

補助事業番号 2024M-426

補助事業名 2024年度 健康寿命の延伸を目指したミトコンドリア解析プローブの開発 補助事業

補助事業者名 森本 展行

1 研究の概要

細胞のエネルギー生産を担うミトコンドリアは、フレイル、神経変性疾患、癌といった多様な疾患と密接に関連している。そのため、ミトコンドリアの微細構造を可視化し機能解析するためのプローブを開発することは、疾患の病態や治療法の確立において重要な意義を有する。本補助事業では、細胞膜透過性と生体適合性に優れる双性イオンポリマー、特にスルホベタインポリマーに着目し、ミトコンドリア内部の詳細な観察を可能にする高分子蛍光プローブの開発を行った。

スルホベタインポリマーにミトコンドリア局在性を有するローダミンBを修飾し細胞培養液に添加後、超解像顕微鏡観察からその挙動を解析した。その結果、高分子量のポリマーにおいてもミトコンドリアへの移行が確認できた。また、このポリマーはミトコンドリア内膜およびミトコンドリアDNAが存在する核様体への迅速な到達を示すことが明らかとなった。イメージング時における細胞内のATP産生量に負の影響がないことも確認できた。これらの結果はスルホベタインポリマーを基盤とする新たなミトコンドリア解析技術の創出につながり、健康寿命の延伸に貢献する基盤技術としての展開が期待される。

2 研究の目的と背景

ミトコンドリアは細胞内でATPを産生する主要な小器官であり、その機能障害はがん、神経変性疾患、心疾患など多岐にわたる病態と関連している。近年では、健康寿命の短縮につながる要因として注目されているフレイル（加齢に伴う虚弱や身体機能障害）においても、ミトコンドリアの機能不全が重要な病態メカニズムの一つとして認識されている。特に、ミトコンドリア内膜やマトリクスの構造変化は、細胞死（アポトーシス）の誘導や酸化ストレスの原因となる活性酸素種（ROS）の過剰産生と密接に関係しており、これらの構造変化と機能異常を細胞内で可視化し定量的に評価する技術の開発は、疾患の診断や治療法の開発において極めて重要である。しかし、従来のミトコンドリア染色に用いられてきた低分子蛍光プローブの多くは、ミトコンドリアの膜電位に依存しており、膜電位が低下すると標的化効率が低下するという課題があった。また、その小さな分子サイズゆえに細胞外への拡散が起こりやすく、滞留性を確保するために高濃度で使用する際には細胞毒性を示す懸念もある。膜透過ペプチドを利用したミトコンドリア内膜を標的とした蛍光プローブも開発が進められているが、それらの多くは細胞毒性や長時間の細胞内での滞留性に関して改良の余地がある。そこで本研究では、生体適合性が高く、細胞内への迅速な膜透過が可能な双性イオンポリマーであるスルホベタインポリマーに着目し、ミトコンドリア指向性を示す蛍光色素であるローダミンBを修飾した高分子プローブを用いて、細胞内ミトコンドリアの超解像イメージングを行うことで、その微細構造の可視化と細胞機能への影響を評価した。本研究を通じて、将

来的にはミトコンドリアをターゲットとした新たな細胞機能解析手法を確立し、健康寿命の延伸を見据えたミトコンドリア機能解析プローブの開発へと繋げることを目的とした。

3 研究内容

(1) ローダミンB修飾スルホベタインポリマーの調製と細胞導入

本研究では、分子内にカチオン基とアニオン基を併せもつポリベタインの1つである、ポリ[3-ジメチル(メタクリロイルオキシエチル)アンモニウムプロパンスルホン酸](PDMAPS)に、ポリエチレングリコール(PEG)を導入した共重合体(P(DMAPS-PEGMA), 以下P(SB-PEG))に、ローダミンBを修飾したRhoB-P(SB-PEG)を調製し、細胞内導入実験を行った(図1)。RhoB-P(SB-PEG)は、PEGMA (M_n = 500, PEGMA 10 mol%) を含有し、分子量が18K, 30K, 74Kの3種類のポリマーを使用した。

