Osaka University Knowledge Archive

Title	１細胞質量分析法による生きたミトコンドリア単体でのダイレクト代謝解析
Author(s)	江崎, 剛史
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56102
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕

1細胞質量分析法による生きたミトコンドリア単体でのダイレクト代謝解析

学位申請者　　江崎　剛史

【序論】

生体は、多くの個性を持った細胞が集まり、有機的に関わり合うことで生命維持を行っている。特に、その細胞の中にある小器官のミトコンドリアは、生体に必要なエネルギー産出、プログラム細胞死、シグナル伝達など、多くの生命現象に関わっていることが明らかになってきている。そして、ミトコンドリアが機能障害を起こし、細胞が生命維持を行えなくなった結果、アルツハイマーやパーキンソン病といった症状になることも報告されている。そのため、ミトコンドリアが機能障害を起こす兆候を発見できれば、病気を未然に防ぐことが可能になると考えられる。

しかし、従来は大量に集めた細胞を磨り潰して分析を行う方法か、蛍光観察で特定の分子の動きを追跡する方法が主流であり、機能障害を起こした、生きたミトコンドリアの代謝物変化を網羅的に分析する方法はなかった。

そこで、私は1細胞質量分析法をミトコンドリアの代謝物探索に適用することにより、世界で始めてミトコンドリア単体に含まれる分子の挙動を網羅的に分析し、1細胞内のミトコンドリア代謝物を計測する技術開発に取り組んだ。

【実験方法及び結果】

1.　1細胞内ミトコンドリアの代謝物探索

まず、１つの細胞内のミトコンドリアのメタボロミクスを可能とするため、ミトコンドリアの特異的蛍光プローブであるMitoRedを細胞に投与し、蛍光顕微鏡下で蛍光を発している箇所をナノスプレーチップで採取し、高分解能質量分析計LTQ　Orbitrapで分子分析を行った。その結果、ミトコンドリアと細胞質から7,000以上のピークが検出された。ここには、TCAサイクルに関与する代謝物やATP等が含まれていた。ミトコンドリアと細胞質、そして細胞成分との比較のため測定した溶媒から得られたデータを使い主成分解析を行ったところ、それぞれが異なるクラスターを形成した。このことから、ミトコンドリアと細胞質をそれぞれ選択的にサンプリングでき、更に、成分組成の違いを検出しできたことが示唆された。その中でミトコンドリアに特異的な分子として、ステロイド脂質であるTelocinobufaginの検出、そして同定に成功した。

1つの細胞の状態を観察しながら、その中のミトコンドリアを採取し、成分の網羅的分析に成功した例は今までに無く、世界初の結果を得ることができた。

2.　安定同位体を用いたミトコンドリア単体での代謝追跡

次に、1つの細胞内において異常な変化をしたミトコンドリア単体の代謝変化と、分子が小器官の間を出入りする様子を追跡するため、安定同位体である^{13}C　Glucoseを使って実験を行った。細胞培養培地を^{13}C　Glucose入りの培地に置換し、3時間後、そして12時間後にミトコンドリアと細胞質をそれぞれ採取し、同位体標識された代謝物の質量分析を行った。その結果、細胞質では解糖系の代謝物で^{12}Cから^{13}Cへの置き換わりがあったが、ミトコンドリアではあまり置き換わりがなかった。解糖系は細胞質で活発に動いており、代謝の進行が速いことが確認された。対照的に、TCAサイクルの代謝物は、細胞質でもミトコンドリアでも、^{12}Cから^{13}Cの代謝物へ置き換わっている様子が観察された。TCAサイクルの代謝物は、細胞質とミトコンドリア間を行き来するためであると考えられた。

以上より、ミトコンドリア単体に含まれる同位体標識分子の代謝追跡に世界で初めて成功した。また、小器官による代謝の速度の違いと、小器官の間での代謝物の出入りを追跡することが、1細胞で可能であることを示した。

【総括】

本研究では、従来の分析法では不可能だった、1細胞内ミトコンドリアの網羅的代謝分析に成功し、加えて、細胞質とミトコンドリア間での代謝追跡を可能とした。

この手法は核や液胞といった他の小器官の分子局在、さらに植物組織での分子分布も分析可能である。本手法を用い、あらゆる生体組織内の分子局在や挙動を解析することで、生命現象の解明に近付けることが期待される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　江崎　剛史　　）		
論文審査担当者	（職）	氏　　名
	主 査　　特任教授	柳　田　　敏　雄
	副 査　　教 授	高　島　　成　二
	副 査　　教 授	石　島　　秋　彦
	副 査　　准教授	岡　本　　浩　二

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアは生命維持に必要不可欠な小器官であり、基礎研究だけでなく、創薬や医療の分野においても非常に注目されているが、従来は、個性豊かな細胞の状態を考慮したミトコンドリアの代謝物を分析することができていなかった。

そこで本君は、理化学研究所 QBiC 1細胞質量分析チームにて開発している1細胞質量分析法に、蛍光観察法を組み合わせ、１つの細胞の中のミトコンドリアの代謝物分析を可能とした。

結果として、テロシノブファギンという脂質がミトコンドリアに特異的に含まれていることを発見した。この分子は腎不全の患者から検出されており、病気の早期発見へ繋がる可能性をもった発見であった。創薬や医療に向けた応用も見込まれ、非常に強いインパクトのある研究結果といえる。

データの定量性やばらつきへの対応等、課題はあるが、世界で初めて１生細胞の中にあるミトコンドリアの代謝物分析を可能とし、脂質を同定した功績は、学位論文としての価値を有する。

以上により、本論文の申請者が博士号取得に値すると判断する。