

ミトコンドリアにおける信号変換の研究

Visualization of signal transduction in a single mitochondrion

研究代表者 東京農工大学工学部生命工学科 講師 太田善浩
Assistant Professor, Dept. of Biotechnology, Tokyo University of
Agriculture and Technology Yoshihiro OHTA

In a single mitochondrion, we have succeeded in measurements of the synthesis of NAD(P)H, the reduction of flavin, and the formation of membrane potential with fluorescence microscopy. For the measurements, mitochondria were adsorbed on a cover slip. The results from measurements of single mitochondria showed a good correlation with those of mitochondria suspended in a buffer solution.

1. 研究目的

ミトコンドリアは、生物のエネルギー源である ATP を作る細胞内器官である。ATP を合成する過程では様々な物質がミトコンドリアに出入りしており、これらの物質によりミトコンドリアの機能は制御されている。また、ミトコンドリアはアポトーシスに深く関わっており、細胞がアポトーシスに至る過程ではミトコンドリアが細胞質からの信号を受けて通常では起こらない働きをすることが知られている。このようにミトコンドリアは細胞からの情報を処理することによって、機能を調節している。

今まで、ミトコンドリアの活性測定は大別して2つの方法で行われてきた。1つはミトコンドリア懸濁液で行う方法であり、もう一つは細胞内のミトコンドリアで測定するものである。いずれの場合も、1個のミトコンドリアでその活性の経時変化を追うことはできていない。細胞内ミトコンドリアは、1つ1つ個別に存在しているので、与えられた刺激に対し全てのミトコンドリアが同じ挙動を示すわけではないと思われる。また、ミトコンドリア集団での測定では、1個1個のミトコンドリアの反応の経時変化が平均化され、正確な応答を測定していない可能性もある。特にミトコンドリア機能の重要な指標である膜電位は、ミトコンドリア内外の電荷の移動を用いて測定するため、個々のミトコンドリアのレベルで測定しないと経時変化を追うことは困難である。

上記の理由から、細胞内信号をミトコンドリアで変換する機構を正確に調べるために、個々のミトコンドリアでその反応機構を調べることが必要とされてきた。本研究では、1個のミトコンドリアで活性の経時変化を測定する技術を開発した。

研究経過

ミトコンドリアは豚の心筋から遠心分離により調製し、液体窒素で凍結後、-80度で保存した(参考文献1)。実験前に解凍したミトコンドリアを、ポリフェノール蛋白によりカバーガラス上に吸着させ蛍光顕微鏡で観察した。ミトコンドリアの機能として、NADHの生成、フラビンの還元、膜電位の増加を捉えた(参考文献2、3)。これらの反応は、クエン酸回路の基質であるリンゴ酸を加えることにより開始させた。NADHとフラビンの測定はミトコンドリアの自家蛍光を測定し、膜電位はミトコンドリアを蛍光色素TMREで染色することにより測定した。観察は全て37度で行った。

カバーガラスと対物レンズには、市販の自家蛍光の少ないタイプを用いた。また、蛍光の検出には、冷却CCDカメラを用いた。

3. 研究成果

調製した試料、及びカバーガラスへの吸着の評価

ミトコンドリアのカバーガラス上への吸着状態を調べた結果、懸濁液を添加して洗った後のカバーガラスでは、直径約1 μ mの点が分散していることがわかった(図1(a))。また、これらの点のうち約8割でNADHとフラビンの自家蛍光が認められた(図1(b))。以上から、カバーガラス上にミトコンドリアを分散させて吸着させることができることが示された。自家蛍光を示さない点は、破損したミトコンドリアか他の膜系の混入物であると考えられる。自家蛍光を示さない点の割合は、密度勾配遠心をして更に分離しても有意には下がらなかった。

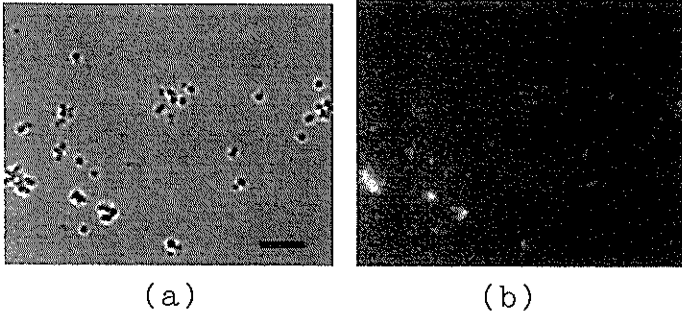


図1 単離ミトコンドリアの画像
カバーガラスに吸着させたミトコン
ドリアの顕微鏡写真。(a)ミトコンド
リアの透過光像、(b)NAD(P)Hの自
家蛍光画像。barは5 μ m

