

ミトコンドリア Na 動態に関する細胞生理・システム生物学的研究

松岡 達, 竹内 綾子

福井大学医学部

概 要

1. 研究目的

ミトコンドリアー細胞質 Na^+ 動態と細胞機能との連関を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

培養 B リンパ球細胞 (A20) 及び培養心筋細胞 (HL-1) を用いて、細胞質 Na^+ (SBFI 蛍光)、ミトコンドリア Na^+ (CoroNaRed 蛍光) のタイムラプスイメージングを行った。Visual Basic によるオブジェクト指向プログラミングによりミトコンドリア数理モデルを構築した。

3. 研究結果

A20 B リンパ球細胞及び HL-1 心筋細胞において、ミトコンドリア Na^+ - HCO_3^- 共輸送体 (SLC4A7)、ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCLX) の発現を確認した。NCLX 阻害剤 CGP-37157 の添加で、細胞質 Na^+ (SBFI 蛍光) はほとんど変化しなかったが、 Na^+ - HCO_3^- 共輸送体阻害剤 S0859 の添加により、細胞質 Na^+ の増大傾向が認められた。細胞質 Na^+ に対するミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与は小さいと推測された。細胞膜 Na^+ - K^+ ポンプ阻害剤 ouabain による細胞質 Na^+ 増加は、ミトコンドリア Na^+ (CoroNaRed 蛍光) の増加を引き起こした。CGP-37157 は、ouabain によるミトコンドリア Na^+ 増加を抑制した。ミトコンドリアへの Na^+ 輸送に NCLX が関与すると考えられる。一方、S0859 添加は著しいミトコンドリア Na^+ の増加を引き起こした。 Na^+ - HCO_3^- 共輸送体がミトコンドリアに存在し、 Na^+ を細胞質へ排出することが示唆された。ミトコンドリア CO_2 産生・処理系を考慮しない条件下で、ミトコンドリアのイオン (H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , K^+) 動態を再現できるミトコンドリア数理モデルを構築した。

4. 考 察

細胞質 Na^+ に対するミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与は小さいが、ミトコンドリア Na^+ は細胞質 Na^+ 変化に伴い大きく変化すると推測される。これは、ミトコンドリアの細胞質に対する容積比が小さいことに起因すると考えられる。ミトコンドリア代謝により発生する大量の CO_2 を処理するためには、 CO_2 を細胞質へ排出しなければならない。その機序のひとつとして、 Na^+ - HCO_3^- 共輸送体、特に SLC4A7 が寄与すると考えられる。 Na^+ - HCO_3^- 共輸送体を含むミトコンドリア CO_2 代謝— Na^+ 動態の再検討が必要である。

1. 研究目的

松岡は、ミトコンドリア Ca^{2+} 動態に関する一連の研究から、ミトコンドリア Ca^{2+} 排出を担うミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換体 (NCLX) がミトコンドリア Ca^{2+} 量を制御するのみならず、ミトコンドリアから筋小胞体または小胞体 ((筋) 小胞体) への Ca^{2+} 供与体として働いて、(筋) 小胞体 Ca^{2+} 量を調節す

るという新しい役割を発見した (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Takeuchi *et al.*, 2013; Takeuchi *et al.*, 2015)。NCLX のこの機能は、心筋細胞においては自動能を制御し (Takeuchi *et al.*, 2013; Takeuchi *et al.*, 2015)、B リンパ球においては抗原受容体刺激時の細胞質 Ca^{2+} 応答に関与する (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013)。一方、NCLX の

Ca²⁺カウンターイオンである Na⁺イオンの動態については、ミトコンドリアの役割は全く明らかにされていない。本研究では、これまでのミトコンドリア研究をさらに発展させ、ミトコンドリアー細胞質 Na⁺動態と細胞機能との連関を興奮性細胞(心筋細胞)及び非興奮性細胞(リンパ球)で明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 細胞培養

培養 B リンパ球細胞(A20)及び培養心筋細胞(HL-1)を用いて実験を行った。培養は Kim *et al.* (2012) 及び Takeuchi *et al.* (2013) に従って行った。

2.2 蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡による細胞質及びミトコンドリア Na⁺動態の経時的観察

細胞質 Na⁺は、10 μ M SBFI, AM(Life Technologies)を細胞に 37°C で 1 時間負荷して蛍光強度を測定することで評価した。ミトコンドリア Na⁺は、0.5 μ M CoroNaRed (Life Technologies)を細胞に 37°C で 30 分間負荷して測定した。蛍光色素を負荷した細胞をポリリジンコートしたカバーガラスに移し、300 G で 2 分間遠心することによりカバーガラスに付着させた。