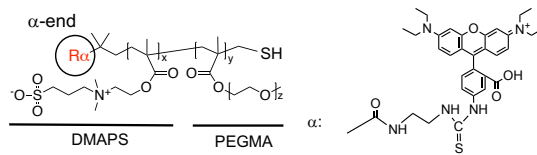
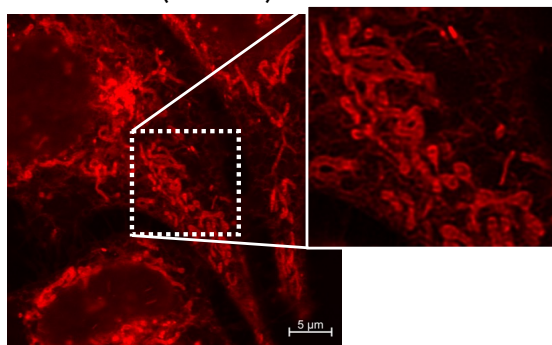


図1. RhoB-P(SB-PEG)の化学構造式

ヒト子宮頸がん細胞(HeLa細胞)を 5×10^4 cells/mLにてガラスベースディッシュに播種し、37°C, 5%CO₂下で24時間前培養した。これに対し、RhoB-P(SB-PEG)の終濃度が18Kでは0.5 mg/mL, 74Kでは1.0 mg/mLとなるように調製した培養液をHeLa細胞に添加した。ポリマー添加後の細胞内挙動は、共焦点レーザー顕微鏡の超解像モードにより撮影した。観察の結果、いずれのポリマー分子量においても糸状の形態を示す典型的なミトコンドリア構造が明瞭に可視化された(図2)。また、RhoB-P(SB-PEG)を添加し6時間から72時間培養した細胞を観察した結果、Rhodamine B単独(終濃度200 nM)を添加した細胞と比較して蛍光強度の経時的な顕著な低下は認められず、長時間にわたりミトコンドリア内部のクリステ構造を可視化することが可能であった。これらの結果から、高分子のRhoB-P(SB-PEG)をプローブとすることで、超解像イメージングにおいても高い局在精度を保ちながら観察可能であると考えられる。

18K-RhoB-P(SB-PEG)



74K-RhoB-P(SB-PEG)

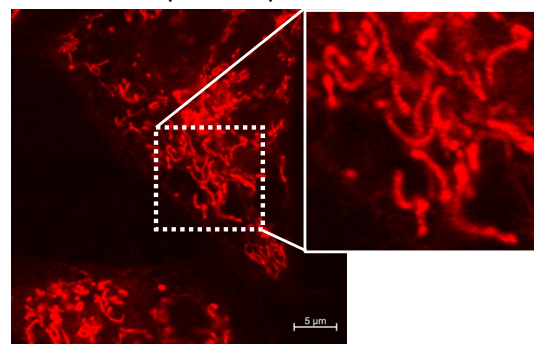


図2. RhoB-P(SB-PEG)を添加したHeLa細胞の超解像イメージング(ポリマー添加6時間後, 60x)

(2) RhoB-P(SB-PEG)による細胞内ミトコンドリア局在性の超解像イメージング

RhoB-P(SB-PEG)が細胞内ミトコンドリア内における局在を明らかにするため、ミトコンドリア内膜の膜電位依存的に結合する低分子蛍光試薬であるMitoTracker Green® (MTG)との共染色を行った。

MTG(終濃度200 nM)およびRhoB-P(SB-PEG)(終濃度0.3 mg/mL)をHeLa細胞に添加し3時間培養後、共焦点レーザー顕微鏡の超解像モードにて観察を行った。取得した画像の任意の線上でのRhoB-P(SB-PEG)とMTGの蛍光強度プロファイルと比較解析した結果、分子量18KのRhoB-P(SB-PEG)はMTGと類似した蛍光強度分布を示し、ミトコンドリア内膜に局在している可能性が高いことが示唆された。一方、分子量が30Kおよび74KのポリマーではMTGのプロファイルと一致しない領域も見られた。ポリマー分子量の増加により細胞内への移行量や滞留性、ミトコンドリアとの相互作用が変化し、内膜以外の部位にも分布するポリマーが存在する可能性が示された(図3)。

