

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22509

研究課題名(和文) in situで細胞内局所のオルガネラ機能を解析する方法の開発

研究課題名(英文) development of a method to analyze local organelle function in situ

研究代表者

松岡 達(Matsuoka, Satoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00263096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞のミトコンドリア膜電位を直接測定する方法はない。本研究は、ミトコンドリア膜電位を直接測定できる微小電極法の開発を目的とした。測定機器の改良、ガラス電極の選定、電極作成装置の調整、ミトコンドリア染色蛍光色素の選定を行った後に、心筋細胞へ微小電極を刺入し、ミトコンドリア膜電位の測定を試みたが、ミトコンドリア膜電位に相当する大きな膜電位降下は測定できなかった。原因として、微小電極によるミトコンドリア損傷、または微小電極がミトコンドリア内・外膜を通過できなかったことが考えられた。より大きなミトコンドリアが存在する細胞を用いることで、生細胞のミトコンドリア膜電位の直接測定は可能と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア膜電位の直接測定を可能にするために行った測定機器の改良、ガラス電極の選定、電極作成装置の調整、ミトコンドリア染色蛍光色素の選定等の情報は、今後の展開への貴重な資料となる。また、より大きなミトコンドリアを有する細胞を用いることで、生細胞のミトコンドリア膜電位の直接測定は可能であるとの見通しが立った点は意義がある。

研究成果の概要(英文)：There is no way to measure directly mitochondrial membrane potential in living cells. We aimed to develop a new micropipette method to measure directly mitochondrial membrane potential. After the improvement of experimental equipment, selection of proper glass capillary, adjustment of puller and selection of proper mitochondria-specific fluorescence dye, we tried direct measurement of mitochondrial membrane potential in living cardiomyocytes with microelectrodes. However, a large negative membrane potential corresponding to mitochondrial membrane potential could not be detected. The possible reasons are damage and depolarization of mitochondria by the microelectrodes, or non-penetration of microelectrodes through mitochondrial inner/outer membrane. It seems, however, possible to measure directly mitochondrial membrane potential with cells having giant mitochondria.

研究分野：生理学

キーワード：ミトコンドリア 膜電位 微小電極

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア膜電位は電子伝達系や細胞質・ミトコンドリア内イオン濃度によって変化し、ATP 合成、活性酸素種の産生、アポトーシスなどの生理機能と深く関わる。また、小胞体やリソソームの膜電位については明らかになっていない。オルガネラ膜電位の定量的評価はこれまででは困難であった。すなわち、単離したオルガネラを用いた古典的な研究手法では intact な細胞内環境を保てず、細胞内の位置情報も失ってしまう。蛍光色素・蛍光タンパクを用いたイメージング解析では膜電位の絶対値の議論が難しいという問題がある。

2. 研究の目的

本研究では独自の電気生理学的手法と細胞イメージング技術を融合・発展させ、in situ でミトコンドリアなどのオルガネラ膜電位を測定できる微細微小電極法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)測定機器の改良

振動を防ぐために実験装置の改良を行った。

(2) ガラス電極の選定と電極作成装置の調整

微小電極作成に適したガラス管の選定と電極作成装置の調整を行った。

(3)ミトコンドリア染色蛍光色素の選定

退色が少ないミトコンドリア染色蛍光色素の選定を行った。

(4)微小電極を用いたミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア密度が心室筋細胞よりも低く、一つ一つのミトコンドリアの同定が可能であるマウス心房筋由来培養細胞 HL-1 とマウス洞房結節細胞を用いて、微小電極刺入によるミトコンドリア膜電位の測定を試みた。

4. 研究成果

(1)測定系の改良

この測定系の開発には、細胞内の極めて限局した領域に、微小電極を振動なく配置できることが絶対条件となる。そのために、従来使用していた電気生理用の蛍光顕微鏡実験セット(除振台+倒立顕微鏡+EMCCD カメラ+微動マニピュレータ)に外部からコード等を伝わって来る振動を減少させるように、クッション等で防振処置を施した。また、マイクロマニピュレータのドリフトがわずかではあるが発生していたので、ドリフトのないマイクロマニピュレータと交換した。これによって、100 倍の対物レンズで観察しても、微小電極先端の明らかな振動は観察されなくなった。

(2)ガラス電極の選定

種々の材質、内径、外径のガラス管を用いて微小電極を作成した。その結果、ある種のガラス管が一番適切であると結論した。また、電極作成装置(プラー)についても、現有する機器を用いて多くのセッティングを試行し、至適な条件を確立した。

(2)ミトコンドリア同定のためのミトコンドリア染色蛍光色素の選定

ミトコンドリアは肉眼では同定できないため、蛍光色素で染色する必要がある。100 倍という高倍率の対物レンズを用いて、一個のミトコンドリアからの微弱蛍光を観察するために、高感度 EMCCD カメラを使用した。

また、微小電極を操作してミトコンドリア近傍に配置する間(5 ~ 8 分程度)に退色しない色素を選定する必要がある。コラゲナーゼ処理によって単離したマウス心室筋細胞を用いて、5 分間程度の連続蛍光撮影で、退色なくミトコンドリアを観察できる蛍光色素の選定を行った。ミトコンドリア膜電位感受性色素、特に TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester)は、数分で退色が起こり使用には適さなかった。色素のミトコンドリア保持性が高いといわれる TMRM(tetramethylrhodamine, methyl ester)は比較的長く蛍光を保持できた。また、TMRE で測定した時以上に心筋細胞内での色素輝度(ミトコンドリア膜電位)に不均一性があることがわかった。また、MT-1 も試したが、ミトコンドリア脱共役剤 FCCP に対する反応が二相性になり、使用に当たっては注意が必要と考えられた。膜電位非依存性の選択的ミトコンドリア色素である MitoTracker Green(ThermoFisher)を用いてミトコンドリアを標識したところ、マニピュレータ操作の間に著明な退色は見られなかった。長時間のミトコンドリア蛍光観察には MitoTracker Green が適していると判断し、これを用いることとした。