倒立蛍光顕微鏡(Eclipse Ti, ニコン)下に、30°C に加温したチャンバー上で EM-CCD カメラ(ImagEM, 浜松ホトニクス)により、30 秒毎に蛍光像を撮影してタイムラプスイメージングを行った(Kim *et al.*, 2012)。共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP II)の撮影は室温(25°C)で行った。溶液は physiological salt solution(PSS)を用いた; 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, and 5.6 mM glucose(pH 7.4 with NaOH)。色素の蛍光強度は背景輝度を減算した後に、SBFI の場合は 340 nm と 380 nm の蛍光強度比(F340/F380)を、CoroNaRed の場合は実験開始時間の輝度を 1 として標準化(F/F₀)して示す。データは平均±標準誤差で示す。

2.3 各種 Na⁺輸送体の RT-PCR による発現解析

総 RNA は、RNeasy Plus Mini kit(Qiagen GmbH)を用いて抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて逆転写した。PCR は変性(95°C, 30 秒)、アニーリング(55°C, 30 秒)、伸長反応(72°C, 30 秒)を 1 サイクルとして、40 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで分離後、エチジウムブロミド染色

により検出した。

2.4 ミトコンドリアイオン動態、エネルギー代謝を組み込んだ生物物理学的ミトコンドリアモデルの構築

Microsoft Visual Basic 2010を用いて、オブジェクト指向プログラミングにもとづき数理モデルを構築した。28 の連立微分方程式を 4 次ルンゲクッタ法により解いた。

3. 研究結果

3.1 A20 B リンパ球細胞ならびに HL-1 心筋細胞におけるミトコンドリア Na⁺輸送体の候補遺伝子の発現解析

ミトコンドリア Na⁺動態を担う輸送担体として、既に分子実体ならびに機能が明らかになっているものは、Na⁺-Ca²⁺交換輸送体(NCLX)のみである。Fig. 1 にミトコンドリアの代表的なイオン輸送体を示す。生理的条件下では、NCLXはミトコンドリア内にNa⁺を取り込み、その交換としてCa²⁺をミトコンドリア内から細胞質へ輸送すると考えられる。ミトコンドリアから Na⁺を排出する担体としては、Na⁺-H⁺交換体の存在が古くから知られるが(Gunter and Pfeiffer, 1990)、その分子実体は不明である。2011 年に、Na⁺-HCO₃⁻共輸送体(NBC)ファミリーのひとつであるSLC4A7 が、冠血管内皮細胞のミトコンドリアに局在することが報告されたが(Kumar *et al.*, 2011)、輸送の方向性などその詳細な機能は不明である。一方、ミトコンドリアへのCa²⁺流入は Ca²⁺チャネルである Ca²⁺ユニポーターが主に担う。まず、ミトコンドリアに存在する Na⁺輸送担体の候補遺伝子として、Na⁺-H⁺交換輸送体ファミリーに属する NHE

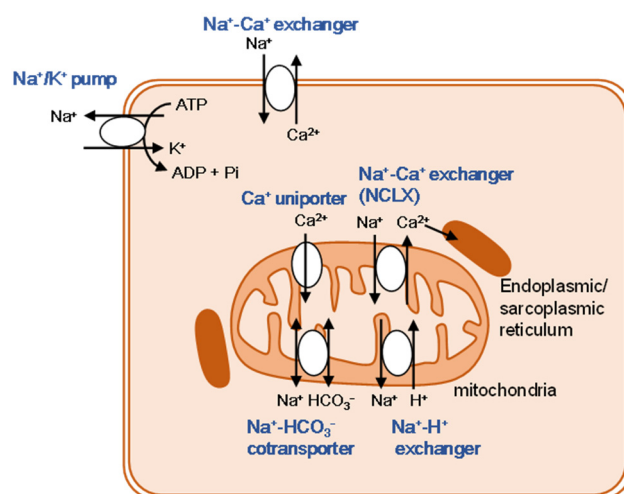


Fig. 1. A scheme of mitochondria Na transporters

ならびに $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体 (NBC) ファミリーに属する *slc4a* を選択し、A20 Bリンパ球細胞ならびに HL-1 心筋細胞における mRNA 発現を調べた。両細胞株では、NCLX ならびに Ca^{2+} ユニporter が発現していることを既に確認している。Fig. 2 に示すように、A20 Bリンパ球細胞においては、NHE1、5、6、7、8、9 と *slc4a*7、8 が、HL-1 心筋細胞においては、NHE1、5、6、7、8 と *slc4a*4、7、9、11 が発現していた。*slc4a*7 が共通して発現していたことから、ミトコンドリア $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体 (SLC4A7) が両細胞系において何らかの役割を担うと推測される。

