2+}$濃度測定

細胞質内の $Ca^{2+}$濃度変化（$[Ca^{2+}]_{cyt}$）の測定には、fluo4-AM を用いた。ミトコンドリアの $Ca^{2+}$濃度（$[Ca^{2+}]_{mito}$）変化の測定には rhod-2 を用いた［2］。これらの色素は室温にて 20 分間負荷させた。SR 内の $Ca^{2+}$濃度（$[Ca^{2+}]_{SR}$）変化には R-CEPIA1er［4］を用いた。R-CEPIA1er の遺伝子導入には Lipofectamine2000 を用い、24～72 時間後に実験を行った。蛍光シグナルの測定には共焦点レーザー顕微鏡（Nikon A1R）を用いて観察した。

### 3. 膜電位測定

ミトコンドリアの膜電位測定にはtetramethylrhodamine ethyl ester（TMRE）を用いた。A10 に対して TMRE を室温にて 20 分間負荷させた［2］。

### 4. ATP 測定

A10 に対して FRET 型 ATP プローブである mitATeam［5］の遺伝子を Lipofectamine2000 にて導入し、24～72 時間後にミトコンドリア内の ATP 濃度を定量した。

### 5. 細胞増殖測定

ハイコンテンツイメージアナライザー（Operetta）を使用して、hoechst にて核染色した細胞の数を測定した。96 ウェルプレートに細胞を 1 ウェル当たり 1500 個播種し、3 日間の細胞数を計測した。

## 結果および考察

### 1. Mfn2 のミトコンドリアーSR 連関への寄与

A10 細胞の Mfn2 を siRNA によってノックダウンし、ミトコンドリアと SR の形態をそれぞれ Mito tracker と ER tracker により染色して可視化解析した（図 1）。その結果、siMfn2 群において、ミトコンドリアの断片化とミトコンドリア-SR 間の相関係数の減少が認められた。これまで、Mfn2 がミトコンドリア-ER 間の距離を近づけるという報告［6, 7］と、逆に遠ざける［8］という相反する 2 つの報告がある。これらの違いは細胞種や解析方法の違い、Mfn2 発現制御法の違いを反映している可能性がある。ここで得られた結果が不死化された細胞株（A10）に特異的な現象であるという可能性を排除するため、ラットから大動脈平滑筋細胞を単離して培養したのち、同様の実験を行った。その結果、Mfn2 のノックダウンによるミトコンドリアの断片化とミトコンドリア-SR 間相互作用の減弱という同様の結果が得られた。これらの結果により、Mfn2 は血管平滑筋細胞のミトコンドリアの融合およびミトコンドリアと SR 間の連結に寄与することが明らかになった。

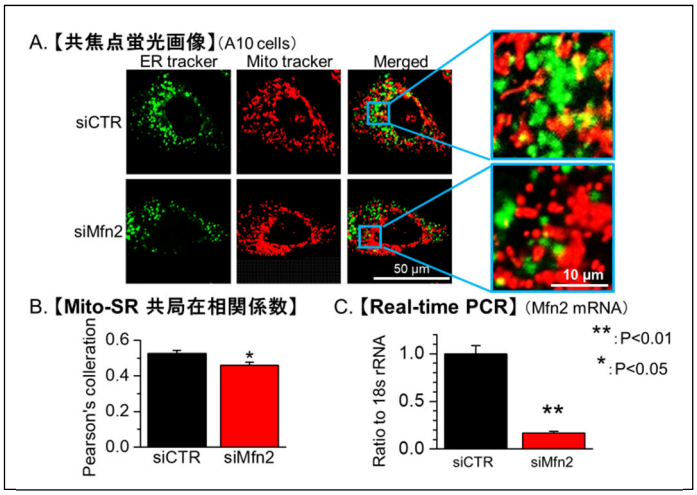



図 1. Mfn2 のミトコンドリアーSR 連関への寄与

A）siMfn2 処置群（siMfn2）および siControl 処置群（siCTR）の、SR とミトコンドリアの形態・局在を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した。SR とミトコンドリアはそれぞれ ER tracker（緑）と Mito tracker（赤）で染色した。B）ミトコンドリアと SR の共局在率を Pearson の相関係数で評価した（siCTR:n = 20、siMfn2:n = 15、p = 0.0109、t 検定）。C）siMfn2 によるノックダウン効率をリアルタイム PCR で検証した（n = 6、p = 0.0006、t 検定）。

