

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440065

研究課題名(和文)ミトコンドリアの密集・分散が自身の活性に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of mitochondrial crowding on their activities

研究代表者

太田 善浩(Ohta, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10223843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞にエネルギーの大半を供給する一方で、活性酸素種を発生させる細胞内器官である。活性酸素種は多量に発生すると、細胞に有害な影響を及ぼす。本研究では、計算機シミュレーションと単離ミトコンドリアを用いた実測を行い、ミトコンドリアの密集がエネルギー合成と活性酸素種発生に及ぼす影響を調べた。その結果、ミトコンドリアは密集すると、形成する電気化学的プロトン勾配が大きくなり、エネルギー合成の効率を増大させ、活性酸素種の発生を抑制することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are organelles that produce most of ATP and reactive oxygen species (ROS) in cells. Once ROS are excessively generated, they have a deleterious influence on intracellular components. In this study, we examined the effects of mitochondrial crowding on the generation of ATP and ROS by computer simulation and by measuring isolated mitochondria. When mitochondria exist in high density, mitochondria effectively generate electrochemical proton gradient across the inner membrane. As a result, the crowding of mitochondria leads to the efficient generation of ATP and the suppression of ROS.

研究分野：生物物理学

キーワード：ミトコンドリア ATP合成 活性酸素種 密集

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは様々な化学反応を進めるために働く ATP と組織や細胞にダメージを与える活性酸素種 (ROS) を産生している。これらの産生は電子伝達系により形成されるプロトン等のイオン濃度勾配や膜電位差などのミトコンドリア周囲の環境により大きな影響を受ける。

ミトコンドリアは細胞内で移動しており、これらの動態と細胞機能の関係は、国内外で多く研究されている。特に神経細胞では、ミトコンドリアの移動(輸送)障害を伴う神経障害がいくつも発見(例えば、Wang X et al., 2011 Cell)されており、ミトコンドリアがエネルギー要求性の高い神経突起の先端に移動する必要性が示唆されている。また、神経細胞以外の細胞でも、ミトコンドリアの細胞内分布には偏りがあり、やはりエネルギー要求性の高い箇所に密集していると考えられている。

これまでにミトコンドリアの密集度とその活性に着目した研究はほとんど行われていない。それはミトコンドリア研究の多くは懸濁液で行われており、細胞内のような密集状態を作り出せないこと(ミトコンドリア間の距離 懸濁液 1mg/ml: 約 5 μ m 細胞内: 約 1~3 μ m)などの問題があったためと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアの密集が細胞の働きにどのような影響をもたらすか調べるために、ミトコンドリアの密集がミトコンドリアの ATP 合成と ROS の発生に及ぼす影響を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア膜電位の計測

密集の膜電位差への影響を調べるためにミトコンドリアを Glass base Dish に吸着させ、膜電位感受性蛍光色素(TMRE)で染色し、蛍光顕微鏡を用いて個々のミトコンドリアの膜電位差に由来する蛍光をガウス関数でフィッティングし、強度を求めた。

(2) ATP 合成速度の計測

ATP 合成への影響を調べるために様々な密度でミトコンドリアをポリスチレンディッシュに吸着させ、その上清を採取した。上清に含まれる ATP 量をルシフェリンルシフェラーゼ法により計測し、ミトコンドリア1つ当たりの ATP 合成速度を調べた。

(3) ROS 合成速度の計測

ROS 合成への影響を調べるために2)と同様にミトコンドリアを吸着させたディッシュで上清の ROS 量を市販のキットを用いて計測し、ミトコンドリア1つ当たりの ROS 合成速度を調べた。

(4) コンピューターシミュレーション

呼吸速度と ATP 合成速度の差に基づいて、ミトコンドリアの周囲にプロトン濃度勾配が形成されるかどうか、シミュレーションを行い検討した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア膜電位の計測結果

ミトコンドリア間の距離調べ、近距離に他のミトコンドリアが存在する場合 (Short) と存在しない場合(Long)で、ミトコンドリアの膜電位を比較した。その結果、近距離にミトコンドリアがある場合のほうが、ミトコンドリアが大きく分極していた (Fig.1)。

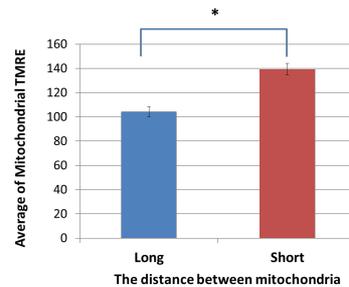


Fig.1 ミトコンドリアの密集と膜電位差

(2) ATP 合成速度の計測結果

ミトコンドリアを高密度でディッシュに吸着させた場合と、低密度で吸着させた場合とで、上清に含まれる ATP 量を計測すると、高密度で吸着させた場合のほうが、ATP 合成速度は高い値を示した。この効果は、インキュベーション中の攪拌や懸濁液における計測により消失した。一方、膜電位に依存した ATP 合成の阻害剤 (オリゴマイシン) の存在下では、低密度で吸着させた場合のほうが、高い値を示した。

