[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名　　早川　泰之

本研究は、哺乳動物中枢神経細胞ミトコンドリアによる速い酸素消費の機構を解明する目的で、マウス小脳の培養神経細胞を用いて、二光子励起顕微鏡法、パッチクランプと微小酸素電極を組み合わせた電気生理学的手法によって解析を行い、下記の結果を得ている。

要旨

神経細胞における活動依存的酸素消費は、脳機能イメージングで観察される initial dip の現象から活動開始後 1 秒以内に増大するとされている。しかし、細胞レベルにおけるこの迅速な酸素消費のメカニズムはまだ明らかにされていない。そこで、我々は二光子励起イメージング法により、単一神経細胞の活動依存的なミトコンドリア応答の解析を行なった。

1. ミトコンドリア膜電位蛍光色素 TMRM により染色した培養小脳プルキンエ細胞を用いて、二光子励起顕微鏡によるイメージングを行った。形質膜脱分極刺激に対して、30nM TMRM では減少、100nM TMRM では増加し、TMRM 濃度依存的に応答が異なった。これらはミトコンドリア膜電位の脱共役剤 FCCP と同じ方向変化であった。またカルシウムを除いた外液では蛍光変化がないため、形質膜脱分極刺激に対するミトコンドリア膜電位の脱分極はカルシウム依存性であることが示唆された。100nM TMRM は、刺激直後の応答性が 30nM TMRM や Rh123 と比べて応答

性が速く、かつ大きいことから、解析を進めていく上での最適な染色条件は 100nM TMRM であることを見出した。

2. 細胞内カルシウム濃度蛍光指示薬としてカルシウムイオン高親和性 fura-2、または低親和性 fura-2FF と TMRM の同時イメージングを行い、細胞内カルシウム濃度とミトコンドリア膜電位変化の相関を解析した結果、カルシウム濃度が 15μM を越えるとミトコンドリア膜電位が脱分極することを明らかにした。

3. 単一培養神経細胞の酸素消費を微小酸素電極、パッチクランプを用いて解析した結果、形質膜脱分極刺激により 0.2 秒以内に酸素消費の増大が観察された。またミトコンドリア膜電位の脱共役剤 FCCP においても酸素消費が増大した。一方、細胞内に導入したカルシウムキレート剤 BAPTA では酸素消費の変化が起こらなかった。このことから、この酸素消費の増大は、細胞内カルシウムイオンに依存的であることが示された。これは、カルシウム取り込みによるミトコンドリア膜電位の脱分極によって起こることが示唆された。

4. 神経細胞から得られる自家蛍光成分はミトコンドリア由来の NAD(P)H と考えられているため、TMRM 蛍光像との同時画像取得を行い、空間的局在パターンが同じであることを確認した。これをふまえ、形質膜脱分極刺激によるミトコンドリア呼吸鎖における NAD(P)H を解析した結果、FCCP による NAD(P)H の速やかな減少は、ミトコンドリア膜電位の脱分極による NAD(P)H の消費が促進されることを示し、また呼吸鎖複合体 I 阻害剤アンチマイチン A による増加は呼吸鎖の機能停止による NAD(P)H の蓄積を反映すると考えられた。そのため、形質膜脱分極刺激による初期の減少相はミトコンドリアのカルシウム取り込みによる迅速なミトコンドリア膜電位の脱分極により起こると考えられ、その後の増加相はクエン酸回路のカルシウ

ム依存性酵素の活性化などによるカルシウム依存的な機構の賦活化によるものと考えられた。

以上の結果から、二光子励起法は、励起波長の異なる蛍光物質の同時励起を可能にできることから、神経生物学分野において非常に有用な方法であると考えられる。また、哺乳動物中枢神経細胞において初めて、ミトコンドリアにおける速い酸素消費の増大は、細胞内カルシウムイオン依存的なミトコンドリア膜電位の脱分極によるものであることを明らかにした。これらの結果は、神経活動時における ATP のフィードフォワード的な恒常性維持機構の理解に対して重要な知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。