

## GUV 細胞融合法によるミトコドリア機能異常細胞の 定量的創出

### [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 185,360 円，旅費 14,640 円

### [2] 研究経過

ミトコドリアは細胞内エネルギーの生産の場として中心的な役割を果たすだけでなく、多岐にわたる生命活動に必須な生反応の場である。近年、ミトコドリアの機能を維持することの生理的意義について多くの知見が報告され、機能維持メカニズムが崩壊することで、さまざまな疾患・老化などの原因となると考えられるようになった。ミトコドリアは細胞内に多数存在し、かつ融合や分裂を繰り返すことでその形を自在に変化させる。一般にミトコドリアのダイナミクスと呼ばれるこの特徴は、部分的な機能障害をミトコドリア集合全体で相補（融合）、あるいは隔離（分裂）し、細胞内の環境悪化を防ぐメカニズムとなり得る。しかしながら、このことは「どれだけのミトコ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、分担者野村慎一郎研究室（東北大学大学院工学研究科）で開発した、リポソームと細胞の電氣的融合法（GUV・細胞融合法）を利用し、細胞や臓器から精製したり、人工的にストレスを負荷した単離ミトコドリア、あるいは人工物を、対象とする細胞にダメージを与えることなく導入することで、さまざまな細胞の状態（病的・機能障害ミトコドリアを有する状態）を任意に作り出すことを目指した。これにより、定量的にミトコ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、特に外来ミトコドリアを細胞に導入し経時的に追跡すること

で、一細胞における自己・非自己ミトコドリアの識別法を開発・検証した。

今年度の研究経過の概要としては、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、継続的に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導入したミトコドリアの機能活性維持を検証する方法として、ミトコドリア DNA を失った Rho0 細胞を樹立、導入したミトコドリアの活性検討を可能とした。また、導入後のミトコドリアがレシピエント細胞にどのように認識されているかについても併せて観察・検討を行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は下記の課題について研究遂行した。

1. 外来ミトコドリア・人工物の異物認識メカニズムの解析
2. 細胞導入した精製（ドナー）ミトコドリアによるレシピエント細胞の環境変化観察

マウス肝臓あるいはヒト培養細胞から精製したミトコドリアを人工脂質膜(GUV)に取り込ませた後、レシピエント細胞に電氣的に融合することで導入し、導入した精製ミトコドリアと、レシピエント細胞側の内在性ミトコドリアの経時的な関係変化を観察した(図1)。導入の至適条件を検討したところ図2に示すような割合で導入に成功していることが明らかとなり、 $\geq 20\%$ の導入率に達していることが明らかとなった。また、異種間(ヒト・マウスなど)ミトコドリアの検出法開発については、主に小椋グループにより、ヒトミトコドリア DNA とマウスミトコドリア DNA の違いを、それぞれの特異的制限酵素配列を含む部位を PCR 法により増幅し、制限酵素を用い、一方の増幅断片のみを消化することを確認することで検出可能とした。また、細胞イメージングにより、導入ミトコドリアが導入先の細胞種とは異種の動物種由来出会った場合には、細胞側のリソソームに認識・取り込まれていることが

ら、細胞には異種ミトコンドリアを認識し排除するシステムが働くことを示唆した(図3)。

さらに、導入ミトコンドリアにより、疾患モデル細胞の機能を相補するかについて、ミまずミトコンドリアのゲノムを失った細胞株(Rho0)の樹立に成功し、GUVによるミトコンドリアの導入の有無でその後のミトコンドリア機能依存的生存率に違いが示されていることを明らかとした。このことは、導入したミトコンドリアが細胞機能を相補していることを示唆した(図4)。

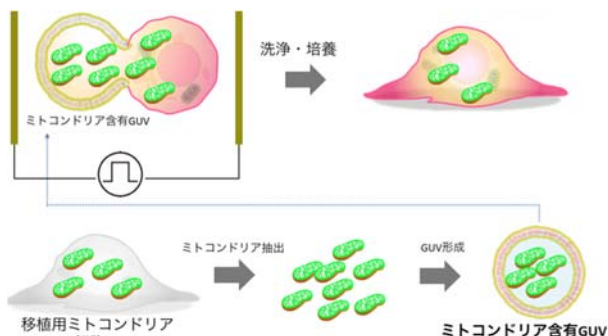
### (3-2) 波及効果と発展性など

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。

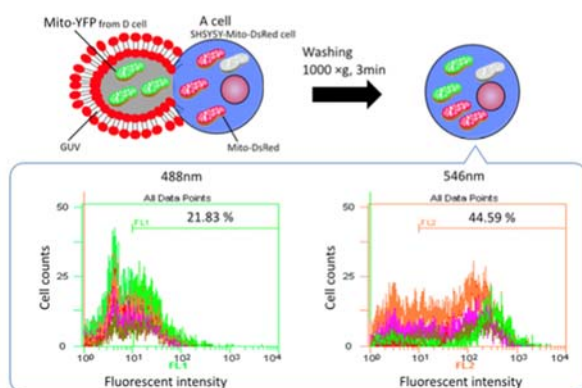
## [4] 成果資料

(1) 論文投稿を予定している。

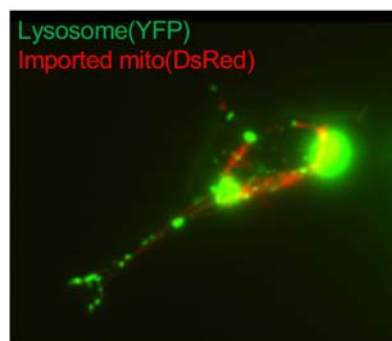
(図1) ミトコンドリア含有GUVとレシピエント細胞の概念図



(図2) ミトコンドリア含有GUVからレシピエント細胞への導入効率



(図3) 導入された異種ミトコンドリアを認識するレシピエント細胞 (リソソーム: 緑, 導入ミトコンドリア: 赤)



(図4) 導入されたミトコンドリアによる細胞生育復活 (右: Rho0, 左: Rho0+Mito)

