

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82723

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：19K22993

研究課題名（和文）ミトコンドリア直接刺激によるメカノセンサの探索

研究課題名（英文）Exploration of mechanosensors by direct mitochondrial stimulation

研究代表者

塚本 哲（Tsukamoto, Akira）

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授

研究者番号：90511460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアを直接刺激する新規実験系を構築し、ミトコンドリアにメカノセンサが存在するか検証し、メカノセンサを特定することを目的とした。単離したミトコンドリアに歪みを負荷する手法としてガラス微小針や流体剪断力などを検証し、シャーレ底面に局在させる手法として電場や底面コーティングなどを検証した。歪みの負荷を負荷したところミトコンドリア膜電位が変化したものの、アーチファクトである可能性が否定できなかった。局在の手法についてはPLLコーティングが比較的有効であることがわかった。細胞骨格を介してミトコンドリアに歪みを負荷する手法ならびに、それを顕微鏡上で連続観察できる装置の開発を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアを力学的に直接刺激する手法として単純な圧縮刺激や流体剪断力は適さないことが示唆された。細胞質の影響を排除しつつミトコンドリアを力学的に刺激する手法として直接刺激ではなくdigitoninにより接着細胞の膜に穴を開けた状態にして接着細胞に引張歪みを負荷する手法を検証することとして、そのために必要な装置として顕微鏡上であっても引張刺激された細胞を連続観察できる装置の開発を進めた。この装置を使うとミトコンドリア膜電位のみならず、ほかの細胞応答も観察ができる。学術的意義として、この装置によって引張刺激した細胞において物理的、生化学的な応答が連続観察できるようになったことが挙げられる。

研究成果の概要（英文）：Isolated mitochondria were directly stimulated to verify whether mechanosensors exist in mitochondria. Furthermore, mechanosensors in mitochondria were supposed to be identified. To apply strain to isolated mitochondria, glass micro-needles and fluid shear force were tested. Also, to localize mitochondria on surfaces of dishes, electric field and bottom coating were tested. As a result, although the mitochondrial membrane potential changed when strain was applied, the possibility of artifact could not be excluded. PLL coating was found to be a relatively effective localization technique. To apply strain to mitochondria through the cytoskeleton, a device that enables continuous observation of the mitochondria under a microscope have been developed.

研究分野：生体医工学

キーワード：ミトコンドリア 力学刺激

1. 研究開始当初の背景

メカノセンサとは、細胞に与えられた力学的な刺激を生理応答に変換するタンパク質である。それらは細胞内に点在しており、細胞膜や細胞骨格、接着斑などに多く存在する。ミトコンドリアは細胞内で ATP 合成などの機能を持ち、細胞に力学的な刺激が与えられると、その機能を変化させる。しかしながら、細胞内に無数に存在するメカノセンサのうち、どれがミトコンドリアの機能を変化させたのか、候補すら解明できていない。それを解明できれば、力学的な環境において発症しミトコンドリアが関与する疾患、例えば高血圧や心肥大などを対象として新薬を開発できる。また、ミトコンドリアにメカノセンサが存在したとすれば、メカノバイオロジーの学術体系そのものが大きく転換される可能性がある。

2. 研究の目的

メカノセンサがミトコンドリアに存在するか検証し、メカノセンサを特定することである。まず、ミトコンドリアを直接刺激する新規実験系を構築し、ミトコンドリアにメカノセンサが存在するか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ミトコンドリアを単離するため、培養細胞を回収した後に高せん断で細胞膜を破碎し、ミトコンドリア外膜に発現する Tom22 と抗 Tom22 抗体結合磁気ビーズを結合させ、磁場によりミトコンドリアを単離することを予定していた。実際に試したところ、各ステップの成否を確認する作業が想定以上に多くなり、本来の目的であるミトコンドリアの単離には適さないと判断された。そこでミトコンドリアを単離する方法として遠心分離法を採用することにした。具体的には、培養細胞を回収した後に高せん断で細胞膜を破碎して遠心分離を繰り返して細胞核など不要な細胞内小器官を排除した状態にした。

ミトコンドリアに歪みを負荷するため、抗 Miro 抗体を介してミトコンドリアをガラス微小針（熱加工して自作、先端径 5 μm 程度）ならびにカバーガラスに結合させ、ミトコンドリアに 10%（生理的環境下）から 20%（病的環境下）の引張歪みを定量的に負荷することを予定していた。より簡易的に歪みを負荷するため、抗体を介さずにミトコンドリアに圧縮歪みを負荷することとした。ガラス微小針でミトコンドリアを直接接触させる方法のほか、ミトコンドリアとガラス微小針との間にアガロースゲルを介在させて接触させる方法を試した。さらに本来の目的であった引張歪みを負荷する方法として流体剪断力を使う方法を試した。具体的には、先端径が 30 μm ほどのガラス管路からミトコンドリア溶液を高速に噴出させることでミトコンドリアに流体剪断力を負荷した。加えて細胞骨格を介してミトコンドリアに引張歪みを負荷する方法として digitonin により接着細胞の膜に穴を開けた状態にして接着細胞に引張歪みを負荷する方法を試した。本来の目的である単離したミトコンドリアに対する引張歪みの負荷ではないものの、細胞膜に穴が開いて細胞質が排除された状態であることから単離したミトコンドリアに限りなく近い状態であると考えた。しかしながら、この方法では引張歪みを負荷した細胞が顕微鏡の視野や焦点から外れるという欠点があった。そこで欠点を補うため、モータによる補正で視野や焦点からの外れを排除する機構を作製した。