3. 2 細胞質 Na^+ 動態におけるミトコンドリア Na^+ 輸送担体の寄与

次に、細胞質 Na^+ 動態におけるミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与について、 Na^+ 感受性蛍光色素 SBF1 を負荷した A20 Bリンパ球細胞を用いて調べた。細胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの阻害剤である 50 μM ouabain を細胞に添加すると、SBFI シグナル (F340/F380)、すなわち細胞内 Na^+ 濃度の増大が認められた (Fig. 3A)。一方、ミトコンドリア $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCLX) の阻害剤である 20 μM CGP-37157 の添加によつては、SBFI シグナルの変化はほとんど認め

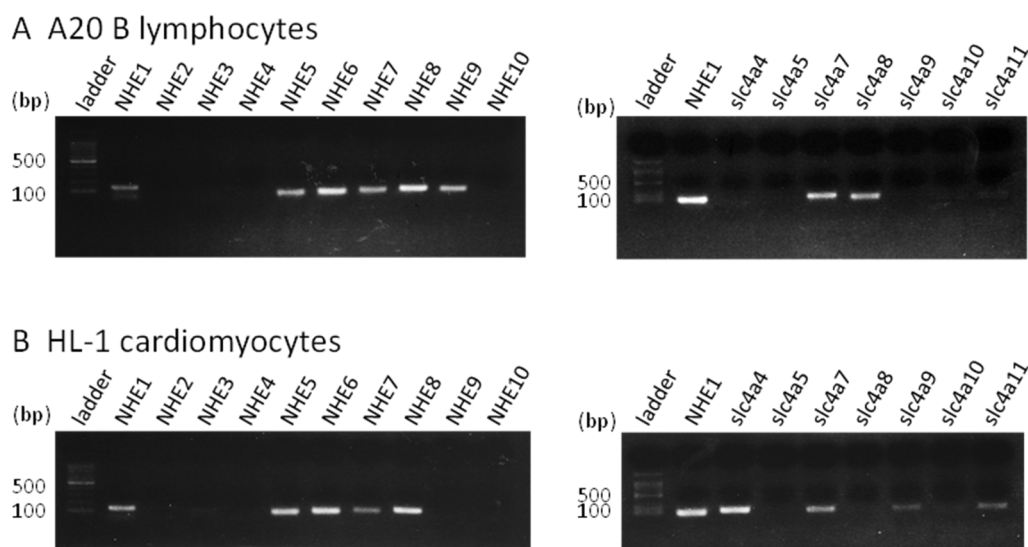


Fig. 2. Expression of NHEs and NBCs in A20 B lymphocytes (A) and HL-1 cardiomyocytes (B)

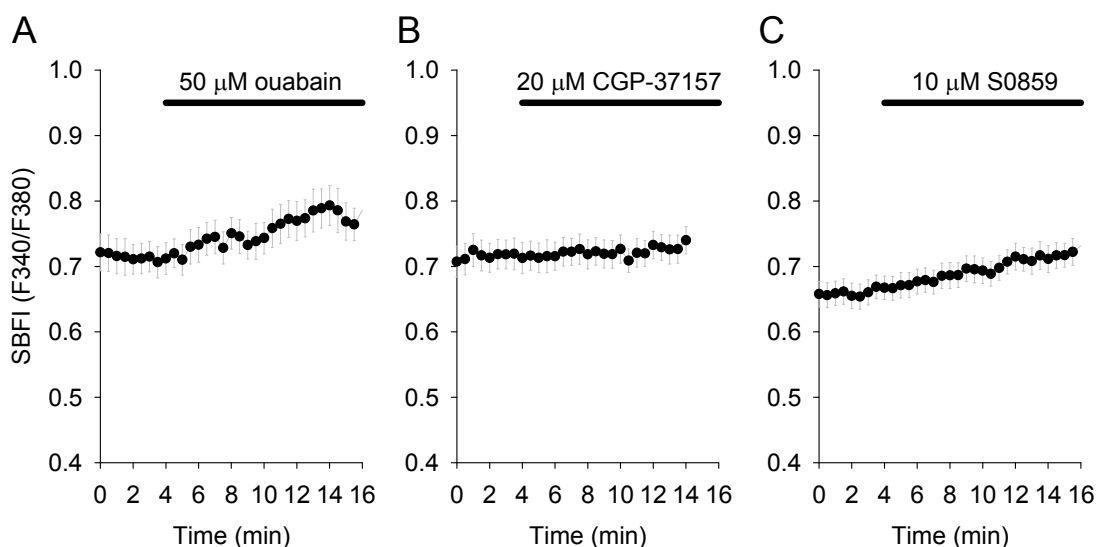


Fig. 3. Effects of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump inhibitor ouabain (A), mitochondrial $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor CGP-37157 (B), $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter inhibitor S0859 (C) on cytosolic Na^+