NADH生成の観察

カバーガラスに吸着させたミトコンドリアの活性を確認するために、クエン酸回路の基質であるリンゴ酸を添加し、ミトコンドリア内NADHからの自家蛍光を測定した。リンゴ酸の添加後すぐに、自家蛍光は増加しやがて減少した。増加するタイミングはほぼ全てのミトコンドリアで揃っていたが、減少する速度はまちまちであった。これらの結果を平均すると、ミトコンドリア懸濁液を用いた測定と同様の経時変化を示し、カバーガラス上でも懸濁液の中と同様の十分な活性を持つことがわかった(図2(a)、(b))。

また、凍結融解を適切に行わなかった試料では、ミトコンドリア外にNADHが流れだし、バックグラウンドの蛍光強度が上昇した。これは、生成されたNADHがミトコンドリア外に流れ出したことによると考えられる。このことから、単一ミトコンドリアを対象としたNADHの測定は、ミトコンドリアの内膜が破損しているかどうかのチェックに使用できると思われる。

フラビンの観察

ミトコンドリア内のフラビンの自家蛍光を測定した。リンゴ酸の添加後、蛍光強度の減少とその後の増加が観察された。蛍光強度の減少は、リンゴ酸の添加により濃度の増加したNADHからフラビン蛋白質に電子が渡ってフラビン蛋白質が還元されたことを示し、蛍光強度の増加は還元されたフラビンが酸化されたことを示す。フラビンの還元状態の経時変化には、個々のミトコンドリアの間に大きなばらつきが認められず、集団で測定した場合とよく似たパターンを示した(図3(a)、(b))。

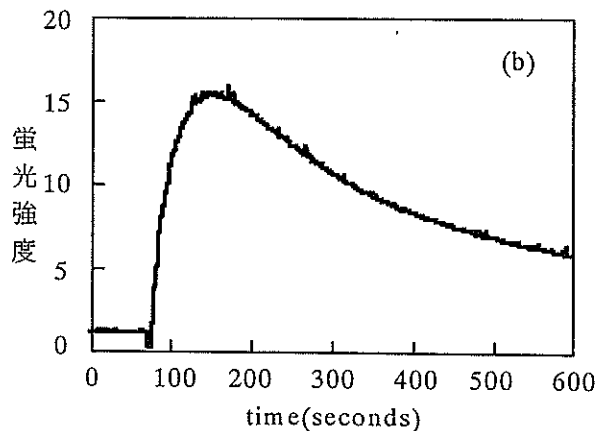
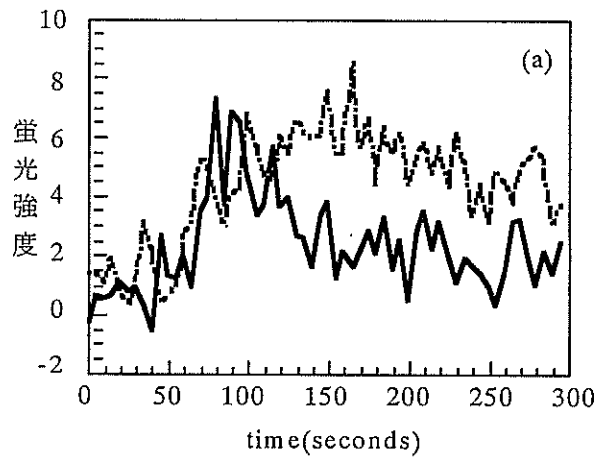


図2 ミトコンドリアにおけるNAD(P)Hの生成反応。縦軸はの蛍光強度は、NAD(P)Hの自家蛍光の強度を示す。(a)単一ミトコンドリアにおける測定、t=40secでリンゴ酸を添加。点線と実線は異なる2つのミトコンドリアでの測定結果を示す。(b)ミトコンドリア懸濁液での測定、t=60secでリンゴ酸を添加。

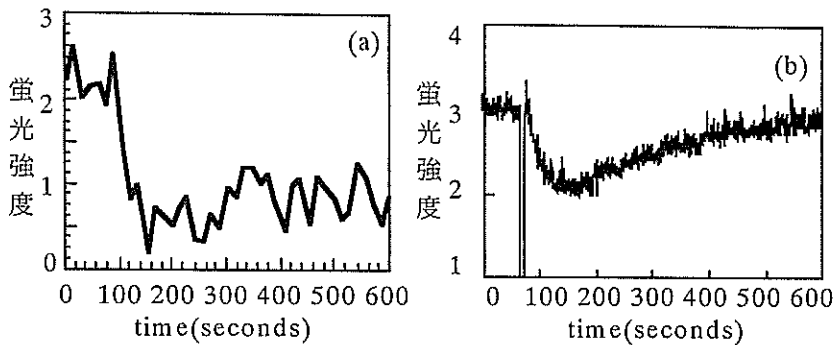


図3 ミトコンドリアにおけるフラビンの還元反応。縦軸はの蛍光強度は、フラビンの自家蛍光の強度を示す。(a)単一ミトコンドリアにおける測定、 $t=40\text{sec}$ でリンゴ酸を添加。(b)ミトコンドリア懸濁液中での測定、 $t=60\text{sec}$ でリンゴ酸を添加。