ミトコンドリアの活性化を評価するため、ミトコンドリアの膜電位を定量する蛍光色素である TMRM を使ってミトコンドリアを染色した。染色する濃度によってミトコンドリアの応答などが変化することが先行研究で知られていたため、染色する濃度が最小限となるよう染色条件を至適化させた。

4. 研究成果

ガラス微小針をミトコンドリアに直接接触させて歪みを負荷するため、ミトコンドリアをシャーレ底面に安定して存在させる必要があった。ミトコンドリアは電気特性を有することから電場を与えて底面に安定して存在させるなどの手法も試したが、安定した結果は得られなかった。先行研究でシャーレを PLL コートする手法が紹介されていたため試したところ、固着するほど安定はしなかったものの、若干の改善は見られた。ガラス微小針でミトコンドリアに圧縮歪みを直接負荷したところ、ミトコンドリアの活性化により TMRM の蛍光強度が上昇すると期待されたが、逆に蛍光強度が低下する様子が観察された。これはミトコンドリアの構造が破壊されたことによって TMRM がミトコンドリアの外に流出したことが原因と考えられる。ここまでの実験の短所であったシャーレへの固着性の低さや圧縮歪みによるミトコンドリア構造の破壊を改善す

るため、ミトコンドリアとガラス微小針との間にアガロースゲルを介在させて接触させる方法を試した。具体的にはシャーレにミトコンドリア溶液を加え、しばらく時間を置いてミトコンドリアを沈降させ、厚さ 1 mm ほどのアガロースゲルを上から静かに乗せ、アガロースゲルの上からガラス微小針で圧縮歪みを負荷した。しかしながら、ミトコンドリアの活性化を示すような結果は得られなかった。

先端径が 30 μm ほどのガラス管路からミトコンドリア溶液を高速に噴出させてミトコンドリアに流体剪断力を負荷したところ、噴出口あたりでミトコンドリアが次々に凝集していく様子が観察された。この凝集体に引張歪みが負荷される様子も観察された。さらにミトコンドリアの活性化を示すような蛍光輝度の上昇も観察された。しかしながら蛍光輝度の上昇が観察できた確率は希少であった。さらに蛍光を観察するための励起光をミトコンドリアに照射しただけでも蛍光輝度の上昇が観察される事例も散見された。これらのことからミトコンドリアへの引張歪みの負荷がミトコンドリアを活性化させたとは結論づけられなかった。

細胞骨格を介してミトコンドリアに引張歪みを負荷する方法として digitonin により接着細胞の膜に穴を開けた状態にして接着細胞に引張歪みを負荷する方法を試した。digitonin により接着細胞の膜に穴を開けた状態で TMRM により染色された。次に、引張歪みを負荷した細胞が顕微鏡の視野や焦点から外れるという欠点を補うため、XYZ 軸それぞれに補正機構となるモータを取り付けた。接着細胞に引張歪みを伝達する透明薄膜に蛍光ビーズを固着させた状態で透明薄膜に引張歪みを負荷して蛍光ビーズの挙動を XYZ 軸で測定した。この測定で得られた XYZ 軸の挙動に対して逆向きとなる動きをモータで与えて透明薄膜の挙動を相殺させた。その結果、1 Hz で 20% 程度の引張歪みを透明薄膜に負荷したとしても顕微鏡の視野から外れることなく、さらに焦点については 1 μm 程度の変化が生じるのみとなった。開口数が 0.5 程度の対物レンズであれば焦点から外れることなく透明薄膜の上に接着させた細胞を観察し続けられる。digitonin により接着細胞の膜に穴を開けた状態で TMRM により染色された細胞に引張歪みを負荷してミトコンドリアが細胞骨格を介して活性化するかどうかは検討できておらず、上述した機構により今後検討を進めていくことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A. Tsukamoto, M. Baba, T. Takahashi, T. Amo, K. Nakagawa
2. 発表標題 Low-energy shock waves alter mitochondrial morphologies via actin cytoskeletons
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天羽 拓 (Amo Taku) (40453922)	防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授 (82723)	
研究分担者	宮内 良広 (Miyachi Yoshihiro) (70467124)	防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授 (82723)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------