られなかった(**Fig. 3B**)。また、 $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体の特異的阻害剤である $10\ \mu\text{M}$ S0859 の添加によって、わずかに SBFI シグナルの増大傾向が認められた(**Fig. 3C**)。これらの結果から、細胞質 Na^+ 動態におけるミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与は小さいと考えられた。

3.3 ミトコンドリア Na^+ 動態における Na^+ 輸送担体の寄与

ミトコンドリア Na^+ 動態の評価は、ミトコンドリアに選択的に集積する性質をもつ Na^+ 感受性蛍光色素 CoroNaRed を用いて行った。**Fig. 4** は、A20 B リンパ球細胞において、CoroNaRed (**Fig. 4B**) がミトコンドリア標的色素

(MitoTracker Green; **Fig. 4A**) と共局在することを示している。

CoroNaRed を負荷した A20 B リンパ球細胞を用いて、ミトコンドリア Na^+ 動態におけるミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与を調べた。細胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの阻害剤である $50\ \mu\text{M}$ ouabain の添加によって、CoroNaRed の蛍光シグナルは著しく増大した(**Fig. 5A**)。これは、細胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの阻害剤による細胞質 Na^+ 増加が、二次的なミトコンドリア Na^+ 増加を引き起こしたと考えられる。一方、ミトコンドリア $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCLX)の阻害剤である $20\ \mu\text{M}$ CGP-37157 の添加によっては、CoroNaRed の蛍光シグナ

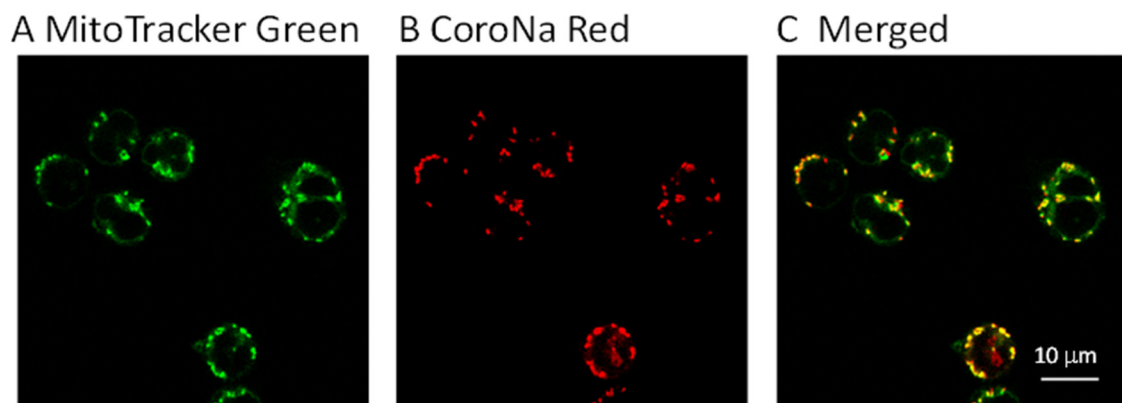


Fig. 4. Mitochondrial specific loading of CoroNaRed in A20 B lymphocytes. A. Mitochondrial specific dye, MitoTracker Green. B. CoroNaRed. C. A merged image of A and B.