(3) ROS 合成速度の計測結果

ミトコンドリアを高密度でディッシュに吸着させた場合と、低密度で吸着させた場合とで、ミトコンドリア1個当たりの ROS 合成速度を比較した。その結果、高密度で吸着させた場合のほうが、ROS 合成速度は低い値を示した。また、電子伝達系複合体の阻害剤 (Antimycin A) の存在下では、この効果は見られなくなった。

(4) シミュレーションの結果

ミトコンドリアの密集状態では、ミトコンドリアがくみ上げたプロトンのうち、ごくわずかがミトコンドリア内部に戻らないだけで、周囲と内部との間に有意のプロトン濃度勾配が形成されることが、コンピューターシミュレーションにより示された。

以上の結果をまとめると以下のようなになる。本結果は、ミトコンドリアは密集することで分極しやすくなり、ATP 合成速度を上昇させ、ROS 産生を減少させる。さらに、インキュベーション中の攪拌や懸濁液における計測から、周囲のイオン環境の変化やミトコンドリア間の距離が十分近いことが ATP 合成速度の上昇に重要である。これらのことは、ミトコンドリアが密集すると電子伝達系により汲み上げたプロトンやイオンを周囲と共有することができるため、プロトン駆動力の増大による ATP 合成の効率化や、1つ

のミトコンドリアが負担するプロトン汲み上げ量を減少させ、内部のアルカリ化を抑えたことによる ROS 産生の減少が起きたと考えることで説明できる。

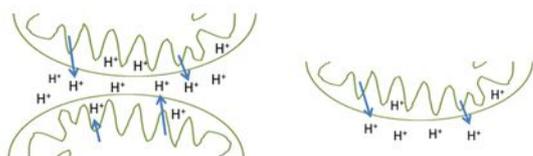


Fig.2 ミトコンドリアの密集効果

ミトコンドリアの ATP 合成の仕組みは化学浸透共役と呼ばれ、多くの生物に共通する機構である。本研究から、ミトコンドリア以外の化学浸透共役を有する生物、器官においても密集によるエネルギーの効率的利用が考えられる。更にはこの仕組みを利用した物質生産システムを作れば、密集させることで高い効率で物質生産を行うことが出来るかもしれない。

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)

Shi X, Osaki H, Matsunomoto Y, Fujita C, Shinohe D, Ashida N, Choi H, Ohta Y, "Partial contribution of mitochondrial permeability transition to t-butyl hydroperoxide-induced cell death" *Biochem. Biophys. Reports* 査読有, 7, 2016, pp.33-38

DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.05.005

柴田貴弘、山下紗季、加藤薫、太田善浩、ダメージの少ないミトコンドリア単離法、*生物物理* 査読有、56, 2016, pp112-115
DOI: 10.2142/biophys.56.112

Li Y, Honda S, Iwami K, Ohta Y, Umeda N, "Analysis of mitochondrial mechanical dynamics using a confocal fluorescence microscope with a bent optical fibre" *J. Microsc.* 査読有、260, 2015, pp.140-151,
DOI: 10.1111/jmi.12277

Shibata T, Yamashita S, Hirusaki K, Katoh K, Ohta Y, "Isolation of mitochondria by gentle cell membrane disruption, and their subsequent characterization", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 2015, 463, pp.563-568.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.095

Haseda K, Kanematsu K, Noguchi K, Saito H, Umeda N, Ohta Y, "Significant Correlation between Refractive Index and Activity of Mitochondria: Single Mitochondrion Study" *Biomed. Opt. Express* 査読有, 2015, 6, pp.859-869,
DOI: 10.1364/BOE.6.000859

DOI: 10.1364/BOE.6.000859

Sohya S, Kamioka T, Fujita C, Maki T, Ohta Y, Kuroda Y., "Biochemical and Biophysical Characterization of an Unexpected Bacteriolytic Activity of VanX, a Member of the Vancomycin-resistance vanA Gene Cluster." , *J Biol Chem.* 査読有, 2014, 289, pp.35686-35694,
DOI: 10.1074/jbc.M114.590265

Morikawa D, Kanematsu K, Shibata T, Haseda K, Umeda N, and Ohta Y, "Detection of swelling of single isolated mitochondrion with optical microscopy" , *Biomed. Opt. Express* 査読有, 2014, 5, pp.848-857,
DOI: 10.1364/BOE.5.000848

Yamada R, Takeshita T, Hiraizumi M, Shinohe D, Ohta Y, and Sakurai K, "Fluorescent analog of OSW-1 and its cellular localization" , *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 2014, 24, pp.1839-1842,
DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.02.009

