

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成26年3月18日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570158

研究課題名（和文）

オルガネライメージングによるネクロシスのシグナル伝達機構の研究

研究課題名（英文）

Organelle imaging of signal transduction towards necrotic cell death

研究代表者

太田 善浩 (OHTA YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10223843

研究成果の概要（和文）：

ネクロシスのシグナル伝達機構を調べることを目的とし、シクロフィリンDがミトコンドリアのエネルギー代謝に及ぼす影響、および、ネクロシス誘導時に観察されるミトコンドリアの変化を単一ミトコンドリアで詳細に計測した。その結果、1) シクロフィリンDがピルビン酸代謝に与える影響の検出、2) 細胞内での持続的な膜透過性遷移の検出、3) ミトコンドリアの膜透過性遷移と膨潤の同時イメージング、に成功した。これらは、ネクロシスのうち、プログラム細胞死として生じる細胞死の理解に向けて、重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：

In order to investigate the mechanism of intracellular signal transduction towards necrosis, we measured the effects of cyclophilin D on the energy metabolism of mitochondria and the changes of mitochondria observed upon induction of necrosis. The changes were detected by imaging single mitochondria with optical microscopy. As a result, we succeeded in 1) detection of the effects of cyclophilin D on the pyruvate metabolism in cells, 2) detection of long-lasting mitochondrial permeability transition in cells, and 3) simultaneous imaging of mitochondrial permeability transition and mitochondrial swelling. These results provide important information on the mechanism of necrosis as programmed cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング、オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

細胞死は生体にとって必要な現象である一方で不適切に起こると疾病・障害の原因となるため、その制御機構が研究されてきた。

細胞死はネクロシス、アポトーシス、オートファジーによる細胞死の3種類に分類され、後者2つに関しては詳細な分子機構が解明されている。一方、ネクロシスはその他

の制御不能な細胞死という位置づけで理解が遅れていた。しかし、少しずつではあるが、国内外でネクローシスの研究が進み、理解の糸口が見つかりつつあった。例えば、ミトコンドリアの ATP 合成の低下がネクローシスの誘導に重要であること、ネクローシスに分類された細胞死の中には蛋白質により制御された細胞死が含まれていること、及びミトコンドリアのプロリン異性化酵素であるシクロフィリン D の阻害はネクローシスを抑制することなどである。

2. 研究の目的

本研究では、ネクローシスの機構の理解を目指して、次の3つの研究を行うことを目的とした。

- (1) シクロフィリン D が細胞のエネルギー代謝に影響し、その結果、ネクローシスを促進するという仮説の検証。
- (2) ネクローシスの誘導時に起こる現象のうち、ミトコンドリア内膜の透過性の上昇（膜透過性遷移）とネクローシスの因果関係の解明。
- (3) ネクローシス時に生じるミトコンドリアの変化を詳細に調べる技術として、ミトコンドリアの膨潤と周囲のプロトン濃度の変化を1個のミトコンドリアで検出できる技術の開発。

3. 研究の方法

(1) シクロフィリン D のエネルギー代謝への影響の計測

シクロフィリン D が細胞内代謝に及ぼす影響を調べるため、野生型シクロフィリン D が過剰発現した細胞、及び酵素活性欠損型シクロフィリン D が過剰発現した細胞、及びそのコントロール細胞を用意し、これらを対象に乳酸生成速度、呼吸速度、細胞内 ATP 濃度、グルコース消費速度を計測し比較した。

(2) ミトコンドリアの膜透過性遷移とネクローシスの因果関係の計測

酸化剤によりネクローシスを誘導した細胞内でミトコンドリアの膜透過性遷移を検出し、ネクローシスと膜透過性遷移の因果関係を解明する。このために、細胞にカルセイン AM を負荷し、次に、酸化剤を加えてネクローシスを誘導し、その後形質膜の透過性を上げ、ミトコンドリアに残るカルセインの蛍光強度を計測した。膜透過性遷移が生じていれば、ミトコンドリア内のカルセインの蛍光強度が減少する。膜透過性遷移の阻害剤の存在下でネクロー