(3)微小電極を用いたミトコンドリア膜電位の測定(図1)

汎用型のマイクロピペット作成装置または自重落下とマグネット双方の力を利用した縦引き型マイクロピペット作成装置を用いて、芯入りのガラス管から微小電極(先端直径 < 1 μm)を

作成した。後者の方がより先端径が小さい電極が作成された。電極内液は1 mol/L KCl 液、細胞外液は電極刺入時の細胞収縮を防ぐために無 Ca^{2+} Tyrode 液とした。

HL-1 細胞の場合、細胞膜が柔らかいためか、電極を細胞内に刺入することがやや困難であったが、洞房結節細胞では比較的成功的に（刺入は膜電位変化で確認）。しかし、ミトコンドリア近傍まで微小電極を移動しても、ミトコンドリア膜電位に相当する大きな膜電位降下は測定できなかった。原因として、微小電極によるミトコンドリア損傷による膜電位の脱分極、もしくは微小電極がミトコンドリア内・外膜を通過できなかったことが考えられた。

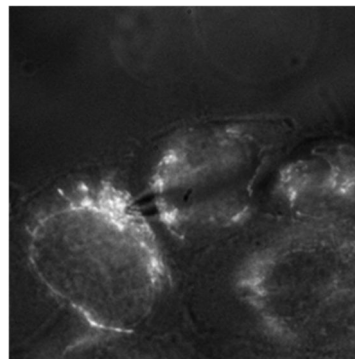


図1. MitoTracker Greenでミトコンドリアを標識したHL-1細胞と微小電極

(4)考察と今後の展望

現段階よりも先端系の小さい微小電極を作成することはかなり困難と考えられる。そのため、より大きなミトコンドリアが存在する細胞を探ることが必要である。ショウジョウバエ精子、骨髄マクロファージ、ヒト非アルコール性脂肪肝患者の肝細胞には巨大なミトコンドリアが存在することが知られている。このような大きなミトコンドリアを持つ細胞を用いて、ミトコンドリア膜電位測定を継続して挑戦する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeda Yukari, Matsuoka Satoshi	4. 巻 164
2. 論文標題 Impact of mitochondria on local calcium release in murine sinoatrial nodal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 42 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Ayako, Matsuoka Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Physiological and Pathophysiological Roles of Mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ Exchanger, NCLX, in Hearts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1876 ~ 1876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11121876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Ayako, Matsuoka Satoshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Minor contribution of NCX to Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange activity in brain mitochondria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102386 ~ 102386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2021.102386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Islam Mohammed M., Takeuchi Ayako, Matsuoka Satoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Membrane current evoked by mitochondrial Na ⁺ ?Ca ²⁺ exchange in mouse heart	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00752-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Ayako, Matsuoka Satoshi	4. 巻 598
2. 論文標題 Integration of mitochondrial energetics in heart with mathematical modelling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1443 ~ 1457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP276817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Ayako, Kim Bongju, Matsuoka Satoshi	4. 巻 85
2. 論文標題 Physiological functions of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchanger, NCLX, in lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2019.102114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Takao Shimayoshi and Ayako Takeuchi
2. 発表標題 A simulation analysis of Na ⁺ and Ca ²⁺ dynamics in cardiomyocyte during ischemia and reperfusion. A simulation study of cardiac ischemia and reperfusion
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Takao Shimayoshi and Ayako Takeuchi
2. 発表標題 A simulation study of cardiac ischemia and reperfusion
3. 学会等名 2021 Cardiac Physiome Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Contributions of NCLX and NCX to mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse brain
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Mohammed Moinul Islam, Ayako Takeuchi
2. 発表標題 Membrane current evoked by mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart
3. 学会等名 第11回入澤宏・彩記念 JPS心臓・循環論文賞（入澤記念循環賞）受賞講演 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Impact of mitochondria on local calcium release in murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Spatial and functional associations of mitochondria and local calcium release in murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 NIPS International Workshop 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田有加里、松岡達
2. 発表標題 マウス洞房結節細胞における local Ca ²⁺ release とミトコンドリアの関係
3. 学会等名 第67回 中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mohammed Moinul Islam, Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Electrophysiological measurement of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart
3. 学会等名 64th Biophysical meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Mohammed M. Islam, Yukari Takeda, Ayako Takeuchi
2. 発表標題 Property and roles of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in heart
3. 学会等名 50th NIPS international symposium 「MIRACLES」 In Cardiovascular Physiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Mohammed Moinul Islam, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Characteristics of Ca ²⁺ efflux from mitochondria
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mohammed Moinul Islam、 竹内綾子、 松岡達
2. 発表標題 Electrogenicity of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in mouse heart
3. 学会等名 第66回中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Integrative and Systems Physiology http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/ 統合生理学（生理学2） https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/integrative/ Department of Integrative and Systems Physiology http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/index.html
--

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	竹内 綾子 (Takeuchi Ayako) (00378704)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	

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
---------	---------