

課題番号 30

## 単離ミトコンドリアの細胞内導入法開発による 細胞加齢・病態モデルの構築

### [1] 組織

代表者：田中 敦

(山形大学医学部メディカルサイエンス  
推進研究所)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：野村 慎一郎

(東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費 445,120 円，旅費 4,880 円

### [2] 研究経過

近年、ミトコンドリアの機能維持メカニズムの生理的意義について多くの知見が報告され、その崩壊がさまざまな疾患・老化などの原因であると考えられるようになった。しかしながらミトコンドリアは部分的な機能障害をミトコンドリア集合全体（ネットワーク）で相補することから「どれだけのミトコンドリアが病的になった場合に、細胞全体が老化・病態を示すか」といったことを定量的に測定することを困難にする（機能閾値問題）。

本研究計画では、細胞や臓器から精製したミトコンドリアを対象とする細胞にダメージを与えることなく導入する手法により、さまざまな状態（病的・機能障害ミトコンドリア）・由来のミトコンドリアを任意の量・時期に細胞に導入し、定量的にミトコンドリアネットワークとしての機能閾値を検証することを可能にすること、さらに精製ミトコンドリアを細胞に導入し経時的に追跡するために、共同研究者である小椋研究室とともに、一細胞における自己・非自己ミトコンドリアの識別法を開発検討することを目標とし本報告書記載の研究を遂行した。

以下、研究活動状況の概要を記す。東北大学加齢医学研究所小椋利彦教授、東北大学大学院工学研究科野村慎一郎准教授と、加齢医学研究所にて研究計画打ち合わせを行い、その後東北大学大学院工学研究科野村研究室および山形大学医学部田中研究室を中心に手法の条件検討を進めた。現在手法開発を中心とした研究論文を共同執筆中である。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

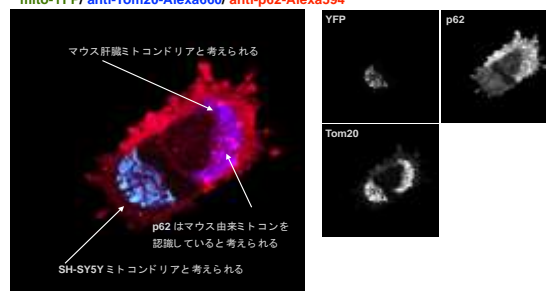
本研究では定量的にミトコンドリアネットワークとしての機能閾値を検証することを可能にし、一細胞における自己・非自己ミトコンドリアの識別法を開発検討するために、下記の3課題について遂行する。

- ・精製ミトコンドリアの細胞導入条件の至適化。
- ・細胞導入した精製（ドナー）ミトコンドリアによるレシピエント細胞の環境変化観察
- ・導入ミトコンドリアの追跡および自己・非自己ミトコンドリア識別法の開発検討

マウス肝臓あるいはヒト培養細胞から精製したミトコンドリアを人工脂質膜に取り込ませた後、レシピエント細胞（SH-SY5Y 細胞）に電気的に導入し、導入した精製ミトコンドリアと、レシピエント細胞側の内在性ミトコンドリアの経時的な関係変化を観察することで、導入の至適条件を検討した。

- ・精製ミトコンドリアの活性を維持したままレシピエント細胞に導入する条件（導入量、導入バッファ組成など）を設定
- ・異種ミトコンドリア認識メカニズム存在の可能性を検出

マウス由来ミトコンドリアはヒト細胞内で異物認識されている  
SH-SY5Y: Mito-YFP cells vs Mouse liver mito  
mito-YFP/ anti-Tom20-Alexa660/ anti-p62-Alexa594



画像1  
YFPにより細胞内在性のミトコンドリアを、Tom20抗体染色（Alexa660）によりターナルのミトコンドリアを識別した場合、ミトコンドリアにYFPシグナルがないもの（細胞内右側）により多くのp62（Alexa594）シグナルが集中している。これは、マウス肝臓由来ミトコンドリアが、ヒト細胞により異物認識されている可能性を示していると思われる。各要素のイメージについては右モノクロを参照のこと。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

ミトコンドリア機能障害に端を発するような疾患の発症メカニズムを検討する際、より初期段階でミトコンドリア機能障害を捉えることは、診断法、予防法の開発にも貢献すると期待される。

[4] 成果資料

現在手法開発を中心とした研究論文を共同執筆中