

ミトコンドリアの融合と分裂に対する熱ストレスの影響

名古屋大学 理学部 化学科 3 年

代表者名：松本健太郎 原亮太 笈川涼太 三田育実

1. 緒言

ミトコンドリアは、我々が体を動かすために必要なエネルギーを酸素呼吸によって生み出す、生物に必須の細胞内小器官（オルガネラ）である。ミトコンドリアは核の染色体DNAとは別に、内部に独自のDNAをもつことから、その起源ははるか昔に我々の祖先にあたる細胞に共生した、好気性細菌であると言われている。興味深い事に、ミトコンドリアはまるで自身が生きている細胞の様に、細胞内を動き回り、さらに融合、分裂を繰り返しながらその特徴的な形態を維持する（図1）。この特徴的なミトコンドリアの形態が維持できなくなると、ミトコンドリアの機能が低下し、ヒトの神経変性疾患や、心臓病などの原因となる事がわかっている。

ミトコンドリアを形成する外膜、内膜の2つの膜上には、膜融合を促進するタンパク質が存在する。また膜をくびりすることで分裂させるタンパク質が存在する。これら融合と、分裂の適切なバランスにより特徴的なミトコンドリアの形態が維持される事が知られている。このようなミトコンドリアの融合分裂機構はこれまでに盛んに研究され、その分子機構についての知見が蓄積されて来ている。一方、ミトコンドリアの融合分裂機構とは別に、ミトコンドリア膜を構成するリン脂質組成維持がミトコンドリア形態の維持に必須である事が最近の研究でわかってきた。ミトコンドリア形態維持機構におけるリン脂質の役割にはまだ不明であるが、リン脂質組成がミトコンドリア膜の流動性を適切に保つ事が一つの重要な要素であると予想される。そこで本研究では、細胞を熱処理することで、膜の流動性を人為的に変化させ、ミトコンドリアの形態にどのような変化が生じるかを観察した。

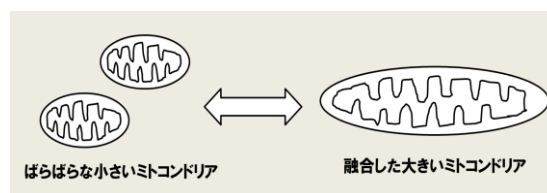


図1：融合と分裂をするミトコンドリア

2. 実験目的

本実験ではミトコンドリア局在型GFP(Green Fluorescent Protein)を発現する酵母菌を観察の対象とした。観察する酵母菌を熱処理または低温処理した後、蛍光顕微鏡下でミトコンドリアの形態の観察を行った。この際に1回の実験で約100個の細胞を観察する。観察されたミトコンドリア形態を（複数の特徴的な形態が観察された場合）、5つのカテゴリーに分け、その割合を算出す

ることとした。形態のカテゴリーはチューブ型、粒型、チューブ・粒混合型、凝集型、膜状型の5つである。この実験を3セット繰り返し、熱処理の有無、もしくは異なる熱処理条件でミトコンドリア形態を比較した。このような実験を行なう事により、ミトコンドリアが細胞外の熱環境に応じてその形態を変化させるのか、させないのか、もし変化する場合はどのような形状に変化するのかを明らかにする事が目的である。

3. 実験方法

3-1 実験の方針

実験目的でも述べたように、細胞外における環境の変化でミトコンドリアの形態がどのように変化をするか観察した。今回の実験ではさらに、酵母菌自身に変化を加えたある欠損株用意し、これに対しても同じような熱ストレスを与えてその変化を観察した。2つの条件の変化について具体的に述べる。

(i) 温度変化の条件

酵母細胞の適切な生育温度は30℃であり、一般的に酵母細胞に対する、高熱ストレスは37℃、低温ストレスは16℃でおこなわれる。そこで本実験においてもまず、37℃もしくは16℃の処理を30分、1時間、2時間行なった酵母細胞を用い、ミトコンドリア形態を観察した。観察されるミトコンドリア形態変化の結果に応じて、処理時間を長くしたり、短くしたりすることで、ミトコンドリア形態の時間依存的変化を検討した。