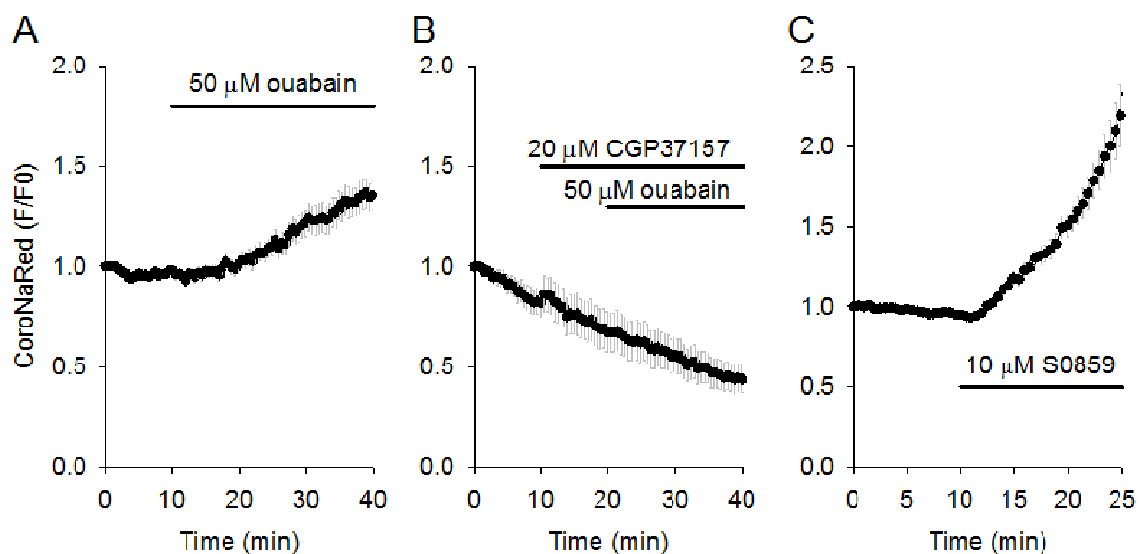


Fig. 5. Effects of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump inhibitor ouabain (A), mitochondrial $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor CGP-37157 (B), $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter inhibitor S0859 (C) on mitochondrial Na^+

ルの変化は認められなかった (**Fig. 5B**)。さらに、CGP-37157 存在下では、ouabain を添加しても CoroNaRed の蛍光シグナルの増大は認められなかった (**Fig. 5B**)。つまり、細胞質からミトコンドリアへの Na^+ 取り込みに、ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCLX) が大きく寄与することを示す。次に、 Na^+ - HCO_3^- 共輸送体の特異的阻害剤である 10 μM S0859 を細胞に添加すると、著しい CoroNaRed の蛍光シグナルの増大が認められた。その程度は 50 μM ouabain による変化をはるかに上回っていた (**Fig. 5C**)。これらの結果から、S0859 で阻害される Na^+ - HCO_3^- 共輸送体ファミリーがミトコンドリアに存在しており、ミトコンドリアから Na^+ を細胞質へ排出していることが示唆された。

リンパ球においては、膜表面に存在する抗原受容体に抗原が結合すると、抗原受容体からのシグナル伝達が起こり細胞質 Ca^{2+} が増加する。A20 B リンパ球細胞においても、抗原受容体の特異的抗体 (anti IgG 抗体) で架橋すると、細胞質 Ca^{2+} の一過性の増加とそれに続く振動性の Ca^{2+} 増加が見られる (**Fig. 6A**)。この細胞質 Ca^{2+} 変化に伴い、細胞質 Na^+ 、ミトコンドリア Na^+ が変化するかどうか調べた。anti IgG 抗体投与により、細胞質 Na^+ (SBFI 蛍光) は、細胞質 Ca^{2+} 変化よりやや遅れて僅かではあるが一過性に増加した。一方、ミトコンドリア Na^+ の変化は見られなかつ

た。一過性の細胞質 Na^+ の上昇は、増加した細胞質 Ca^{2+} を細胞外に排出するために、細胞膜の Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCX) が寄与することを示唆する。

3. 4 ミトコンドリアイオン動態・エネルギー代謝の数値モデル構築

ミトコンドリアのイオン動態に関しては、 Ca^{2+} 動態を除き詳細は未だ解明されていない。ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出は Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCLX) によって主に行われ、起電性であることから (Kim and Matsuoka, 2008)、 $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を想定すると細胞質への Ca^{2+} 排出に伴い 3 倍量の Na^+ がミトコンドリアに流入すると考えられる。一方、ミトコンドリアからの Na^+ 排出は Na^+ - H^+ 交換体が古くから知られるが (Gunter and Pfeiffer, 1990)、その分子実体は不明である。ミトコンドリアへの Na^+ 流入は NCLX が、 Na^+ 排出は Na^+ - H^+ 交換が行うと仮定して、ミトコンドリアのイオン動態、つまり、 H^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 動態が数値モデルで再構築できるかどうかを検証する目的で、既存のデータ及び我々の実験データをもとに、ミトコンドリアのイオン輸送体の機能を数値モデル化した。さらに、クエン酸回路、酸化的リン酸化過程を組み込んだミトコンドリアのイオン動態・エネルギー代謝の数値モデルを実装した。**Fig. 7** にその概略を示す。

