

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560335

研究課題名(和文)筋細胞内酸素環境に対するミトコンドリア挙動の可視化

研究課題名(英文)Visualization of mitochondrial behavior for oxygen environment in myocytes

研究代表者

狩野 豊 (Kano, Yutaka)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・教授

研究者番号：90293133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内の酸素レベルによって、ミトコンドリアがどのような挙動を示すのかについて、生体内(in vivo)で直接観察するイメージングモデルの構築を目的として実施した。このモデルでは、低酸素時には酸素が供給されやすい毛細血管の近傍に移動するなど、ミトコンドリアが酸素センサー機能を有しているかどうかについての解明が期待できる。本研究では、in vivo環境下でのミトコンドリアイメージングに成功した。その一方、ミトコンドリア挙動を評価するための蛍光タンパク質を用いたミトコンドリア標識についてはモデルを構築できなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was construction of in vivo bio-imaging model to examine the relationship between intracellular oxygen level and mitochondrial behavior. This study focused on the possibility that the mitochondria move to capillary around for oxygen uptake at hypoxia. In this study, we were not able to build it about the mitochondrial labelling using the fluorescence protein to evaluate mitochondrial movement although a mitochondrial imaging under the in vivo environment was successful.

研究分野：運動生理学

キーワード：バイオイメージング 骨格筋 in vivo

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は身体活動量の変化に応じて、エネルギー供給量を調節する。ミトコンドリアは酸素を利用したエネルギー産生の役割を担っている。これまで、細胞内の酸素レベルを感知する機構は不明である。酸素は、毛細血管から拡散によって細胞膜を通り、筋細胞質内へ入り込む。その受け手となるミトコンドリアには、融合や分裂という増殖機能が備わっている。しかしながら、細胞内の酸素環境に応じた振る舞い（細胞内の移動、センサー機構の有無）は明らかにされていない。

様々な筋細胞適応の機構を考える上で筋細胞の酸素レベルを感知するセンサー機構の解明が待たれている。ミトコンドリアは、酸素を利用する唯一のオルガネラであり、酸素センサーとしての役割を担っていると予想される。多くの生命活動に必須の機能を有しているミトコンドリア機能解明に向けて、酸素レベルに応じたミトコンドリアの振る舞いが明らかになることは、ミトコンドリア研究への大きな提言を与えることが予想される。

骨格筋細胞は収縮タンパクで敷き詰められ、細胞膜直下に核やミトコンドリアなどのオルガネラの多くが位置しているという形態学的な特徴を持っている。これらの教科書的な理解は、電子顕微鏡を用いた観察結果によるものである。骨格筋細胞において、オルガネラの細胞内移動は起こらないということが定説であり、低酸素などの細胞内環境変化によって、ミトコンドリアが細胞内を移動することなどは考えられていない。研究代表者も自身の研究によって、電子顕微鏡下でのミトコンドリアの大部分が毛細血管の近傍に位置していることを報告している。ところが、近年のバイオイメーjing技法の進展によって、生きたままの細胞を高解像度で観察できるようになってきた。研究代表者らは、ラットを用いた *in vivo* バイオイメーjingモデルによって筋収縮中のイオン動態を細胞レベルで観察することに成功している (*Sonobe et al. Am J Physiol, 2008, 2010*)。これらの実験結果は、筋細胞内の物質移動を示しており、オルガネラも流動性を有している可能性を示唆するものであった。また、細胞を固定

して切片を作成する従来の形態学的な手法は、細胞を摘出してから固定するまでの過程において、細胞内は極度の低酸素状態に置かれる。したがって、酸素環境が保たれている生きた細胞のミトコンドリア局在を証明するものではない。