次にさらに厳しい熱環境である40度、50℃、60℃で5分間、10分間、15分間程度酵母細胞を処理した後のミトコンドリア形態を観察し、その形態に変化が生じるか、生じるとしたらどのような変化であるかを検討した。しかし、50度、60度の熱ストレスはいずれも酵母菌を死に至らしめるほど強すぎた。このため、酵母菌が死なない時間幅をメチレンブルーを使用した致死実験で確認し、この時間熱ストレスを与えてそのミトコンドリアの形態変化を観察した。

(ii) ミトコンドリア特異的リン脂質カルジオリピンを欠損させた酵母菌を用いた解析

ミトコンドリアで合成され、主にミトコンドリアの内膜に蓄積するカルジオリピンが合成できない変異酵母株が存在する。通常の条件ではこのカルジオリピンが無くてもミトコンドリア形態に全く変化はない。しかし(i)の熱ストレス、低温ストレス処理した場合に、野生型よりもミトコンドリア形態変化に強く影響するかを検討した。以降この欠損株と区別するためにカルジオリピン欠損がない株を野生型酵母と記述する。

与える条件の変化についての説明は以上である。では次に具体的に使用した機材や酵母菌、実験方法について述べる。

3-2 使用した機材と実験操作

3-2-1 酵母菌と培養法

今回の実験で使用した酵母菌とその培養法などについて述べる。使用した酵母菌はすべて野生酵母(もしくはカルジオリピン欠損酵母)に対して Su9-GFP、TRP1 を含むプラスミドベクターで形質転換したものを使用した。Su9 とはタンパク質をミトコンドリア内のマトリックスに運ぶプレ配列を意味し、今回はこれを GFP に取り付けている。TRP1 とはアミノ酸のひとつであり、酵母菌の生育に必須な栄養であるトリプトファンを合成する機能持つ配列である。GFP をもつ酵母菌のみを選択的に培養するためにトリプトファンを含まない培地で酵母菌を育てることで、この配列を含まない酵母菌を排除する。酵母菌はすべてコレクションチューブにいれた SCD-trp の液体培地中で培養した。

観察の対象とする酵母菌はコレクションチューブの吸光度から判断した。酵母菌の数は液体培地内ではその濃度に比例している。そしてその濃度は一回分裂するごとに2倍になっていく。これを踏まえて観察する時間で吸光度が 0.2~0.5 程度になるように事前に薄めて培養した。一回分裂するのにかかる時間は前日に記録した。今回の実験では最低 3 回は分裂するように培養し、吸光度の条件を満たさないものは破棄した。

3-2-2 観察機材と観察法

今回の実験では名古屋大学理学部化学科遠藤研の所有する共焦点顕微鏡を用いて観察した(図 2)。

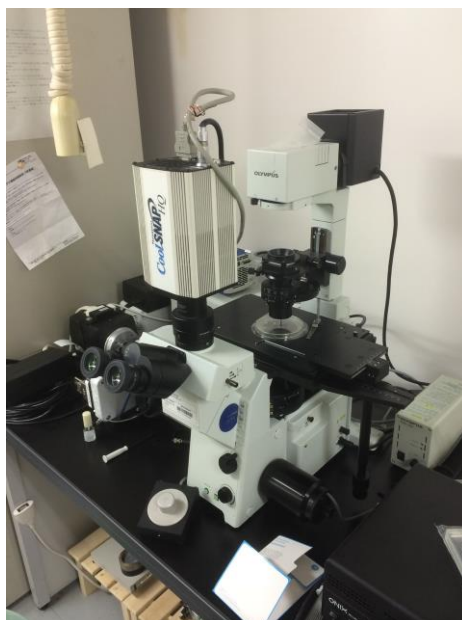


図 2：使用した共焦点顕微鏡

顕微鏡の倍率は 100 倍で、使用した機種はオリンパス株式会社の IX-71 OLYMPUS である。共

焦点スキャナユニットとして横河電機株式会社の CSU-X1 を、レンズはオリンパス社の UPLSAPO を、ソフトは MetaMorph を使用した。次にこれらの機材で行った観察方法について述べる。