### 2. アゴニスト刺激誘発性の細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇に対する Mfn2 の寄与

次に A10 細胞を 100 nM のバソプレシンで刺激した際の、各オルガネラの $Ca^{2+}$動態を可視化解析した。バソプレシンは $IP_3$受容体を介して SR からの $Ca^{2+}$遊離を起こす。まず fluo4-AM によって $[Ca^{2+}]_{cyt}$を測定したところ、siCTR

と siMfn2 間で［$Ca^{2+}$］$_{cyt}$ 上昇のピーク値に有意な差はなかったが、siMfn2 群において［$Ca^{2+}$］$_{cyt}$ 濃度がピーク値の半分になるまでの時間が有意に延長した。

さらに［$Ca^{2+}$］$_{SR}$ を測定するため、R-CEPIA1er 遺伝子を導入した。バソプレシン刺激により SR から $Ca^{2+}$が遊離し、［$Ca^{2+}$］$_{SR}$ の低下が観測された。siCTR および siMfn2 群で［$Ca^{2+}$］$_{SR}$ 減少量を比較したところ、両者に有意な差はなかった（図 2A）。この結果は、両群で SR 内の $Ca^{2+}$貯蔵量に有意な差がないことを示唆している。

ミトコンドリアへの $Ca^{2+}$取り込みを観測するために、ミトコンドリア局在型の $Ca^{2+}$蛍光指示薬 rhod-2 を A10 に負荷した。100 nM バソプレシン刺激後の［$Ca^{2+}$］$_{mito}$ 上昇を解析した結果、Mfn2 ノックダウンによって［$Ca^{2+}$］$_{mito}$ 上昇のピーク値は有意に低下した。またピークに達する時間も有意に延長した（図 2B）。これらの結果は Mfn2 がミトコンドリアと SR を近接化せて、SR から細胞質へ遊離された $Ca^{2+}$のミトコンドリアへの取り込みを効率化して正に制御することを示唆している。

ミトコンドリアへの $Ca^{2+}$取り込みはミトコンドリア内膜に発現する $Ca^{2+}$ユニポーター（MCU）であると考えられている。MCU の $Ca^{2+}$親和性は低く、活性化には 3～10 μM の［$Ca^{2+}$］$_{cyt}$ が必要である。通常アゴニスト刺激で起こる［$Ca^{2+}$］$_{cyt}$ 上昇は 1 μM 程度であり、MCU は活性化しない。しかし、Mfn2 がミトコンドリアを SR と近接化させることで、MCU は SR 膜上の $Ca^{2+}$遊離チャネル（$IP_3R$ や RyR）の近傍に局在することが可能となる。$IP_3R$ や RyR から $Ca^{2+}$が遊離した際には、局所的な［$Ca^{2+}$］$_{cyt}$ 上昇は数～10 μM に達するので、Mfn2 を介して SR と近接化した MCU はミトコンドリア内へ効率的に $Ca^{2+}$を取り込むことができると考えられる。

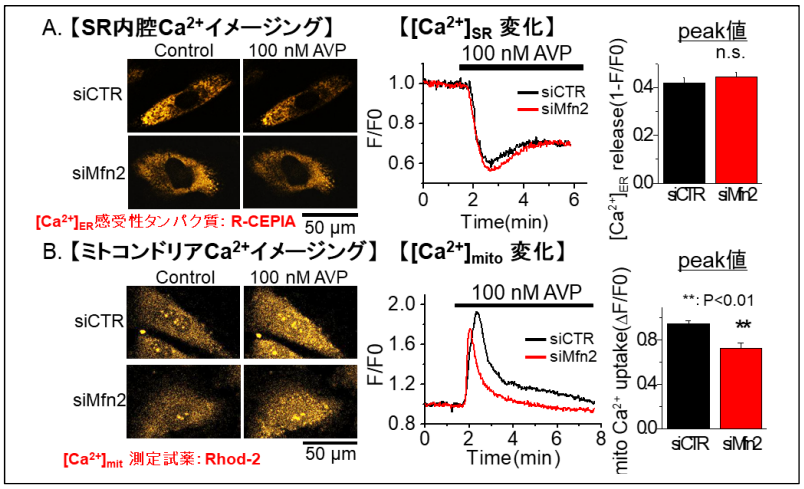



図 2. アゴニスト刺激誘発性の細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇に対する Mfn2 の寄与