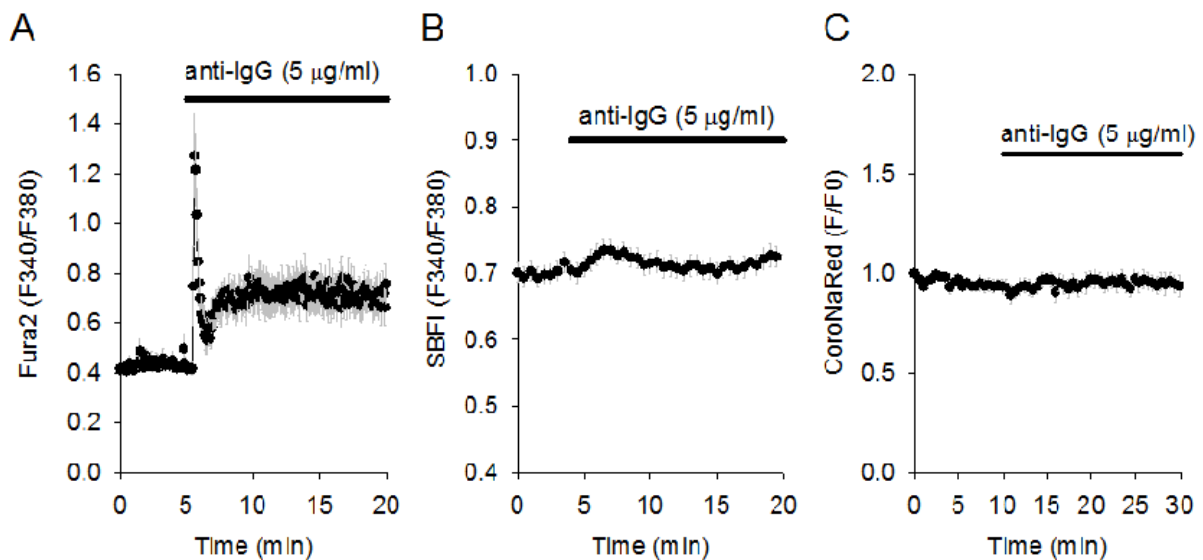


Fig. 6. B cell receptor mediated changes of cytoplasmic Ca^{2+} , cytoplasmic Na^+ and mitochondria Na^+ . **A.** Cytoplasmic Ca^{2+} measured with Fura2. **B.** Cytoplasmic Na^+ measured with SBFI. **C.** Mitochondrial Na^+ measured with CoroNaRed. B cell receptor of A20 B lymphocytes was stimulated by applying 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-IgG antibody.