3-2-1 章で述べたように培養した酵母菌を遠心分離にかけた後、液体培地をアスピレーターでとりのぞき、観察対象となる酵母菌を集めた。集まったところからピペットマンで微量取り出し、これをプレパラート上にのせて顕微鏡で観察した。さらに、解析のために酵母菌が存在する箇所を白色光で照らして撮影した。撮影した画像の例を図 3 に示す。

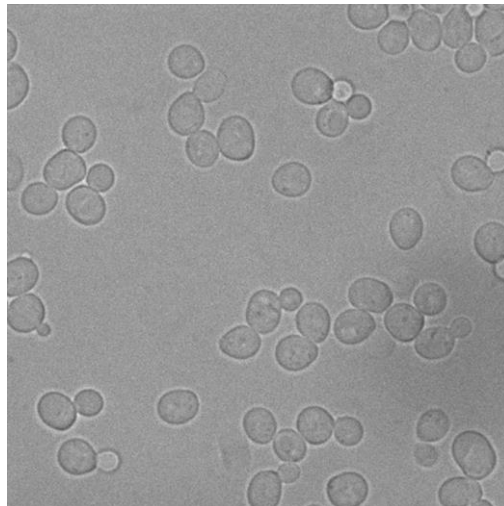


図 3：白色光で見た酵母菌の様子
(データ名：MK 37d30min 1-2 BF)

ミトコンドリアに存在する GFP を発光させるために 488nm の光で発色させた写真も合わせて撮影した。この方法で発色させたときには単に 1 枚のみを撮影するのではなく、z 軸を動かして 20 枚前後撮影した。断面を撮影したデータは重ね合わせたり、動かしたりすることで縦軸方向のミトコンドリアの様子を解析するために使用した。この方法で撮影し、重ね合わせた時の画像データの例を図 4 に示す。

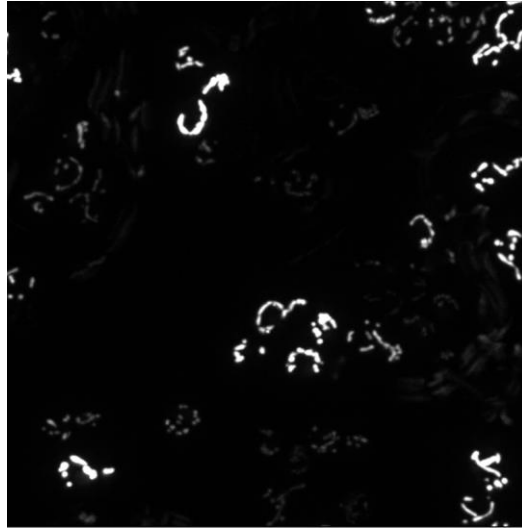


図 4：発色させたときの酵母菌の様子
(データ名：MK 37d30min 1-2)

二つのデータを合わせることでより正確に酵母菌に存在するミトコンドリアの様子を確認できる。この例を図 5 に示す。

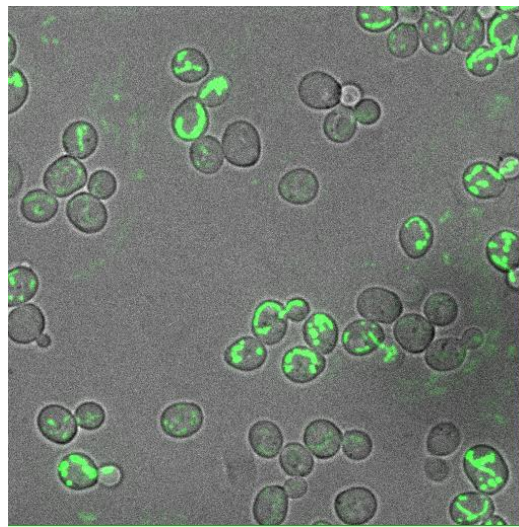


図 5：図 2 と図 3 を重ね合わせた時の様子

図 4 の様に、重ね合わせると酵母菌の中に存在するミトコンドリアの形態が見て取れる。図 4 にはチューブの様に長く存在しているものもあれば粒の様にばらばらになって存在しているものもある。この形態をメンバーで確認し、5つの分類に分けていった。この分類の仕方は次の3-2-3章にて詳しく述べる。