A）siMfn2 および siCTR に対して R-CEPIA1er を発現させ、100 nM バソプレシン投与時の［$Ca^{2+}$］$_{SR}$ を測定した。

B）siMfn2 および siCTR に対して rhod-2 を負荷し、100 nM バソプレシン投与時の［$Ca^{2+}$］$_{mito}$ を測定した（siCTR:n = 83、siMfn2:n = 71、p = 0.0001、t 検定）。

### 3. ミトコンドリア膜電位および ATP 産生に対する Mfn2 の寄与

ミトコンドリア機能に対する Mfn2 の寄与を解析するため、ミトコンドリア膜電位および ATP 濃度について調べた。ミトコンドリアは TCA 回路により ATP の生合成を行う。TCA 回路を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼは、$Ca^{2+}$依存的に活性化することが知られている。この過程でプロトン勾配（ミトコンドリア膜電位）が形成され、酸化的リン酸化により ATP が産生される。

まず、A10 に TMRE を負荷してミトコンドリア膜電位を測定した。TMRE は正電荷を帯びており、分極したミトコンドリアに集積されて蛍光を発する。ミトコンドリア脱共役剤である 2,4-ジニトロフェノール（dNP）により膜電位を消失させた際の蛍光強度差分（ΔΦm）を比較したところ、siMfn2 群でΔΦm が有意に減少していた（図 3）。

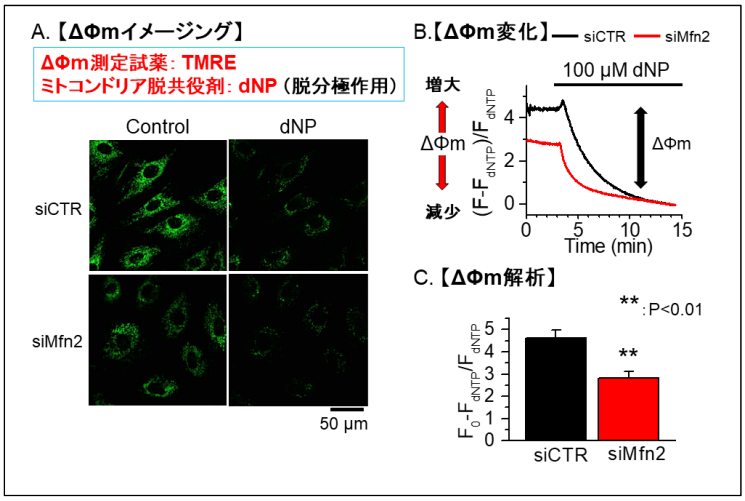



図 3. ミトコンドリア膜電位に対する Mfn2 の寄与

A）siMfn2 および siCTR に対して TMRE を負荷し、dNP により膜電位を消失させた際の蛍光強度の変化を観察した。

B）TMRE の蛍光強度の経時変化を示した。

C）siMfn2 および siCTR 間のΔΦm を比較した（siCTR:n = 43、siMfn2:n = 36、$p < 0.0001$、t 検定）。

次にミトコンドリア内の ATP 濃度を測定するため、FRET 型 ATP プローブ（mitATeam）を A10 細胞に導入した。定常状態と dNP で ATP 産生を停止させた際の蛍光強度比の差分をとることで、定常状態の ATP 濃度を比較した（図 4）。その結果、Mfn2 ノックダウンにより、ATP レベルは有意に減少した。以上より、Mfn2 はミトコンドリア内の $Ca^{2+}$濃度、膜電位を制御し、ATP 産生量を規定する重要な分子であることが明らかになった。ミトコンドリアで合成された ATP はミトコンドリア内膜上の Adenine nucleotide translocase（ANT）を介して細胞質へ放出される。この ATP は、細胞膜上の $Ca^{2+}$ポンプ（PMCA）や SR 膜上の $Ca^{2+}$ポンプ（SERCA）を活性化させ、$[Ca^{2+}]_{cyt}$ を基底状態まで低下させるために重要である。また、ATP が平滑筋細胞細胞増殖に関与るするか調べるため、以下図 4 に示すように細胞増殖についても検証した。

