

物理ストレスを受けたミトコンドリアの 力印加共焦点光学顕微鏡による活性酸素応答測定

Measurement of Mitochondrial Reactive Oxygen Response under Physical Stress Using Force-applying Confocal Laser Scanning Microscopy

農工大工 ○本田 諭志, 李 永波, 上田 雅, 長崎 秀昭, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘

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

E-mail: umeda@cc.tuat.ac.jp

1. はじめに

ミトコンドリアは細胞のエネルギー源である ATP を産生する一方で、毒性物質である活性酸素(ROS: Reactive Oxygen Species)を産生する。その生物がいる体内では、様々な物理ストレスが働いている。特に、虚血再灌流障害の場合では、狭小化された血管への血流によって生じる細胞への物理ストレスが、ミトコンドリアの ROS 産生を促すことが示唆されている^[1]が、物理ストレスと ROS 産生の関係性は未だ不明である。

これに対して本研究では、ミトコンドリアの物理ストレスに対する ROS 応答を測定するため、力印加共焦点光学顕微鏡(F-CLSM)を構築し^[2]、単一ミトコンドリアへの機械刺激に対する ROS 応答測定を行った。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印加するため、先鋭化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スタンプ(BOF)を用いた。BOF 先端は、超音波カッターによってカットすることで直径が 3 μm 程度の端面を形成した。BOF 端面をミトコンドリアに接触させ、押し込む際に生じるたわみを静電容量式非接触変位計(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。

ミトコンドリアの ROS 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 1 μm のレーザースポットを形成し、単一ミトコンドリアの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 ROS による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

豚心筋細胞から単離したミトコンドリアを接着タンパク質であるセルタックによりガラスボトムディッシュ上に固定し、MitoSOX Red(Molecular Probes INC, 励起波長:532 nm, 蛍光波長:580 nm)で染色した。MitoSOX Red は、ミトコンドリア内部でスーパーオキシドによって酸化されると蛍光を発する色素である。

3. 結果

MitoSOX による蛍光信号を収集しながら、BOF によってミトコンドリアに機械刺激を印加した結果を Fig. 2 に示す。ピエゾステージによって BOF を移動させると、

領域 I ~ II でミトコンドリアは弾性変形を起こした。この領域で負荷された印加力は 40 nN であり、これに伴い蛍光強度が 60 % 増大した。領域 II ~ III はミトコンドリアの外膜が損傷し、ミトコンドリア内の蛍光分子が漏出したため蛍光強度が減少した。領域 III 以降では BOF にガラス基盤が接触し、ミトコンドリアが完全に破壊された。

以上から、本研究で構築した F-CLSM システムによって、物理ストレスを受けたミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの挙動を観察することができた。

4. おわりに

F-CLSM システムを用いて単一ミトコンドリアに印加力を与えながら ROS 応答を観察した。40 nN の印加力を加えると 蛍光強度が 60 % 増大したことから、ミトコンドリアは機械刺激によってスーパーオキシドを増大させることが明らかになった。

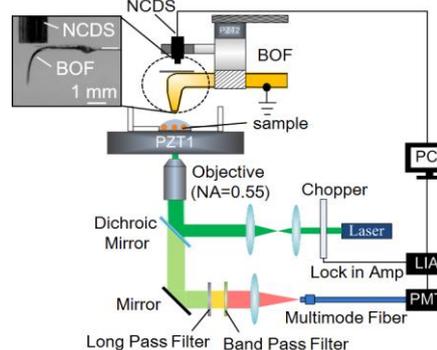


Fig. 1 Experimental setup of F-CLSM.

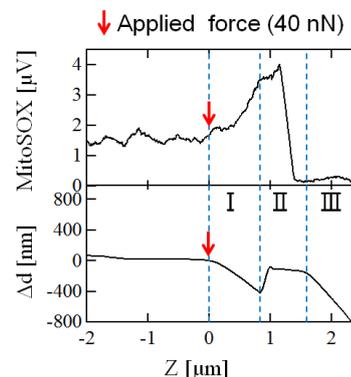


Fig. 2 Mitochondrial MitoSOX intensity changes and BOF deflection versus the displacement of piezo stage.

参考文献

- [1] Bernhard D, et al., *Eur J Trauma Emerg Surg*, 33,600-612 (2007)
- [2] Li Y., et. al. *Journal of Microscopy*, 260, 140-151 (2015)