観察者の名前の頭文字、その時与えた環境条件、観察回数(3回中何回目か)、枚数、発光方法(白色光か GFP を発色させたものか)で管理した。たとえば観察した酵母が 5 分間 40 度の熱ストレスを与えた野生型酵母で観察者が松本、観察回数が 1 回目で枚数が 3 枚目、白色で撮影した場合、MK-40d5min-1-3 BF となる。GFP を発色させなかったものは最後に何も表記しなかった。以後画像データを表記する際にもこのデータ名を使用する。

3-2-3 解析の方法について

3-2-2章で述べた方法で酵母菌を撮影した後に、今度は撮影した酵母菌をミトコンドリアの形態によって5つのカテゴリーに分類し、その数を数えた。数えた総数はサンプル一つごとに100個確認した。分類のカテゴリーは形態のカテゴリーはチューブ型、粒型、チューブ・粒混合型、凝集型、膜状型の5つである。この分類の判断は視認で行った。どのような形態がそのカテゴリーに分類されるかの判断基準について画像の例と合わせて述べる。使用した画像は基本的に重ね合わせたものを使用した。

チューブ型と判断した例を図6に示す。図の様にミトコンドリアが酵母菌の細胞膜に沿って細長く存在しているものをチューブ型と判断した。

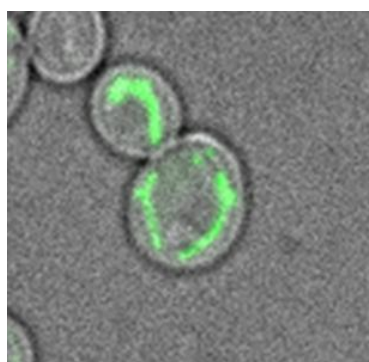


図6：チューブ状のミトコンドリア
(データ名：OR crd1der 16d1hr 3-3)

粒状型と判断した例を図7に示す。図の様に小さなミトコンドリアが複数存在し、まばらに酵母菌内に存在したものを粒状と判断した。

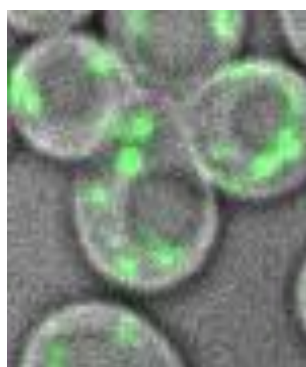


図7：粒状のミトコンドリア
(データ名：MK 50d6min 1-6)

チューブ・粒状混在型と判断した例を図8に示す。前述したチューブ状のミトコンドリアと粒状のミトコンドリアがどちらも存在しているものを混在型とした。

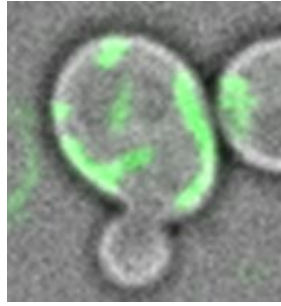


図 8：チューブ・粒混在型
(データ名：MK 50d3min 2-3)

凝集型と判断した例を図 9 に示す。ミトコンドリアが一つの粒のように凝集して大きな塊のような形態のものを凝集型とした。

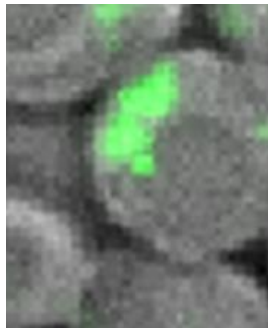


図 9：凝集型のミトコンドリア
(データ名：MK 50d5min 3-5)

最後に膜状型と判断した例を図 10 に示す。ミトコンドリアが酵母菌内に膜の様に広がっているものを膜状型とした。

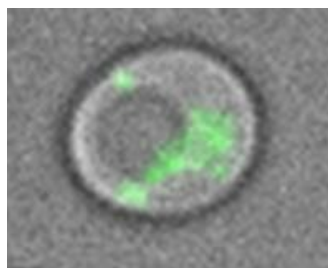


図 10：膜状型のミトコンドリア
(データ名：MK 50d5min 1-3)