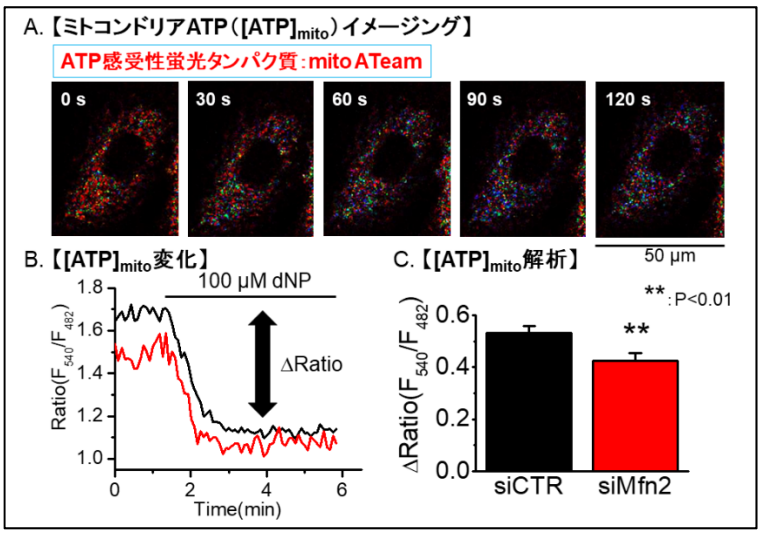



図 4. ミトコンドリア ATP 産生に対する Mfn2 の寄与

A）FRET 型 ATP プローブ mitATeam を用いてミトコンドリア内の ATP 量を可視化解析した。dNP によりミトコンドリア膜電位を消失させ ATP の生合成を停止させた際の蛍光画像を示した。B）siMfn2 および siCTR における mitATeam のシグナル変化を示した。C）siMfn2 および siCTR 間の mitATeam のシグナルの減少率を比較した（siCTR:n = 54、siMfn2:n = 55、$p = 0.0076$、t 検定）。

**4. 平滑筋細胞増殖に対する Mfn2 の寄与**

最後に、Mfn2 の平滑筋細胞増殖に対する影響を検証した。siControl あるいは siMfn2 を A10 に導入した後、1 ウェルあたり 1500 個の A10 細胞を 96 ウェルプレートに播種して、3 日間の細胞数を計測した。その結果、Mfn2 のノックダウンにより、細胞増殖速度が有意に低下した（図 5）。また、ラットから大動脈平滑筋細胞を単離して培養したのち、同様の実験を行った。その結果、Mfn2 のノックダウンにより 3 日目の細胞数が有意に減少していた。以上より、Mfn2 はミトコンドリアの $Ca^{2+}$シグナル、ATP 産生を介して血管平滑筋細胞増殖に関与し、循環器疾患発症メカニズムの一端を担う可能性がある。

これまでの報告から、平滑筋細胞が収縮型（分化型）から増殖型（脱分化型）にフェノタイプスイッチを起こすと、Mfn2 発現の減少とミトコンドリアの断片化が起こり、細胞増殖が促進することが知られている［9］。一方、Mfn2 の過剰発現は細胞増殖の停止とアポトーシスを引き起こす［10］。これらの報告から Mfn2 は平滑筋細胞のフェノタイプスイッチを防ぎ、細胞増殖を抑制する働きがあると考えられる。しかし、増殖型にスイッチした後の細胞増殖に対して、Mfn2 がどのような影響を及ぼすかは明らかにされていなかった。本研究の結果から、増殖型平滑筋細胞において Mfn2 を介した SR-ミトコンドリア間 $Ca^{2+}$ネットワークが、細胞内 ATP 産生の亢進により細胞増殖を促進することが判明した。つまり、Mfn2 はフェノタイプスイッチを抑制して細胞増殖を負に制御する一方で、$Ca^{2+}$ネットワークを構築することで細胞増殖を正に制御するという二面性を持つ。今後、Mfn2 がオルガネラ内 $Ca^{2+}$濃度の長期的変動や細胞増殖シグナルに対してどのような影響を与えるのか明らかにする必要がある。

