

力印加共焦点光学顕微鏡によるミトコンドリア生理活性の力学応答測定

Measurement of mechanical response of mitochondrial bioactivity using

Force-applying Confocal Laser Scanning Microscopy

農工大 ○本田 諭志, 李 永波, 長崎 秀昭, 岩見 健太郎, 太田 善弘, 梅田 倫弘

Tokyo Univ. of Agri. & Tech., °S. Honda, Y. Li, H. Nagasaki, K. Iwami, Y. Ohta, and N. Umeda

E-mail: 50014643059@st.tuat.ac.jp

1. はじめに

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー代謝の中心的役割を担い、動的な挙動をすることで ATP 産生に関わっている^[1]. 中でも近年、細胞に作用する外力によってミトコンドリアの生理活性に影響を及ぼすということが示唆されている^[2]. しかし、そのメカニズムは解明されていない.

そこで本研究では、単一ミトコンドリア全体に力印加が可能で力印加共焦点光学顕微鏡 (F-CLSM) を構築し、単一ミトコンドリアへの機械刺激に対する生理活性応答を測定した. 本報では、その結果について報告する.

2. 測定原理

2.1 力印加共焦点光学顕微鏡 (F-CLSM)

本研究で用いた F-CLSM システムの装置図を Fig.1 に示す. ミトコンドリアに一樣に力を印加するのに、光ファイバーの先端 2~3 mm 部分を 90 度に曲げたベント光ファイバークラップ (BOF) を用いた. BOF の先端部分は、フッ酸によるメニスカスエッチングによって、直径が 4 μm の端面を形成した. BOF 端面をミトコンドリアに接触させ、押し込むとたわみが発生する. たわみ量は、BOF 上部に設置した BOF 静電容量変位センサー (NCDS) によって測定した. フックの法則により BOF のたわみ量から印加力を算出した.

単一ミトコンドリアの膜電位差は、蛍光色素による共焦点光学系を用いて測定した. 対物レンズ (NA=0.55) によって約 1 μm のレーザースポットが形成され、単一ミトコンドリアを観察することが可能である. ミトコンドリアを観察するためには、位置を特定する必要があるため、2 次元ピエゾステージを用いて、ミトコンドリア蛍光イメージングを行った.

2.2 ミトコンドリアサンプル及び蛍光染色

豚心筋から単離したミトコンドリアをセルタックによりガラスボトムディッシュ上に固定し、膜電位感受性色素 (TMRE, Molecular Probe) で染色した. TMRE は、内膜と外膜の膜電位差を蛍光強度として示す. ミトコンドリアの生理活性変化を制御するた

め、リンゴ酸・グルタミン酸 (MG) の混合栄養基質をミトコンドリアに添加した.

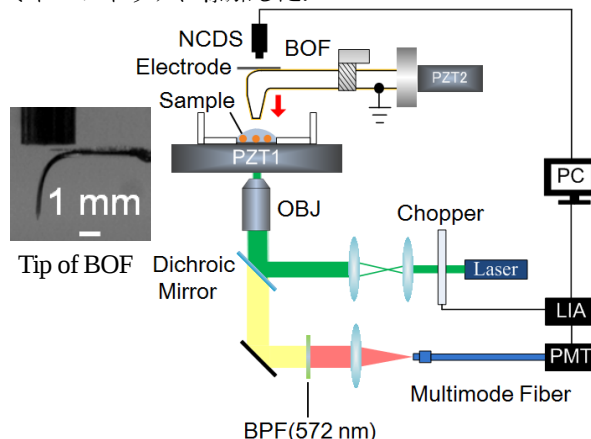


Fig. 1 Experimental setup of F-CLSM.

3. 結果

BOF によってミトコンドリアに力印加を行いながら、TMRE 蛍光強度変化を測定した結果を Fig. 2 に示す. およそ 5 分後に MG を滴下すると、ミトコンドリアの脱分極周期は 89.9 s であった (領域①). また、およそ 12 分で 30 nN の印加力を与えると、脱分極周期は 67.4 s と 25 % の短縮が見られた (領域②).

ミトコンドリアは ATP を産生する際に内膜外膜間でプロトンのやり取りを行う. 印加力を与えると蛍光の周期が短縮したことから、ミトコンドリアの ATP 産生能力が増大したことが示唆された.

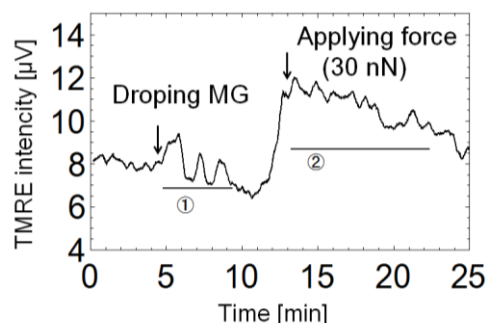


Fig. 2 Time-resolved TMRE fluorescence of single mitochondrion in response to addition of MG.

参考文献

- (1) Ayumu Sugiura, et al, Experimental Medicine, **30** (9), 1384-1389 (2012).
- (2) Yaron R. Silberberg, et al., J Mol. Recog., **21**, 30-36 (2008)