3P221

弾性体接着基質上における心筋細胞の拍動リズムの変動

○甲田 直美、尾花山 和哉、原田 伊知郎、赤池 敏宏（東工大院・生命理工）

細胞が接着する足場である細胞外マトリクス (ECM) は、コラーゲン・フィブロネクチン・グリコサミノグリカン・ラミニンなど種々の物質から成り、生物体の構造の支持のみならず、分化・形態形成・成長・遺伝子発現・細胞の移動・増殖などのシグナル伝達に関与していることがわかっている。近年、ECM の構成成分の違いだけでなく、固さ等の物理的状態の違いに対しても、細胞が異なる応答を示すことが報告されている。筋芽細胞において、接着している基質の固さによりミオシン・アクチンによる sarcomere 形成に違いが出るという報告があり、特に収縮性の筋肉細胞である心筋細胞では、接着している足場の固さの違いが顕著に現れるのではないかと考えられる。心臓は、ATP のエネルギーを拍動により全身へ血液を送り出すという物理的な仕事に変えている器官であり、血液の圧力や流量などの機械的な情報を認識する分子機構が存在すると考えられる。また、細胞レベルでは接着基質を周期的に伸展させることによりアポトーシスが誘導されたり、細胞が一方に配列したりするなどの現象が報告されている。しかし、心臓の特に拍動リズムにおいて、細胞周辺の力学的環境に注目した報告はほとんどない。そこで、本研究では、弾性率を自在に変えることのできる接着基質を細胞周辺の力学的環境のモデルとして用いて、マウス初代培養心筋細胞の心筋細胞の拍動リズムへの影響について解析を行った。接着基質としては、ポリスチレンラテックスビーズを抱埋したアクリルアミドゲルを用いることで、ビーズの変位から拍動リズムと細胞牽引力の解析を行った。その結果心筋細胞の平均的な拍動リズムは足場の力学強度に大きく依存していなかったが、リズムの安定性について変化が見られたので、その詳細について報告する。

N.Koda, K.Obanayama, I Harada and T.Akaike : Fluctuation of inter-beat interval behavior of cardiac myocyte on the elastic substrate

3P223

単一ミトコンドリアにおける浸透圧変化の測定

太田 善浩、○森川 大輔（農工大院・工学教育部・生命）

【目的】

オルガネラはイオン・基質・代謝産物などを輸送して働いている。これらの輸送によりオルガネラ内部の浸透圧は変化し、結果としてオルガネラの体積（密度）が変化すると考えられる。本研究では、オルガネラの物質輸送を単一レベルで検出する技術の開発を目的として、単一ミトコンドリア内の密度変化の検出を試みた。

【方法】

豚心筋から単離しカバーガラスに吸着させたミトコンドリアの透過光画像を冷却 CCD カメラで撮影した。ミトコンドリアの体積が増大した場合、ミトコンドリア内の一定体積に含まれる物質の量が減少するはずなので、ミトコンドリア内の一定領域の透過光強度は、増加するはずである。そのため、密度変化を測定するためにミトコンドリア中央部分の微小領域の透過光強度を測定した。ミトコンドリアに高濃度の Ca^{2+} イオンを加えると体積が増大することが知られているので、体積変化は Ca^{2+} イオンにより誘導した。

【結果・考察】

200 μM の Ca^{2+} を添加することにより、一部のミトコンドリアで透過率の上昇が観察できた。透過率が上昇したミトコンドリアの多くは、 Ca^{2+} 添加後に速やかに透過率が上昇し、また、その透過率の上昇の程度は個々のミトコンドリアごとに異なった。また、透過率の時間経過を測定すると、透過率の上昇開始後約 5 ～ 20 分で変化が止まり、透過率の増加は約 20 分以内のイベントであることが分かった。透過率変化の時間経過では個々のミトコンドリアごとに個性が存在することが観察できた。当日は、ミトコンドリアに添加する Ca^{2+} 濃度と透過率の変化幅、透過率変化の速度との関係や、呼吸基質の輸送に伴う透過率変化を検出した結果について報告したい。

D.Morikawa and Y.Ohta : Measurements of density change in a single mitochondrion.