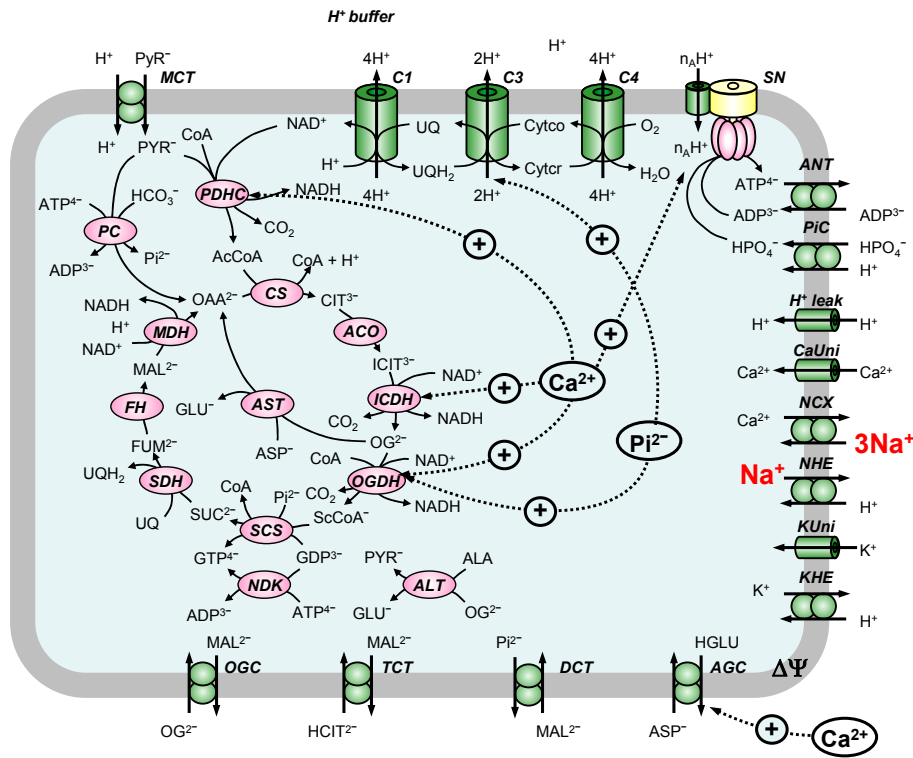


Fig. 7. A scheme of mathematical model of mitochondria

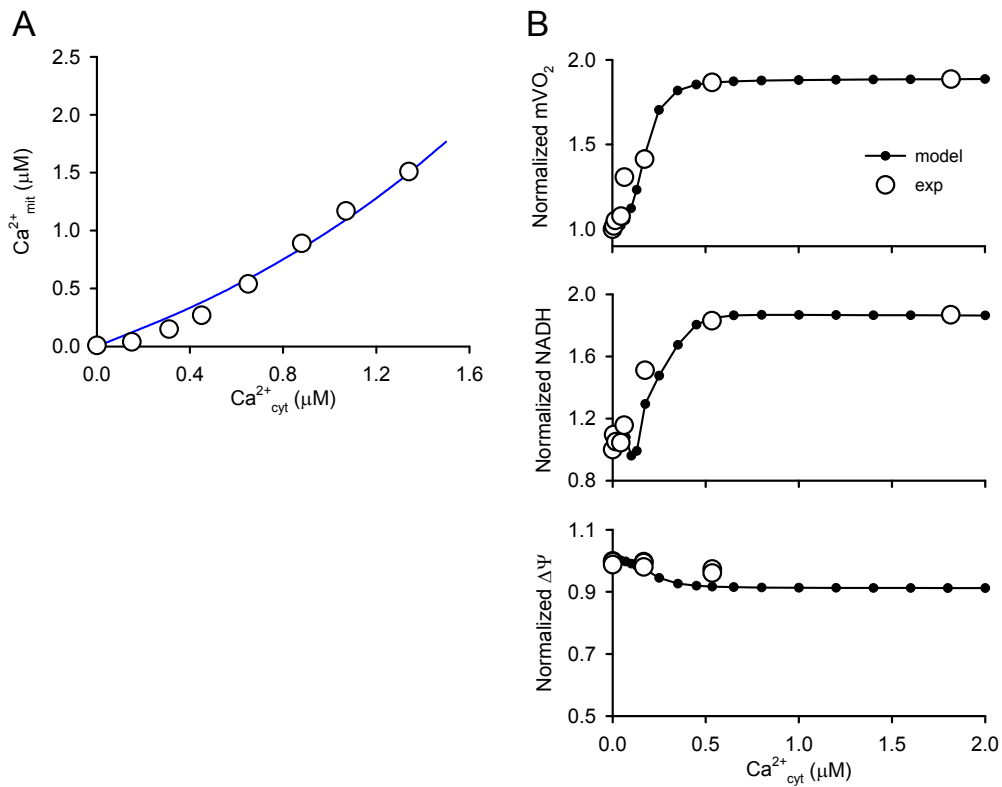


Fig. 8. Simulation results. **A.** Steady state relationship between cytoplasmic Ca^{2+} and mitochondria Ca^{2+} . Circles are experimental data by Wan et al. (1989). **B.** Cytoplasmic Ca^{2+} dependences of mitochondrial oxygen consumption (mVO_2), mitochondrial NADH and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). Circles are experimental data by Territo et al. (2000)

このミトコンドリア数理モデルにおいては、細胞質 Ca^{2+} とミトコンドリア Ca^{2+} の関係 (Fig. 8A)、細胞質 Ca^{2+} に依存したミトコンドリア酸素消費量、ミトコンドリア NADH、ミトコンドリア膜電位変化の実験データ (Territo *et al.*, 2000) をよく再現することができる (Fig. 8B)。定常状態におけるミトコンドリア Na^+ 濃度は 2.2 mM で、報告されている値と近い。ミトコンドリア H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 濃度も実験データの範囲内である。しかし、このモデルでは、ミトコンドリア代謝で産生される大量の二酸化炭素 (CO_2) の処理は考慮されていない。実験的に Fig. 5 で示したように、ミトコンドリアの $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体がミトコンドリアからの細胞質への Na^+ 排出に寄与しているならば、それは、ミトコンドリアで産生される CO_2 の細胞質への輸送のためであると推測される。

4. 考 察

本研究では、これまでのミトコンドリア研究をさらに発展させ、ミトコンドリアー細胞質 Na^+ 動態と細胞機能との関連を特に培養 B リンパ球において明らかにすることを目指した。細胞質 Na^+ 濃度変化に対するミトコンドリアの Na^+ 輸送体の寄与は小さいが、ミトコンドリアの Na^+ は細胞質 Na^+ の変化に伴い、大きく変わる可能性が示された。これは、ミトコンドリア容積よりも細胞質容積が大きいことによると考えられる。リンパ球においては、ミトコンドリア容積は細胞質の約 8% にすぎない (Petrzilka and Schroeder, 1979)。

数理モデル解析から、ミトコンドリア CO_2 産生と処理を考慮しない数理モデルにおいては、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換体、 Ca^{2+} ユニporter、 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換体、 $\text{K}^+\text{-H}^+$ 交換体、並びに電子伝達系による H^+ 排出と ATP 合成酵素などによる H^+ 流入で、ミトコンドリアイオン動態はバランスできることが明らかになった。しかし、ミトコンドリア代謝にともなう大量の CO_2 を処理するためには、まず CO_2 を細胞質へ排出しなければならない。その機序のひとつとして、 $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体、特に SLC4A7 が寄与すると推測された。

