

ミトコンドリア活性評価のための膜電位観測と 2 光子吸収 pH 測定 Membrane Potential Observation and Two-photon Absorption pH Measurement for Mitochondrial Activity Evaluation

農工大院工 ○金指 康明, 野村 雄一, 李 永波, 吉松 大輝, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘
Tokyo Univ. of Agri. & Tech. ○Yasuaki Kanazashi, Yuichi Nomura, Yongbo Li, Daiki Yoshimatsu,

Kentaro Iwami, Yoshihiro Ohta, Norihiro Umeda

E-mail: 50012833004@st.tuat.ac.jp

1 序論

アデノシン三リン酸 (ATP) の枯渇は多くの疾病の原因になると考えられており, ATP の合成を行っているミトコンドリアに強い関心が持たれている [1]. ATP の合成はミトコンドリアの活性を観測することで評価でき, 集団ミトコンドリアの活性は膜電位や pH を測定することで評価されている. さらに, 単体のミトコンドリアの活性をその近傍において観測することができれば, ミトコンドリア同士が及ぼしあう影響を知ることができ, ミトコンドリアに起因する多くの疾病の解明に役立つことと考えられる. しかしながら, それらのミトコンドリア近傍の局所領域での測定や単体での活性を評価する方法は未だ確立されていない. そこで本研究では走査型近接場顕微鏡 (SNOM) を基にした蛍光レシオ近接場顕微鏡を開発し, 膜電位の観測によってミトコンドリアの状態を確認した後, その近傍における局所領域での pH を測定することでミトコンドリアの活性を評価した.

2 実験方法及び結果

2.1 生ミトコンドリアの選択

活性観測を行う前に, 生ミトコンドリアを選択することで観測対象を決定した. まず, ブタの心筋細胞から単離したミトコンドリアを 1.0 mg/ml の濃度でディッシュに貼り付け, 膜電位感受性色素 TMRE (20 nM) を溶かした色素溶液を 10 分間インキュベートした. その後, 波長 532 nm の YAG-SHG レーザーによって色素を励起し, 572 nm 干渉フィルタを通した上で冷却 CCD で蛍光を観測した. 冷却 CCD により撮影した画像を図 1 に示す. (a) は顕微鏡画像, (b) は蛍光画像である. 丸で囲った蛍光が観察できるミトコンドリアは活性が高いが, 四角で囲った蛍光が観察できないものは活性が低下している.

2.2 ミトコンドリアの活性観測

2.1 の方法で選択したミトコンドリアを用いて, その活性観測を行った. まず, pH 測定に影響することが考えられたため, ミトコンドリアに取り込まれた TMRE を洗い流した. 次に, pH 感受性蛍光色素 SNARF-4F (0.02 mM) の色素溶液を入れ, その後

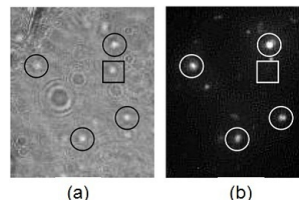


図 1 (a) Optical and (b) fluorescence micrograph of mitochondria (Circle: High-active mitochondrion, Square: Low-active mitochondrion)

ファイバースコープを観測対象となるミトコンドリアに近接した. そしてフェムト秒パルスレーザーをミトコンドリア近傍に集光させ, 測定開始 10 分後にミトコンドリアを活性化させるためにリンゴ酸・グルタミン酸混合溶液 (MG, 1 mM) をファイバースコープから 10 mm の位置に流し込み, 色素の蛍光強度比 (Fluorescent Intensity Ratio: FIR) の変化を観察した. その結果を図 2 示す. これから pH の変化は約 0.08 であることがわかり, これは先行研究 [2] で得られた同濃度のミトコンドリアの pH 変化量とほぼ等しい.

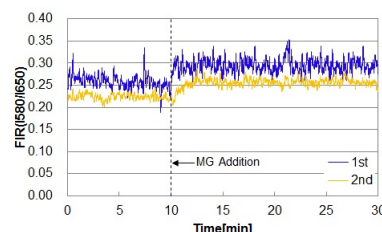


図 2 Response of mitochondrial activity

3 結論

TMRE を用いて生ミトコンドリアの選択ができた. さらに生ミトコンドリア表面のプロトン濃度勾配の時間変化を観測できれば, 本手法によってミトコンドリア活性を観測することができると考えられる. 今後は個々のミトコンドリアの外膜表面の pH 分布の計測を試みる.

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (基盤 (B) 22310078) の支援によって行われた.

参考文献

- [1] E. J. Griffiths, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 942(2) (2012) 249-267
- [2] Y. Kanazashi et. al. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51 (2012) 117001