RhoB-P(SB-PEG)の分子量がミトコンドリア局在性に影響を与える因子であることが考えられる。

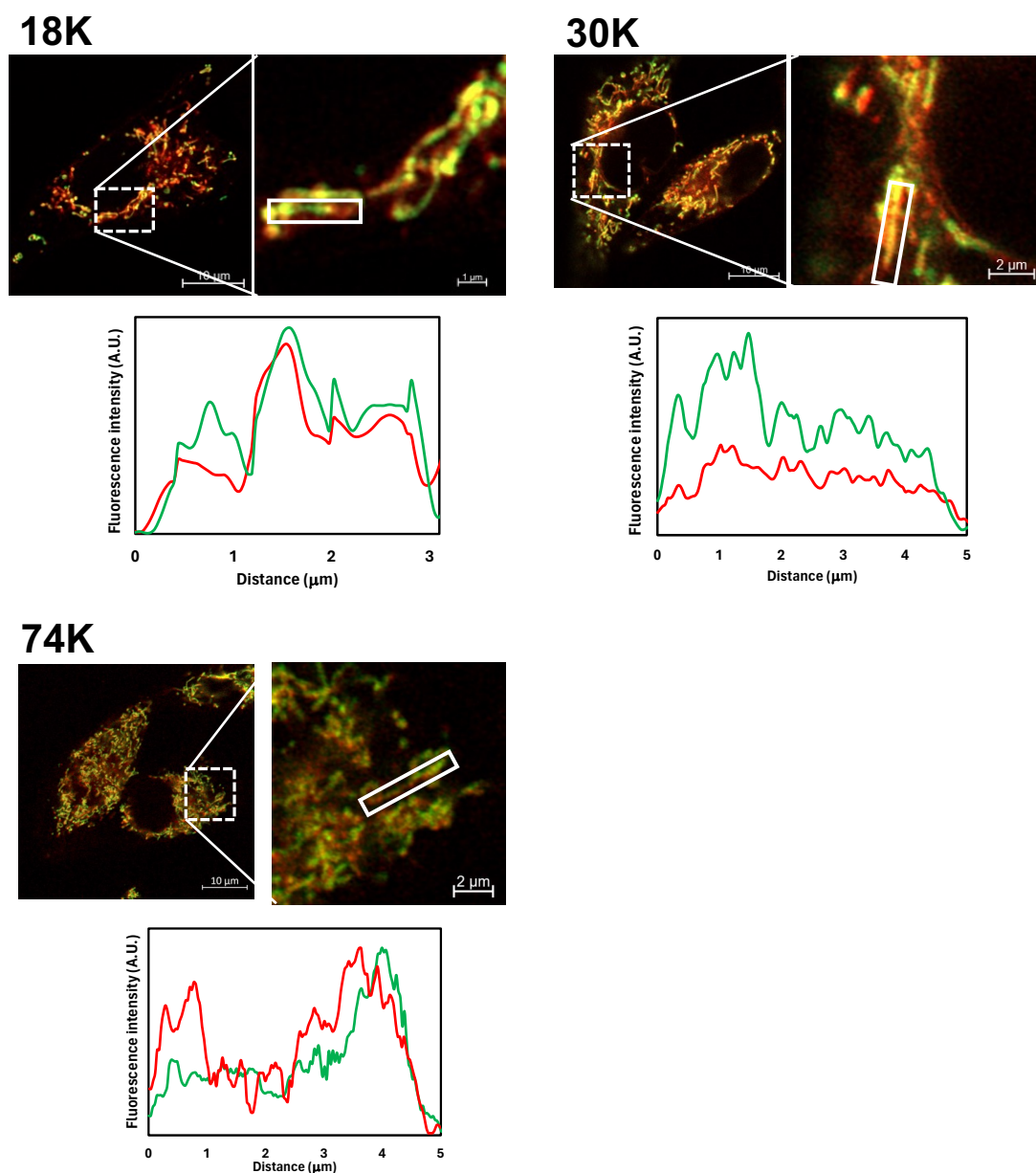


図3. RhoB-P(SB-PEG)およびMTGとの共染色像(ポリマー添加3時間後, 60x)

さらに、ミトコンドリア外膜を染色する蛍光プローブであるNonyl acridine orange (NAO)との共染色を行った。(NAO終濃度 100 nM, RhoB-P(SB-PEG)終濃度 0.3 mg/mL)。その結果、Rhodamine B単独を添加した際と同様に、NAOとRhoB-P(SB-PEG)の蛍光シグナルが多数のミトコンドリア構造上で重なって観察された。これらの共局在の観察結果は、MTGとの共染色で確認されたミトコンドリア内膜への移行性と併せて、RhoB-P(SB-PEG)はミトコンドリア外膜および内膜の両方に移行し、それぞれの部位に分布しえることを強く示唆している。

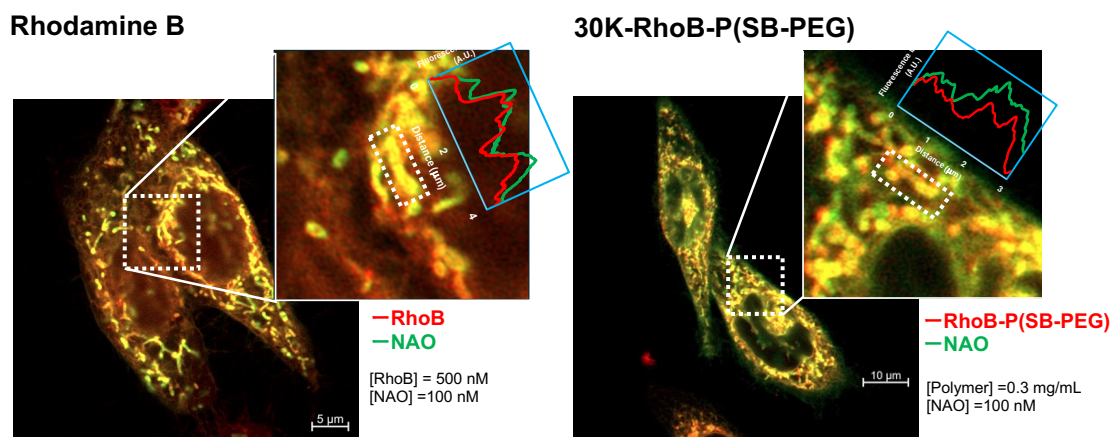


図4. RhoB-P(SB-PEG)およびNAOとの共染色像(ポリマー添加3時間後, 60x)

(3) RhoB-P(SB-PEG)添加による細胞内ATP産生量への影響評価

RhoB-P(SB-PEG)が細胞のエネルギー代謝に与える影響を評価するため、HeLa細胞にRhoB-P(SB-PEG)を添加し培養24時間後の細胞内ATP産生量をルシフェラーゼATPアッセイにより評価した。本アッセイでは酵素ルシフェラーゼがATP存在下で基質であるルシフェリンを酸化することで発光する反応を利用し、その発光強度を測定することで細胞内のATP濃度を定量化した。その結果、異なる分子量のRhoB-P(SB-PEG)を添加したHeLa細胞のATP産生量は、未処理の細胞のATP産生量と比較して有意差は認められなかった。この結果は、RhoB-P(SB-PEG)の細胞内への導入が少なくとも24時間においては細胞の主要なエネルギー産生経路に大きな影響を与えないことを示している(図5)。以上より、RhoB-P(SB-PEG)はATP産生能を維持した状態で細胞内に導入可能であり、細胞の基本的な機能を損なうことなくミトコンドリアの微細構造を長時間にわたリイメージングできる有用な高分子プローブとなり得ることが示唆された。本評価は24時間の時点で