培養細胞では、ミトコンドリアに蛍光色素や蛍光タンパクを導入することによってミトコンドリアを観察する技法が確立されており、ミトコンドリアが融合と分裂を繰り返している様子が観察されている。このような融合分裂のサイクルと細胞の機能との関連が、最近になって研究されはじめたところである。現在まで、哺乳動物の生体内において、骨格筋細胞中のミトコンドリアを *in vivo* 観察する手法は確立されていない。申請者らは、上述したような *in vivo* バイオイメーjingモデルを手がかりとして、生きたままの動物において、骨格筋細胞のミトコンドリアを観察することに挑戦し、細胞内酸素レベルを変化させた場合のミトコンドリア挙動について明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内で酸素を直接的に利用する「ミトコンドリア」に焦点を当てた。細胞内の酸素レベルによって、ミトコンドリアがどのような挙動を示すのかについて、生体内 (*in vivo*) で直接観察するイメージjingモデルの構築を目的とした。そして、上述したように、ミトコンドリアが低酸素時には酸素が供給されやすい毛細血管の近傍に移動するなど、ミトコンドリアが酸素センサー機能を有しているかどうかについて明らかにするモデルの構築を試みた。

3. 研究の方法

実験 1.

Wistar 系ラットを用いて、麻酔下において露出した脊柱僧帽筋にミトコンドリア蛍光指示薬である Mito-ID Green を負荷し、蛍光顕微鏡 (490nm, 530nm) により筋線維の蛍光強度、筋線維幅を算出した。また、脊柱僧帽筋の凍結組織から横断切片を作成し、コハク酸脱水素酵素染色 (SDH 染色) を行った。SDH 染色強度と筋線維横断像の最短径を算出し、*in vivo* 観察で得られたデータと比較した。さら

に、組織化学的にミオシン重鎖(slow type)の染色を行い、染色強度と筋線維サイズとの関係を明らかにした。これらの定量値より、ミトコンドリア含量、筋線維サイズ、ミオシン重鎖タイプのそれぞれの関係について検討した。

実験 2.

申請者らの考案した *in vivo* バイオイメージングモデル (Sonobe et al. *Am J Physiol*, 2008, 2010) を用いて、Kaede (医学生物学研究所) 由来の蛍光画像が取得できるかどうかを確認した。Kaede は紫外光照射によって緑から赤に色が変化する蛍光タンパク質として 2002 年に理化学研究所で開発され、細胞やオルガネラをマーキングする手法として注目されている。

はじめに、ミトコンドリアへの導入を図るため、チトクローム C サブユニット VIII のミトコンドリアターゲティングシグナル配列を用いて、Kaede の N 末端側に配置したプラスミドベクターを作成した。これを筋へマイクロインジェクションした。その後、数時間から数日後に *in vivo* 環境下にて Kaede のミトコンドリア局在を確認した。

続いて、Kaede 蛍光タンパクを導入した筋線維への紫外光照射によって、色調の変化を確認した。

実験 3.

筋細胞の酸素環境を評価するモデルを作成した。これは、*in vivo* 酸素クエンチング法を用いた (Kano et al. *Am J Physiol*, 2011, Koga and Kano et al. *J Appl Physiol*, 2012)。動静脈を閉塞することによる虚血モデル、ならびに電気刺激による筋収縮モデルによって、低酸素レベルを検討した。

4. 研究成果

実験 1 により、組織化学的手法による SDH 活性と筋線維サイズとの間に有意な相関関係が認められた。同様に、*in vivo* イメージング技法においても筋線維サイズとミトコンドリア含量との間に有意な相関関係が認められた。これらの結果は、*in vivo* 条件でのミトコンドリアの定量化の妥当性を示唆している。一方、組織化学手法によるミオシン重鎖 (slow type) と筋線維サイズとの関係

には有意な相関関係は認められなかった。このことから、*in vivo* 条件で筋の収縮特性に着目して筋線維の分類を行うときには、必ずしもミトコンドリア含量を判断の基準として用いることは妥当ではなく、別の手法の検討が必要であると考えられる。本研究のラット *in vivo* モデルにおいて、ミトコンドリア分布の評価が可能であることが示唆された。しかしながら、このミトコンドリア定量値はミオシン重鎖タイプを必ずしも反映するものではないことが示された。

実験 2 により、Kaede 蛍光タンパクのミトコンドリア局在を確認した。しかしながら、Kaede 蛍光タンパクを導入した筋線維に対して、紫外光の強度、時間など様々な条件によって検証したものの、kaede 蛍光タンパクによるミトコンドリアのマーキングには至らなかった。今後、観察可能な実験条件を見いだすことが必要である。