3P222

ミトコンドリアは密集により活性を変化させるか？

太田 善浩、○吉岡 久史（農工大院・工学教育部・生命）

【目的】本研究は、ミトコンドリアの密集が自身の活性にどのような影響を及ぼすか検討することを目的として行った。ミトコンドリアなどオルガネラは、イオンや物質の輸送を行うことで、自身の近傍にそれらの濃度勾配を作る。このようなオルガネラが形成する場合は、オルガネラ同士が密集することで強くなるため、活性が自らの形成した場に影響を受ける時、オルガネラが密集することは自身の活性の重要な制御因子になると考えられる。細胞内ではオルガネラの密な箇所と疎な箇所が存在し、このような場ではオルガネラの活性が異なるのではないかと考え、本研究では、様々な濃度で単離ミトコンドリアをディッシュ表面に吸着させ、ATP 合成量を測定した。

【方法】実験ではブタ心筋から単離したミトコンドリアを様々な濃度で、吸着剤としてポリフェノール蛋白をコーティングしたディッシュに吸着させた。ディッシュ上のミトコンドリアに基質を添加し、ATP 合成反応後、上清をピペットで採取、ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光反応を用いて放出された ATP 量を測定した。また、実験に用いたディッシュから透過光画像を取得し、実際に吸着しているミトコンドリア数をカウントした。これらから単位蛋白辺りの ATP 合成量を測定し、単離ミトコンドリアを懸濁液に懸濁した場合と比較した。

【結果】吸着させたミトコンドリアにおいて、上清に放出される ATP 量は反応時間とともに増加した。また各反応時間において、ミトコンドリア濃度の増加に伴って放出された ATP 量は増加した。様々なミトコンドリア濃度における単位蛋白辺りの ATP 合成量は、懸濁系ではほぼ一定だったのに対して、吸着させたミトコンドリアは濃度の増加に伴い、放出された ATP 量も増加する傾向がみられた。

H.Yoshioka and Y.Ohta : Do mitochondria change their activity by crowding?

3P224

細胞分裂中の細胞質 Ca^{2+} 濃度とミトコンドリア膜電位の観察

○太田 善浩、澤井 祐子、村井 健太郎、船越 政史（東農工大院・工学・生命）

細胞分裂は Ca^{2+} 依存性の過程であり、metaphase 以降に僅かに細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇することが知られている。この Ca^{2+} 濃度上昇を起こすメカニズムは不明であった。本発表では、そのメカニズムに関して一つの仮説を提案する。

【実験方法】C6 グリオーマ細胞のミトコンドリアを膜電位感受性蛍光色素で標識し、M 期の間の膜電位変動を観察した。また、そのコントロールとして、CFP をミトコンドリアに発現させた細胞で同様に、M 期の間の蛍光強度を測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度変動の観察には C6 細胞に Indo-1 を負荷した。以上全て、蛍光顕微鏡を用いて単一細胞レベルで計測した。

【結果・考察】計測した全ての細胞で、TMRE の蛍光強度は M 期の metaphase から anaphase が進行するにつれて減少し、その後徐々に回復した。一方、CFP の蛍光強度には変化が見られなかった。この結果は、M 期の間にミトコンドリアが一時的に脱分極していることを示している。また、この期間における細胞内カルシウム濃度を観察すると、metaphase 以降に濃度が上昇していた。ミトコンドリアには細胞内の Ca^{2+} プールとしての役割や ATP を供給して細胞内のイオンバランスを維持する役割もあるので、脱分極が Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす可能性を検討するために、間期の細胞に CCCP を添加してミトコンドリアを脱分極させた。その結果、一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の終了後、徐々に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していく現象が観察された。これらの結果は、M 期の途中では何らかの理由によりミトコンドリアが脱分極し、その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していることが考えられる。当日は、詳細を発表したい。

Y.Ohta, Y.Sawai, K.Murai and M.Funakoshi : Measurements of mitochondrial membrane potential and cytosolic Ca^{2+} during M phase