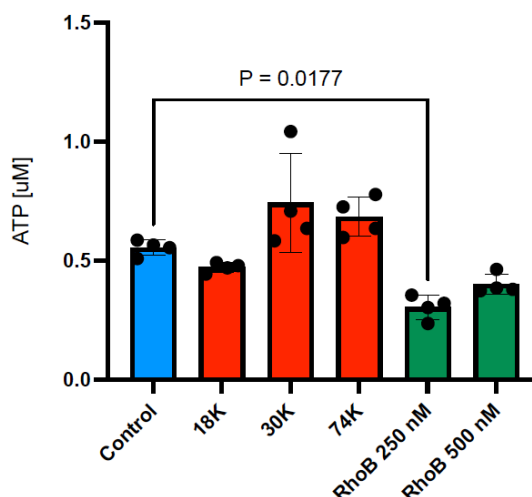


図5. RhoB-P(SB-PEG)を添加したHeLa細胞のATP産生量(ポリマー終濃度 0.3 mg/mL, ポリマー添加24時間後, n=4)

の測定であるため、今後より長時間にわたるATP産生量の経時的な変化を詳細に評価する必要があると考えられる。

(4) ミトコンドリアの脱分極とRhoB-P(SB-PEG)によるイメージング

ミトコンドリア膜電位の低下がRhoB-P(SB-PEG)の局在性や蛍光強度に与える影響を評価するため、ミトコンドリア膜のプロトン勾配を消失させ膜電位を低下させる脱分極剤であるCarbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)を用いて細胞に脱分極を誘導し、各蛍光プローブのシグナル変化を観察した。まずRhoB-P(SB-PEG)、Rhodamine B、およびTetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, 膜電位感受性のミトコンドリア染色剤)をHeLa細胞に添加し、各プローブのミトコンドリア局在を確認した後、FCCPを終濃度100 μ Mにて添加した。その結果、FCCP添加から5-10分以内にTMRE由来の蛍光は急速に消失した。これはマトリクスへのプロトン流入による膜電位消失からTMREが拡散した結果である。一方でRhoB-P(SB-PEG)およびRhodamine Bでは蛍光シグナルの減衰はTMREと比較して緩やかであった。このことはRhoB-P(SB-PEG)がマトリクスまで到達していることを示すとともに、ミトコンドリアの各部位に存在できるため従来の膜電位依存性蛍光プローブとは異なり、膜電位変化に対する感受性が低いと考えられる。さらに高分子量のRhoB-P(SB-PEG)であることでミトコンドリア外への拡散速度が遅いためとも予想される。RhoB-P(SB-PEG)は、脱分極などの病態条件下におけるミトコンドリア構