数え終わったらその個数を統計的に整理した。3 回サンプルを観察したので、その平均と、標準偏差、標準誤差をそれぞれ計算した。

解析方法に関しては以上である。

3-2-4 熱ストレスの与え方

熱ストレスは酵母と液体培地が入ったコレクションチューブを湯浴または冷水に規定時間浸けることで与えた。使用した湯浴は自動で温度調整でき、常に攪拌できるような装置であるサーモミルダーを使用した。装置を図 11 に示す。



図 11：サーモミルダー

ここで、実験の大まかな流れについてまとめておく。まず、前日に観察できるように希釈した酵母菌と液体培地が含まれているコレクションチューブの吸光度を測る。ここで吸光度が 0.2～0.5 となっているかをよく確認する。吸光度が条件を満たしていたら、分裂して吸光度が増加する前にサーモミルダーの水の温度を調整し、これにコレクションチューブごと規定時間浸ける。つけ終わった後すぐさま遠心分離と液体培地の排除を行い、できるだけ時間を空けないようにして顕微鏡で観察と撮影を行う。以上が実験の流れである。基本的に全メンバーがこの流れに沿って実験を行った。

3-2-5 致死確認実験について

50 度で 15 分の熱ストレスを与えたサンプルを観察していた時に、酵母菌内に振動している丸い物体が観測された。この酵母菌の様子を図 12 に示す。この物体は 50 度の熱ストレスを与えた時に初めて観察された。当初はこの物体の正体が皆目見当もつかなかったが、おそらく、細胞内に存在するタンパク質が熱によって構造を維持できなくなり、それが凝集してしまった結果だと考えられた。タンパク質が凝集しているなら、この酵母菌は死んでいる可能性が高く、観察する意味を持たない。

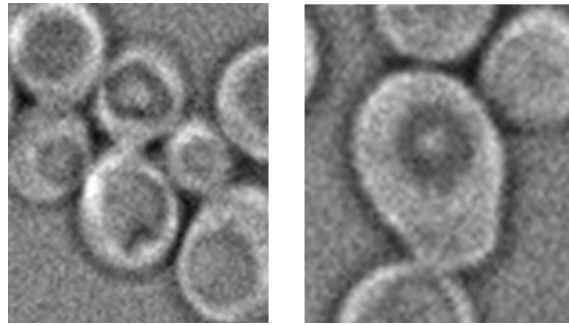


図 12：酵母菌内に存在する白い物体
細胞内の液胞の中に白いものが存在している
(データ名：MK 15d15min 1-2 BF)

そこで、強い熱ストレスである 40 度、50 度、60 度の場合に限って、事前に死んでしまうかどうかを確認することにした。この確認実験はカルジオリピン欠損株に対しても行った。

死んでいるかどうかを判断するために酸化還元色素であるメチレンブルーを用いることにした。メチレンブルー(methylene blue)は液体中で青色に染まる物質である。細胞が生きている場合、メチレンブルーは細胞によって還元されて無色になる。一方死んでいる場合は還元されないために青色のままになる。この変化を顕微鏡で確認して死んでいるかどうか個数を数えて判断した。酵母菌の致死を確認する方法はそもそも調べても存在しなかったのでメンバーと試行錯誤を繰り返した。まず、メチレンブルーで染めて本当に顕微鏡でわかるかどうかから確認した。酵母菌を確実に死に至らしめる環境に置いてからメチレンブルーで染め、顕微鏡でその様子がどうなっているかを観察したのである。この操作と結果について次に述べる。