5. 今後の課題

今年度は、薬物による Na^+ 輸送体抑制に伴う細胞質及びミトコンドリア Na^+ 濃度変化を測定することで、ミトコンドリア Na^+ 輸送体の寄与を推測した。用いた薬物は選択性があり高くないため、今後は、siRNA などの選択的遺伝子ノックダウン手法などを駆使して、より選択的にミトコンドリア

Na^+ 輸送体の機能解析を進める。また、B リンパ球特異的 NCLX ノックアウトマウスの作成が現在進んでおり、このマウスを確立したときには、マウス脾臓などの B リンパ球を用いた研究へと発展させてゆく。

また、ミトコンドリア数理モデルにおいては、ミトコンドリアにおける CO_2 処理系を実装した数理モデルへと発展させてゆく。これにより、ミトコンドリア CO_2 処理とミトコンドリア Na^+ 動態との関係を理論的に明らかにしたい。

6. 文献等

- Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. Pivotal role of mitochondrial $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in antigen receptor mediated Ca^{2+} signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *J Physiol* 2012; 590(3): 459-474.
- Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. Mitochondria $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in cardiomyocytes and lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 2013; 961: 193-201.
- Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The mitochondrial $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci Rep* 2013; 3: 2766.
- Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The destiny of Ca^{2+} released by mitochondria. *J Physiol Sci* 2015; 65(1): 11-24.
- Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol Cell Physiol* 1990; 258: C755-C786.
- Kumar S, Flacke JP, Kostin S, Appukuttan A, Reusch HP, Ladilov Y. SLC4A7 sodium bicarbonate co-transporter controls mitochondrial apoptosis in ischaemic coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2011; 89(2): 392-400.
- Kim B, Matsuoka S. Cytoplasmic Na^+ -dependent modulation of mitochondrial Ca^{2+} via electrogenic mitochondrial $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange. *J Physiol* 2008; 586(6): 1683-1697.
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A., and Balaban, R. S. Ca^{2+} activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C423-435.

Wan B, LaNoue KF, Cheung JY, Scaduto RC Jr.
Regulation of citric acid cycle by calcium. *J Biol Chem*
1989; 264: 13430-13439.

Petrzilka GE & Schroeder HE. Activation of human
T-lymphocytes. A kinetic and stereological study. *Cell*
Tissue Res 1979; 201: 101-127.

Cell-Physiological and Systems-Biological Study on Mitochondrial Na⁺ Dynamics

Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi

Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

Summary

To clarify the coupling between mitochondrial and cytoplasmic Na⁺ dynamics, we performed time-lapse imaging of cytoplasmic and mitochondrial Na⁺ using SBFI and CoroNaRed, respectively, in A20 B lymphocytes, and created a mathematical model of mitochondrial ion dynamics and energy metabolisms using object-oriented programming method. We first confirmed the mRNA expressions of mitochondrial Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (SLC4A7) and mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCLX) in A20 B lymphocytes and HL-1 cardiomyocytes. In A20 B lymphocytes, an NCLX inhibitor CGP-37157 did not significantly affect cytoplasmic Na⁺ (SBFI fluorescence), while a Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter inhibitor S0859 slightly increased cytoplasmic Na⁺. It was speculated that mitochondrial Na⁺ transporters make little impact on cytoplasmic Na⁺. The inhibition of plasma membrane Na⁺-K⁺ ATPase by ouabain induced increases of both cytoplasmic and mitochondrial Na⁺ (CoroNaRed fluorescence). CGP-37157 suppressed the ouabain-induced increase of mitochondrial Na⁺, suggesting a contribution of NCLX to Na⁺ influx into mitochondria. S0859 markedly increased mitochondrial Na⁺, suggesting that mitochondrial Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter functions as a Na⁺ extruder. We successfully created a mathematical model of mitochondrial ion (H⁺, Na⁺, Ca²⁺, K⁺) dynamics and energy metabolism under the conditions that mitochondrial CO₂ production and processing are not considered. This model reproduced well experimental data. The above findings suggested that cytoplasmic Na⁺ influences mitochondrial Na⁺ while mitochondrial Na⁺ little affects cytoplasmic Na⁺. This is probably due to a small volume ratio of mitochondria to cytoplasm, approximately 8%. Mitochondrial Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter was suggested to function as a Na⁺ extruder, indicating HCO₃⁻ extrusion out of mitochondria. The Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter may be involved in processing vast amounts of CO₂ produced by mitochondrial metabolism. Mitochondrial Na⁺ dynamics should be reexamined in terms of mitochondrial metabolism.