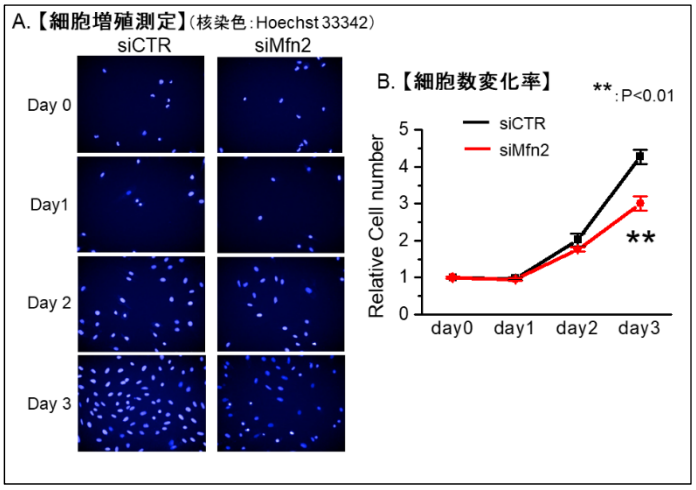



図 5. ミトコンドリア ATP 産生に対する Mfn2 の寄与

A）A10 細胞の増殖をハイコンテンツイメージングシステムで解析した。siMfn2 および siCTR の核を hoechst で染色して細胞数を 3 日間計測した。

B）siMfn2 および siCTR の細胞数の経時変化をプロットした（n = 6、p = 0.0005、t 検定）。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野の稲垣奏大学院生、川崎桂輔大学院生、山村寿男准教授（現教授）、今泉祐治教授（現名誉教授）である。

## 文　献

1） Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance $Ca^{2+}$-activated $K^+$ ($BK_{Ca}$) and Cav1.2 $Ca^{2+}$ channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes. J Biol Chem. 2013;288(51):36750-61. Epub 2013/11/10. doi: M113.511485 [pii]

10.1074/jbc.M113.511485 [doi]. PubMed PMID: 24202214; PubMed Central PMCID: PMC3868784.

2) Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local $Ca^{2+}$ coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2018;314(1):C88-c98. Epub 2017/10/20. doi: 10.1152/ajpcell.00208.2017. PubMed PMID: 29046294.

3) Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. Physiological roles of mitochondria and mitofusins on $Ca^{2+}$ signaling in smooth muscles. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2017;149(6):260-3. Epub 2017/06/20. doi: 10.1254/fpj.149.260 [doi]. PubMed PMID: 28626117.

4) Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M. Imaging intraorganellar $Ca^{2+}$ at subcellular resolution using CEPIA. Nat Commun. 2014;5:4153. Epub 2014/06/14. doi: 10.1038/ncomms5153. PubMed PMID: 24923787; PubMed Central PMCID: PMCPMC4082642.

5) Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(37):15651-6. Epub 2009/09/02. doi: 10.1073/pnas.0904764106. PubMed PMID: 19720993; PubMed Central PMCID: PMCPMC2735558.

6) de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. Nature. 2008;456(7222):605-10. Epub 2008/12/05. doi: nature07534 [pii]
10.1038/nature07534 [doi]. PubMed PMID: 19052620.

7) Chen Y, Csordas G, Jowdy C, Schneider TG, Csordas N, Wang W, et al. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle $Ca^{2+}$ crosstalk. Circ Res. 2012;111(7):863-75. Epub 2012/07/11. doi: CIRCRESAHA.112.266585 [pii]
10.1161/CIRCRESAHA.112.266585 [doi]. PubMed PMID: 22777004; PubMed Central PMCID: PMC3444672.

8) Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(17):E2174-81. Epub 2015/04/15. doi: 1504880112 [pii]
10.1073/pnas.1504880112 [doi]. PubMed PMID: 25870285; PubMed Central PMCID: PMC4418914.

9) Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. Nat Cell Biol. 2004;6(9):872-83. Epub 2004/08/24. doi: 10.1038/ncb1161 [doi]
ncb1161 [pii]. PubMed PMID: 15322553.

10) Guo X, Chen KH, Guo Y, Liao H, Tang J, Xiao RP. Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway. Circ Res. 2007;101(11):1113-22. Epub 2007/09/29. doi: CIRCRESAHA.107.157644 [pii]
10.1161/CIRCRESAHA.107.157644 [doi]. PubMed PMID: 17901359.