シスが誘導されたとき、本当に膜透過性遷移が抑制されているかどうかを調べる。

(3) 単一ミトコンドリアの膨潤と周囲のプロトン濃度の検出

単離した単一のミトコンドリアで膨潤を検出するために、ミトコンドリアをカバーガラスに吸着させ、個々のミトコンドリアの光の透過率を光学顕微鏡により計測した。ミトコンドリアの周囲のプロトン濃度は、ミトコンドリア外の pH 感受性蛍光色素を SNOM または 2 光子により局所的に励起して、ミトコンドリア近傍のみの pH 濃度を精度よく検出した。

4. 研究成果

(1) シクロフィリン D のエネルギー代謝への影響の計測

用意した3種の細胞間で、乳酸生成速度、呼吸速度に有意な差が認められ、シクロフィリン D が細胞のエネルギー代謝を変化させていることが示唆された。この変化の詳細、およびこの変化がネクローシスとどのように関係するかについては、結果を論文にまとめているところであるため、現時点では公表を差し控えたい。

(2) ミトコンドリアの膜透過性遷移とネクローシスの因果関係の計測

酸化剤を細胞に負荷して細胞にネクローシスを誘導すると、形質膜が損傷を受ける前にミトコンドリアが脱分極し、その際にミトコンドリア内のカルセインの蛍光強度が大きく低下した。このことは、形質膜が損傷を受ける前に細胞内でミトコンドリアの膜透過性遷移が生じていることを示している。膜透過性遷移の阻害剤は、酸化剤の濃度にかかわらず膜透過性遷移を阻害したが、高濃度の酸化剤ではネクローシスを抑制しなかった。現在、引き続き詳細な検討を行っているところである。

(3) 単一ミトコンドリアでの膨潤と周囲のプロトン濃度の検出

ミトコンドリア周囲の浸透圧を低下させて、ミトコンドリアを膨潤させた。この際の光のミトコンドリアの透過率の変化を計測すると、1個のミトコンドリアで膨潤が検出できることが分かった。次に、ミトコンドリアに Ca^{2+} を負荷して膜透過性遷移を誘導し、光学顕微鏡を用いて膜透過性遷移と膨潤を同じミトコンドリアで同時に検出した。膨潤が生じたミトコンドリアではほぼ全てのミトコンドリアで膜透過性遷移が先行して生じていたが、膜透過性遷移が生じていても必ずしも膨潤するとは

限らなかった。このことは、膜透過性遷移が生じると自動的に膨潤が生じるわけではなく、膜透過性遷移から膨潤に至るまでに何らかのミトコンドリア体積調節機構が存在することを示している。

また、ミトコンドリア近傍のプロトン濃度変動を計測するために、近接場光や2光子吸収でミトコンドリア近傍のpH感受性蛍光色素(SNARF)を局所的に励起し、生じた蛍光をレシオ計測した。その結果、ミトコンドリアの呼吸基質の添加により、ミトコンドリア周囲のpHが低下することが計測された。今までミトコンドリアのプロトンポンプ活性はミトコンドリア内膜の膜電位を計測することで検出されてきたが、プロトン駆動力のもう一つの成分であるプロトン濃度勾配を1個のミトコンドリアで検出する手法が存在しなかった。本成果は、世界で初めてプロトン濃度勾配の生成を1個のミトコンドリアで検出したものであり、画期的な成果だと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Morikawa D, Kanematsu K., Shibata T., Haseda K., Umeda N., and Ohta Y. “Detection of swelling of single isolated mitochondrion with optical microscopy” *Biomedical Optics Express* 5 (2014), 848-857
- ② Kanazashi, Y., Li, Y., Onojima, T., Iwami, K., Ohta, Y., Umeda, N. “pH Measurement Using Dual-Wavelength Fluorescent Ratio by Two-Photon Excitation for Mitochondrial Activity” *JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS* 51 117001-1- 11701-5 DOI 10.1143/JJAP.51.117001 (2012) (査読あり)
- ③ 長谷田圭亮、兼松啓太、太田善造 “ミトコンドリアの内部密度の評価法の開発とその応用、*バイオイメージング*、21、15-21 (2012) (査読あり)
- ④ Li Y., Shinohara R., Iwami K., Ohta Y. and Umeda N. “Observation of Mitochondrial Activity based on Time and Spatial pH Variation Measured by Near-Field Fluorescent Ratiometry” *Science China, Physics, Mechanics and Astronomy*, 54,

