

奨励金No.1511

生理学と数理科学の融合によるドパミン神経細胞死の分子オーケストレーションの解明

竹内 綾子

福井大学学術研究院医学系部門医学領域 形態機能医科学講座 統合生理学分野 准教授

Decoding molecular orchestration of dopaminergic neuronal cell death by a combination of physiological experiments and computational modelling

Ayako Takeuchi,

Department of Integrative and Systems Physiology, Faculty of Medical Sciences,
University of Fukui, Associate Professor



我々は、脳で特徴的に機能する未同定のミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体が存在することを発見し、これがミトコンドリア Ca^{2+} 過負荷および神経細胞死に寄与する可能性を見出した。本研究では、生理学実験と数理モデル解析の融合により、新規ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体の生物物理学的特性を明らかにするとともに、この輸送体を中心とした分子オーケストレーションがドパミン神経細胞死をひきおこすメカニズムの全容解明を目指した。

We found a novel and unidentified Ca^{2+} influx pathway of mouse brain mitochondria, which was distinct from Ca^{2+} transport systems of cardiac mitochondria. That may contribute to mitochondrial Ca^{2+} overload or neurodegeneration under the pathological conditions. In the present study, we revealed unique biophysical properties of the novel mitochondrial Ca^{2+} transporter. In addition, we constructed a mathematical model of dopaminergic neuron which simultaneously calculates firing, cytosolic Ca^{2+} dynamics, and mitochondrial functions. The final goal of this study is to clarify the mechanisms underlying neurodegenerative disease and the contribution of this novel transporter to it.

1. 研究内容

1.1 目的

ミトコンドリア Ca^{2+} はダイナミックに変動し、エネルギー代謝、細胞内 Ca^{2+} シグナル、細胞死など種々な細胞機能を制御する。心筋と脳はいずれも興奮性組織であるが、膜興奮・ Ca^{2+} 動態の様式やエネルギー要求性などその性質が大きく異なる。研究代表者は、ミトコンドリア Ca^{2+} 動態が細胞の性質の違いに対応して最適化されるとの仮説のもと、脳で特徴的に機能する未同定のミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体の存在を発見した (Islam et al., *J Physiol Sci*, 2020; Takeuchi and Matsuoka, *Cell*

Calcium, 2021)。また、この新しいミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体が、特にミトコンドリア脱分極時などミトコンドリア機能が傷害された場合において、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を担うことを見出した。ミトコンドリア Ca^{2+} 過負荷は神経細胞死を惹き起こす。従って、この新しいミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体は、パーキンソン病など様々な神経変性疾患の発症に関与すると示唆される。本研究では、脳で特徴的に機能する新規ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体を中心とした分子オーケストレーションと、これによってドパミン神経細胞死を惹き起こすメカニズムの解明を目指し、生理学実験と数

理モデル解析を融合した以下の検討を行った。

1.2 結果

1.2.1 マウス組織から単離したミトコンドリアにおける新規ミトコンドリアCa²⁺輸送体の生物物理学的特性

マウス脳および心筋から単離したミトコンドリアにCa²⁺感受性蛍光色素Fluo-8, AMを負荷し、マルチモードプレートリーダー(EnSpire, PerkinElmer)を用いてミトコンドリア内Ca²⁺を直接測定することで、ミトコンドリアCa²⁺動態を評価した。生理的条件では、Ca²⁺はミトコンドリアの深い膜電位を利用して、Ca²⁺ユニポータMCUを介してミトコンドリア内に流入する。antimycin Aおよびoligomycinの添加によりミトコンドリアを脱分極させた条件では、脳および心筋いずれにおいてもミトコンドリアへのCa²⁺流入はほぼ消失した。しかし脳から単離したミトコンドリアでは、Na⁺イオノフォアmonensinを用いてあらかじめミトコンドリア内にNa⁺を負荷すると、Ca²⁺添加によりミトコンドリア内Ca²⁺は速やかに増大した。このNa⁺依存性Ca²⁺取り込み活性は、既存のCa²⁺輸送体の阻害剤(CGP-37157、ruthenium redなど)の影響を受けなかったが、K⁺ free条件ではほぼ消失した。一方、心筋から単離したミトコンドリアでは、Na⁺依存性Ca²⁺取り込み活性はほとんど認められなかった。以上の結果から、脳ではたらく新規ミトコンドリアCa²⁺輸送体は、Na⁺およびK⁺依存性であることが明らかとなった。現在、この性質をもとに、新規輸送体の候補分子の同定を進めている。

1.2.2 培養神経細胞から単離したミトコンドリアにおけるミトコンドリアCa²⁺輸送特性

ヒト由来ドパミン神経細胞株であるSH-SY5Yからミトコンドリアを単離し、マルチモードプレートリーダーを用いてCa²⁺動態を測定した。しかし、SH-SY5Y細胞では、マウス脳から単離したミ

トコンドリアで認められたNa⁺依存性Ca²⁺取り込み活性が認められなかった。そこで、ミトコンドリア障害のモデル細胞として汎用されるマウス海馬由来細胞株HT-22を用いて同様の検討を行ったが、Na⁺依存性Ca²⁺取り込み活性は認められなかった。今後、新規輸送体の候補分子をこれらの培養細胞に過剰発現させ、マウス脳ミトコンドリアのCa²⁺輸送特性との比較解析を進める予定である。さらに、神経細胞の過剰な発火など、ミトコンドリア機能・細胞機能の破綻を招く種々の条件における新規ミトコンドリアCa²⁺輸送体分子の役割を明らかにしていく。

1.2.3 包括的神経細胞数理モデルの構築

超解像イメージング解析により得た心筋ミトコンドリアCa²⁺輸送体群の分子局在データをもとに、ミトコンドリアを中心としたオルガネラネットワーク数理モデルを構築し、ミトコンドリアCa²⁺動態－細胞機能連関を明らかにした(Takeuchi and Matsuoka, *Int J Mol Sci*, 2022)。Osterらによる簡易神経細胞数理モデル(Oster et al., *Frontiers in Computational Neuroscience*, 2015)を研究代表者の数理モデルプラットフォーム上で再構築し、バースト状の過剰な発火やそれに伴うCa²⁺過負荷を計算した。現在、オルガネラネットワーク要素の実装を進めている。今後、神経細胞に特異的なミトコンドリアCa²⁺輸送システムが、神経細胞の過剰な興奮やCa²⁺過負荷時にどのように寄与するか、シミュレーション解析を進める。

1.3 今後の展開

本研究では、脳で特異的にはたらく新規ミトコンドリアCa²⁺輸送体の生物物理学的特性を明らかにするとともに、ミトコンドリアを中心としたオルガネラネットワーク数理モデルを構築した。今後、包括的神経細胞数理モデルを完成させ、種々の障害を模したシミュレーション解析を進めることで、神経細胞機能を傷害から保護する方法や神

経細胞機能を効率的に活性化する手法の開発、パーキンソン病の新たな治療法開発などにつながると期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

学会発表

- (1) 竹内綾子. 新規 Cl⁻ チャンネル TMC4 の味細胞活動電位における役割に関する数理モデル解析. 日本農芸化学会 2022 年度大会（京都市（オンライン）、2022 年 3 月）
- (2) 竹内綾子、松岡達. 心筋細胞におけるミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺ 交換輸送体 NCLX と筋小胞体 Ca²⁺ ポンプ SERCA の構造的連関とその生理的役割. 生理研研究会（松本市、2022 年 10 月）
- (3) Takeuchi A, Matsuoka S. Distinct characteristics of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in mouse heart and brain. 第 100 回日本生理学会大会（京都市、2023 年 3 月）