

アクアポリン8ノックダウン脂肪細胞を用いたミトコンドリア機能の可視化

Visualization of mitochondrial function in aquaporin 8-knockdown 3T3-L1 adipocytes

伊香賀 玲奈¹, 田中 直子¹, 田中 光²

¹人間文化研究科人間生活科学専攻, ²東邦大学

キーワード: アクアポリン8, 脂肪細胞, ミトコンドリア, バイオイメージング

1. 研究の目的

糖尿病や肥満の研究で広く用いられている脂肪細胞は余剰の栄養を脂肪滴の形で貯蔵する細胞であるが, 自らホルモン様生理活性物質(サイトカイン)を放出する重要な内分泌器官でもあることがわかってきた。脂肪細胞から分泌されるサイトカインは, 糖尿病などの生活習慣病の発症に密接に関わっていると言われている。最近, この脂肪細胞からのサイトカインの分泌を, 脂肪細胞中のミトコンドリア由来の活性酸素が誘発する可能性を示唆する結果が報告されており, 生活習慣病との関係が注目されている。このように, 生活習慣病の発症機構の解明は目覚ましい進歩を遂げてきたが, 未だの部分も多い。その中で注目されているものがミトコンドリアである。ミトコンドリアは, 生命の様々な活動に必要なエネルギーの大部分を作り出す器官であり, その機能が損なわれると基礎代謝の低下や酸化ストレスの増加を引き起こし, 生活習慣病を誘発すると言われている。ミトコンドリア内は, 代謝に伴い多量の水がミトコンドリア内で産生されている事から, ミトコンドリアの水の流れが滞ると, 細胞に何らかの影響が出ると考えられる。

我々は, 生活習慣病の研究にも広く用いられている脂肪細胞株 3T3-L1 において, 水チャネル「アクアポリン (AQP)」の一つである AQP8 が, ミトコンドリアに発現しているという知見を得たことから, AQP8 とミトコンドリアの機能との関係について調べるため, AQP8 の機能を半永久的に抑制した脂肪細胞の作成に成功した。本プロジェクトでは, この AQP8 の遺伝子発現を抑制した細胞 (AQP8 ノックダウン細胞) を用いて, AQP8 の発現抑制がミトコンドリア機能に与える影響について調べた。ミトコンドリア機能は様々な要因で変化するため, 生体内に近い状態の結果を得られるバイオイメージングを取り入れることで, 細胞の状態を多方面から解明する。また, ミトコンドリアはエネルギー合成の副産物として, 活性酸素を産生しており, この活性酸素は多くの疾患に密接に関与することが報告され, 2 型糖尿病や肥満者に認められる病態にも寄与していることが示唆されている。このことから, 活性酸素の増減についても測定した。

これらの研究は個人差に着目した治療などへの応用が期待される。

2. 活動実施報告

本研究では, この AQP8 ノックダウン細胞とコントロール細胞のミトコンドリアの機能にどのような違いが見られるかを, ミトコンドリアでの代謝を反映する自家蛍光タンパク質と膜電位の測定を行い明らかにした。様々な要因で敏感に変化するミトコンドリアの機能をリアルタイムで捉えるため, バイオイメージングによるミトコンドリア機能の可視化に重点を置いて研究を進めた。

また, 肥満や糖尿病を誘発する因子でもある活性酸素の測定を, 抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の遺伝子発現量と活性を測定することで間接的に捉えた。

本プロジェクトの結果は, 第 20 回 日本バイオイメージング学会, および第 84 回 日本生化学会大会において報告した。また, 本プロジェクトの結果を一部に入れた, 第 14 回家政学関連卒業論文・修士論文発表会において優秀賞を受賞した。

3. 研究目標の達成状況

ミトコンドリア機能の可視化として, 488nm の励起光を照射すると自家蛍光を発する FAD の測定, およびミトコンドリア膜電位 TMRE を用いて測定したところ, AQP8 ノックダウン細胞でミトコンドリア電子伝達系の機能が低下している事が分かった。さらに, 炎症性サイトカイン TNF- α の遺伝子発現量と, 培地に放出された TNF- α 量が AQP8 ノックダウン細胞で有意に上昇しており, 細胞質側の活性酸素量が上昇している事がわかった。

4. まとめと今後の課題

AQP8 の発現抑制はミトコンドリアの機能障害を引き起こし, 細胞質における活性酸素の増加をさせていることを見出した。AQP8 ノックダウン細胞の機能を深く調べることで, これまで不明瞭

だった、ミトコンドリア機能と、活性酸素の産生や炎症性変化のつながりを明確にできる可能性もあり、今後、その仕組みも詳細に調べていきたいと考えている。

5. 研究成果

1) 学会発表

[1] 伊香賀玲奈ほか. アクアポリン 8 ノックダウン脂肪細胞を用いたミトコンドリア機能の可視化. 第 20 回日本バイオイメーjing学会. 千歳科学技術大学. 2011.

[2] 伊香賀玲奈ほか. 3T3-L1 脂肪細胞に発現する AQP8 とエネルギー代謝の関係. 第 84 回 日本生化学会大会. 国立京都国際会館. 2011.

[3] 伊香賀玲奈. アクアポリン 8 の機能抑制が脂肪細胞の炎症性変化に与える影響. 第 14 回家政学関連卒業論文・修士論文発表会. 文化学園大学. 2012.

2) 受賞

[1] 伊香賀玲奈. 優秀賞. アクアポリン 8 の機能抑制が脂肪細胞の炎症性変化に与える影響. 2012. 2.29. 日本家政学会関東支部.