2225-2229 (2011)

DOI 10.1007/s11433-011-4533-4 (査読あり)

- ⑤ Kanazashi Y., Li Y., Onojima T., Iwami K., Ohta Y., and Umeda N. “Two-photon fluorescence near-field pH measurement for mitochondria activity” *Proc. SPIE* 8105, 81050E 1-7 (2011) DOI: 10.1117/12.893359 (査読あり)
- ⑥ Li Y., Shinohara R., Iwami K., Ohta Y. and Umeda N. “Dual Wavelength Fluorescent Ratiometric pH Measurement by Scanning Near-Field Optical Microscopy” *Proceedings of SPIE*, 7544:754419 1-6 (2011) (査読あり)
- ⑦ Tezaki M. and Ohta Y. “Experimental Protocols for Function Analysis of Isolated Presynaptic Terminals” *Clinical Neuroscience*, 28, 889-891 (2010) (査読なし)
- ⑧ 松野本宜寛、石曉磊、岩崎あすか、太田善造 “酸化ストレスによる細胞内ミトコンドリアの内膜透過性遷移の観察” *バイオイメージング*、18、278-283 (2010) (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① Haseda K., Kanematsu K., and Ohta Y. “The imaging analysis of mitochondria with retardation mediated differential interference microscope (RM-DIC)” 日本生物物理学会第50回年会 2012年9月24日 名古屋大学
- ② Yoshimatsu D., and Ohta Y. “Effects of the crowding of mitochondria on their ATP production” 日本生物物理学会第50回年会 2012年9月24日 名古屋大学
- ③ 太田善造 “シナプス小胞のH⁺勾配形成におけるミトコンドリアの役割” 日本薬学会第132回年会 シンポジウム「ミトコンドリアへの薬物の作用と創薬について考える」、2012年3月29日 北海道大学(札幌) (招待講演)
- ④ Osaki, H., Masuguchi, T., Nakazato, H., Matsunomoto, Y., Fujita, C., and Ohta, Y. “Effects of cyclophilin D on energy metabolism of cells.” 第49回日本生物物理学会年会、2011年9月17日、兵庫県

立大学

- ⑤ Kanematsu K., Kaji, T., and Ohta, Y.
Novel technique for study on the mechanism of mitochondrial volume maintenance 第 49 回日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 16 日、兵庫県立大学
- ⑥ Ohta Y., “Mitochondria reduce the production of ROS by their transient depolarizations” The 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2011 年 9 月 4 日、鹿児島市民文化ホール（招待講演）
- ⑦ 太田善浩、小野島匠
ミトコンドリアの一時的脱分極は活性酸素発生の抑制機構として働く 第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館
- ⑧ Haseda K., Li Y., Shinohara R., Kanezashi Y., Onojima T., Iwami K., Umeda N. and Ohta Y. An attempt to measure pH around mitochondria by using fluorescence microscopy with near field optical probe 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日、東北大学
- ⑨ Li Y, Shinohara R., Iwami K., Ohta Y. and Umeda, N. Dual Wavelength Fluorescent Ratiometric pH Measurement by Scanning Near-Field Optical Microscopy 6th International Symposium on Precision Engineering Measurements and Instrumentation (ISPEMI 2010) 2010年8月10日、Hangzhou, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 善浩 (OHTA YOSHIHIRO)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10223843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

梅田 倫弘 (UMEDA NORIHIRO)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：60111803