[学会発表](計 22 件)

杉本 雄生、太田 善浩、細胞の非突起領域におけるミトコンドリア移動の画像解析、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016 年 3 月 10 日、桐生地域地場産業振興センター(群馬)

矢野口 聡、太田 善浩、ミトコンドリアの密集が活性に及ぼす影響の単一ミトコンドリア計測、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016 年 3 月 10 日、桐生地域地場産業振興センター(群馬)

倉岡 遊正、小野 島匠、太田 善浩、単離ミトコンドリアによる H2O2 発生の計測、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016 年 3 月 10 日、桐生地域地場産業振興センター(群馬)

柴田貴弘、山下紗季、加藤薫、太田善浩、穏やかな細胞膜損傷により単離したミトコンドリアの特性評価、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫)

柴田貴弘、山下紗季、加藤薫、太田善浩、インタクトなミトコンドリアは単離できるか?、第 15 回日本ミトコンドリア学会年会、2015 年 11 月 20 日、福井県国際交流会館(福井県福井市)

柴田貴弘、山下紗季、加藤薫、太田善浩、超解像光学顕微鏡によるミトコンドリア単離法の検討、日本バイオイメージング学会第 24 回学術集会、2015 年 10 月 2 日、東京理科学大・葛飾キャンパス

Yamashita S, Shibata T, Hirusaki K, Katoh K, Ohta Y, "Single mitochondrion imaging of ATP concentration changes

in the matrix." 第 5 3 回日本生物物理学会年会, 2015/09/13, 金沢大学・角間キャンパス (石川)

Shibata T, Yamashita S, Hirusaki K, Katoh K, Ohta Y, "Super-resolution Imaging of Isolated Mitochondria with Structured Illumination Microscopy." 第 5 3 回日本生物物理学会年会, 2015/09/15, 金沢大学・角間キャンパス (石川)

山下 紗季、蛭崎 琴絵、太田善浩、単離ミトコンドリア内の Mito-GO ATeam 計測、第 4 回日本生物物理学会関東支部会、2015 年 3 月 10 日、日本大学 文理学部 (東京)

柴田貴弘、山根理絵、加藤 薫、太田善浩、ダメージの少ないミトコンドリア単離法の検討、第 4 回日本生物物理学会関東支部会、2015 年 3 月 10 日、日本大学 文理学部 (東京)

小林明日香、中里眸、四戸大介、大崎光、藤田智沙子、田中康太郎、中島華、太田善浩、シクロフィリン D による酸化ストレス誘導機構、第 4 回日本生物物理学会関東支部会、2015 年 3 月 10 日、日本大学 文理学部 (東京)

小林明日香、太田善浩、Cyclophilin D が calcein-AM によるミトコンドリアの染色に及ぼす影響、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014 年 12 月 4 日、九州大学 百年講堂 (福岡)

蛭崎琴絵、太田善浩、細胞分裂時のエネルギー状態のモニタリング、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館 (京都)

Umiuchi K, Ohta Y, "ROS-independent transient depolarization of mitochondria in cells", 第 52 回日本生物物理学会年会, Sep 27, 2014, 札幌コンベンションセンター (札幌)

Shibata T, Yamane R, Katoh K, Ohta Y, "New approach to isolation of less damaged mitochondria" 第 52 回日本生物物理学会年会, Sep 27, 2014, 札幌コンベンションセンター (札幌)

杉本雄生、太田善浩 "細胞内ミトコンドリア移動の評価法の開発", 第 3 回日本生物物理学会関東支部会、2014 年 3 月 7 日、明治大学中野キャンパス (東京)

柴田貴弘、太田善浩、"ミトコンドリア新規単離法の検討" 第 3 回日本生物物理学会関東支部会、2014 年 3 月 7 日、明治大学中野キャンパス (東京)

Hirusaki K, Ohta Y, Monitoring of energy state of cells during cell division, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/30, 国立京都国際会館 (京都)

Shinohe D, Kobayashi A, Nakazato H, Nagai A, Ohta Y, Effects of cyclophilin

D on mitochondria, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/30, 国立京都国際会館 (京都)

Yoshimatsu D, Ohta Y, Effects of mitochondrial crowding on their activity, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/29, 国立京都国際会館 (京都)

① Umiuchi K, Ohta Y, Observation and induction of mitochondrial transient depolarizations in cells, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/29, 国立京都国際会館 (京都)

② 中里眸、四戸大介、小林明日香、永井亜紀子、太田善浩、C 6 細胞のエネルギー代謝に及ぼす cyclophilin D の影響、大 86 回日本生化学会大会、2013/09/13、パシフィコ横浜 (横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~ohta/index.html>

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

高橋 卓也 (TAKAHASHI, Takuya)

立命館大学・生命科学部 教授

研究者番号：70262102

(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