実験 3 により、動脈閉塞モデルによる筋細胞の酸素化レベルを定量することに成功した。図 1 は安静時ならびに筋収縮 (1H, 単収縮) 時の酸素分圧動態を示している。今後、酸素分圧とミトコンドリアイメージングとの同時計測が、ミトコンドリア機能の解明に重要な観察法として期待される。

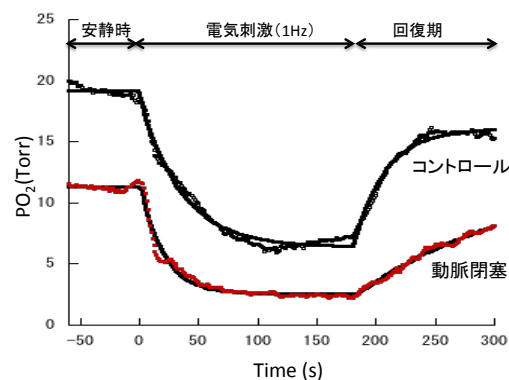


図 1. 安静時と筋収縮時の筋組織中の酸素分圧動態。動脈閉塞モデルとの比較。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hiroaki Eshima, David C Poole, Yutaka Kano. *In vivo* Ca^{2+} buffering capacity and microvascular oxygen pressures

- following muscle contractions in diabetic rat skeletal muscles: fiber-type specific effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 May 6:ajpregu.00044.2015. doi: 10.1152/ajpregu.00044.2015. (査読有)
2. Hiroaki Eshima, David C Poole, Yutaka Kano. In vivo calcium regulation in diabetic skeletal muscle. *Cell Calcium*. 2014 Nov;56(5):381-9. doi: 10.1016/j.ceca.2014.08.008. (査読有)
 3. Yutaka Kano, Shinji Miura, Hiroaki Eshima, Osamu Ezaki and David C. Poole. The effects of PGC-1 α on control of microvascular P(O₂) kinetics following onset of muscle contractions. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Jul 15;117(2):163-70. doi: 10.1152/jappphysiol.00080.2014. Epub 2014 May 15. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 山越 康平, 柳下 和慶, 土持 裕胤, 稲垣 薫克, 白井 幹康, 狩野 豊. 高気圧酸素曝露に対する糖尿病の循環調節機構. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 長崎市 (2014, 9, 19).
2. 江島弘晃, 狩野 豊. 糖尿病骨格筋の筋線維タイプが細胞内 Ca²⁺恒常性に及ぼす影響. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 長崎市 (2014, 9, 19).
3. 石黒知定, 江島弘晃, 狩野 豊. ラット骨格筋の細胞内カルシウムイオンと熱ストレス. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 長崎市 (2014, 9, 19).
4. 田中嘉法, 狩野 豊. 膜輸送体による細胞内 pH 制御と筋疲労の関係性. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 長崎市 (2014, 9, 19).
5. 脇坂万里雄, 田中 嘉法, 江島 弘晃, 狩

野 豊. I 型糖尿病がラット脊柱僧帽筋の形態および代謝的特性に及ぼす影響. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 長崎市 (2014, 9, 19).

6. Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, David C. Poole, and Yutaka Kano. Contribution of membrane transporters on H⁺ buffering capacity in the rats skeletal muscle in vivo. *Medicine and Science in Sports and Exercise* Volume: 46 Issue: 5 Pages: 197. Orlando, USA, 61st Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (2014, 5, 28).
7. Ishiguro Tomosada, Hiroaki Eshima, David C. Poole, and Yutaka Kano. Heat Stress Impairs Intracellular Calcium Homeostasis In Rat Skeletal Muscle In Vivo. *Medicine and Science in Sports and Exercise* Volume: 46 Issue: 5 Pages: 187-188. Published: MAY 2014, Orlando, USA, 61st Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (2014, 5, 28).
8. Kohhei Yamakoshi, Kazuyoshi Yagishita, David C. Poole, and Yutaka Kano. Rat Skeletal Muscle Microvascular Oxygen Partial Pressure During Hyperbaric Oxygen Versus Air. *Medicine and Science in Sports and Exercise* Volume: 46 Issue: 5 Pages: 188. Published: MAY 2014, Orlando, USA, 61st Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (2014, 5, 28).

[その他] ホームページ

<http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 豊 (KANO, Yutaka)

電気通信大学情報理工学研究所・教授

研究者番号 : 90293133