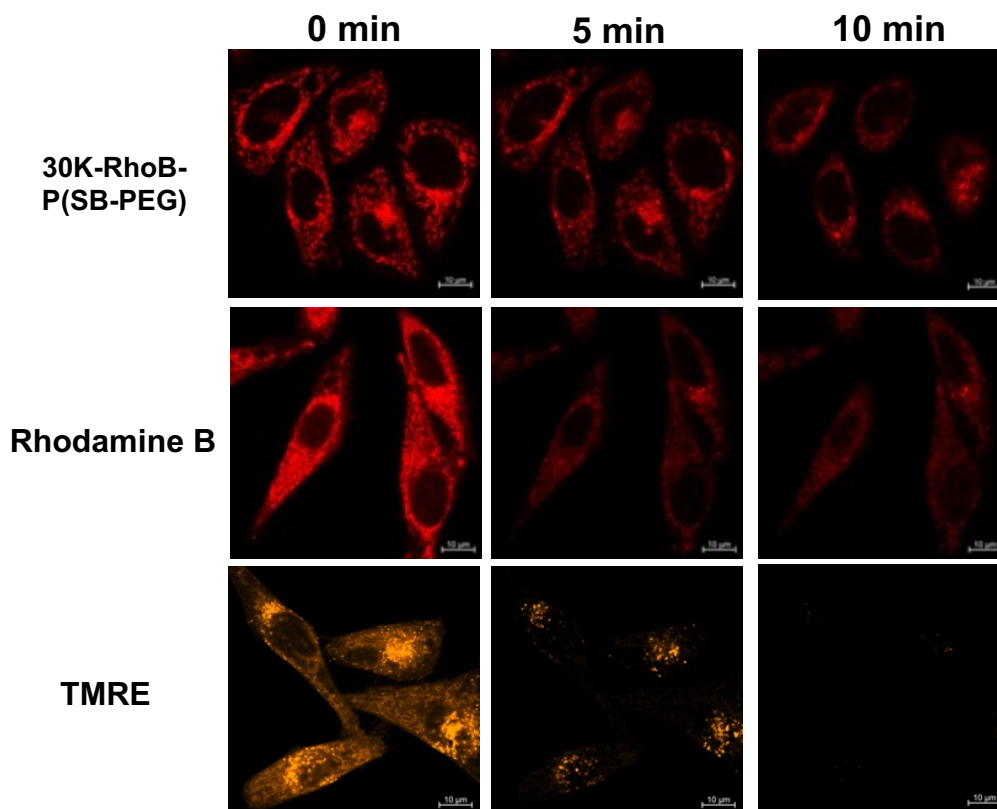


図6. 脱分極剤(FCCP)添加による各蛍光プローブのシグナル変化(60x)

造の動的な変化を膜電位に大きく影響することなく可視化し追跡するための有用なツールとなる可能性が考えられる。脱分極に伴うミトコンドリア構造の変化を可視化・追跡し得るプローブであることが示唆された。今後より詳細なメカニズム解明に向けた検討が重要であると考ええる。

(5) RhoB-P(SB-PEG)によるミトコンドリア核様体の可視化

RhoB-P(SB-PEG)がミトコンドリア内膜への移行能を有することが確認されたことから、ミトコンドリア内膜に結合する状態でマトリクス内に存在するミトコンドリアDNAと、その関連タンパク質の複合体である核様体への局在可能性について検討を行った。核様体は主にミトコンドリアDNAで構成されており、DNA特異的染色試薬であるSYBR Green Iを用いることで生細胞内のミトコンドリアDNAを可視化できることが知られている。そこでHeLa細胞をSYBR Green Iで核様体を染色した後にRhoB-P(SB-PEG)を添加し(RhoB-P(SB-PEG)終濃度0.3 mg/mL)その動態をタイムラプス観察により解析した。その結果、RhoB-P(SB-PEG)は添加直後から速やかにミトコンドリア内部のマトリクス領域まで到達し、ポリマー添加から約3分の時点でSYBR Green Iと明瞭な共局在を示すことが確認された。さらに、RhoB-P(SB-PEG)をHeLa細胞に導入して3時間後にSYBR Green Iで核様体を染色し、両者の共局在性を定量的に解析したところ、分子量が18Kおよび30KのポリマーはSYBR Green Iで染色された核様体と高い共局在係数を示した。一方、74Kでは共局在係数が低下する傾向が認められ、ポリマー分子量の増加が核様体へのアクセス効率を低下させた可能性が示唆された(図7)。加えて、RhoB-P(SB-PEG)に含まれるRhodamine B自体もDNA結合性を有することが知られており、この特性がSYBR Green Iとの共局在性に寄与している可能性も考えられた。

今後はRhoB-P(SB-PEG)を導入した各種細胞におけるROS濃度の評価を進めるとともに、ROS濃度の精密な制御や、ミトコンドリアの動的な形態変化に対応した新たな観察手法の開発へと展開していく予定である。