膜電位の観察

正電荷の色素であるTMREにより、ミトコンドリアを染色した。ミトコンドリアにより蛍光強度は有意に異なり、ミトコンドリアごとに膜電位の大きさが異なっていることが示唆された。リンゴ酸の添加後、蛍光強度の上昇が観察され、ミトコンドリアの膜電位が増大するのが認められた。その経時変化はミトコンドリアごとに異なり、リンゴ酸添加後膜電位が、一過的に上昇するもの、上昇と下降を繰り返すものなどが存在した(図4(a)、(b))。

今後の課題と発展

以上のように、ミトコンドリアにおけるATP合成の前段階である、NADHの生成、フラビンの還元、膜電位の増加を、個々のミトコンドリアで捉えることに成功した。これらのうち、NADHの生成と膜電位の増加、特にミトコンドリア膜電位の時間的変動は、図4に示すようにミトコンドリアによって大きく異なっており、集団の平均的な変動から個々のミトコンドリアの変化を推定することは不可能である。今までは膜電位の時間的変動を測定した例はほとんどなかった。化学浸透圧説によると、膜電位の変動はATPの合成反応に直接結びつくと考えられるので、膜電位の変動のメカニズムを知ることはATP合成のダイナミクスを知る上で極めて重要である。本研究で開発した単一ミトコンドリアで膜電位を測定する技術は、ATP合成機構のうち、特にミトコンドリアが膜電位を維持するメカニズムについて新たな理解をもたらすだろう。

また、ミトコンドリアは細胞質と様々なシグナルのやりとりをしており、その機能はATP合成以外の所、例えばアポトーシスにおいても重要である。ミトコンドリアに形成される透過性転移

性ポアと呼ばれる穴から流れ出した物質がアポトーシスを引き起こすという説もある(参考文献4)。穴ができれば膜電位を失うので、穴がいつ・どのようなときに形成されるかは、膜電位をモニターすればわかるはずである。それゆえ、本研究はアポトーシスのメカニズムの理解に役立つと思われる。

参考文献

- 1) Müller, M., Krebs, J. J. R., Cherry, R. J., and Kawato, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1117-1120
- 2) Hajnóczky G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., and Thomas, A. P. (1997) *Cell* **82**, 415-424
- 3) Loew, L. M., Carrington, W., Tuft, R.A. and Fay, F. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12579-12583
- 4) 鈴木寛、(1997) *細胞* **29**、484-486

発表論文リスト

- 1) Ohta, Y. (1998) *Japanese Journal of Physiology* **48** supplement, in press
- 2) 太田善浩、河上擁一、作山孝法、金刺義久 (1997) 第35回生物物理学会年回講演予稿集

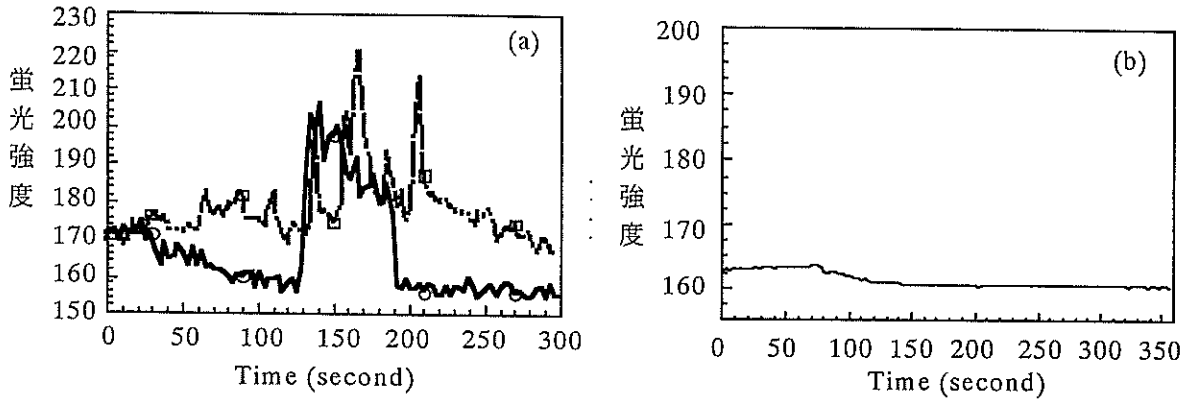


図4 ミトコンドリア膜電位の時間変化計測

(a)個々のミトコンドリアの膜電位変化。時刻 $t=70\text{sec}$ でクエン酸回路の基質であるリンゴ酸を添加した。個々のミトコンドリアごとに変動のパターンが異なることがわかる。実線と点線は異なる2つのミトコンドリアから得られた結果を示す。(b)顕微鏡全画面で蛍光強度変化を計測。全画面での計測では膜電位の変化は認められない。