実験で使用したメチレンブルーは研究室内にあったので提供してもらった。まず、メチレンブルーを約 5mg 測り取り、SCD-trp 液体培地 1ml に溶かして 0.1%メチレンブルー溶液を調整した。事前に用意した、吸光度が 0.5 以内の酵母菌を 1.5ml エッペンドルフチューブ 4 つに 1ml ずつ入れて分けた。このエッペンドルフチューブを 94 度環境下に 10 分間置いて酵母菌を確実に殺した。この後、4 つの内 3 つに対して 0.1%メチレンブルー溶液を 100 μ l、200 μ l、400 μ l それぞれ入れた。残ったひとつには何も入れず、メチレンブルーを入れていない確認用のサンプルとした。メチレンブルー溶液を入れた後、10 分間さらに時間をおいた。時間がたったら、顕微鏡でそれぞれ観察した。

結果はメチレンブルー溶液が致死確認出来ることを示していた。まず、メチレンブルーをくわえなかった時の画像を図 13 に示す。酵母菌は死んでいるはずだが、その色の変化は見受けられない。次に、100 μ l 入れたものを図 14 に、200 μ l 入れたものを図 15 に、400 μ l 入れたものを図 16 にそれぞれ示す。撮影枚数はひとつのサンプルごとに 5 枚とした。

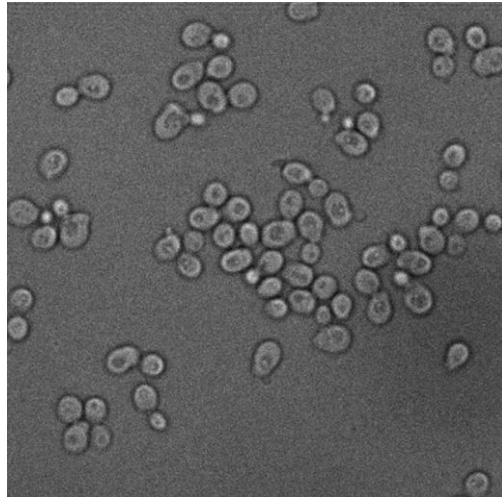


図 13：メチレンブルーを入れなかった様子
(データ名：MK 94d10min 1-2)

カメラではなく、目で観察してみてもその変化は分からなかった。

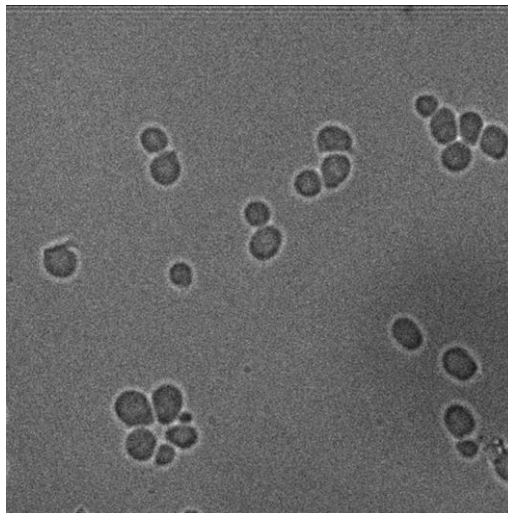


図 14：メチレンブルーを 100 μ l 入れた様子
(データ名：MK 94d10min mb100 1-1)

図 13 と比べてもあまり変化は見受けられず、量が足りないことがわかる。

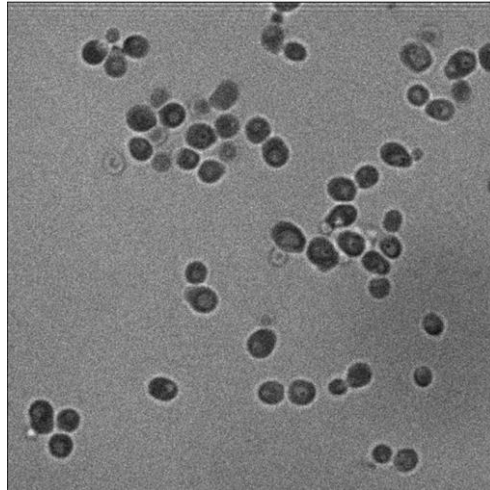


図 15：メチレンブルーを 200 μ l 入れた様子
(データ名：MK 94d10min mb200 1-5)

かなり黒く染まっていることが確認できる。カメラではなく目で見ても酵母菌が青く染まっていることがわかった。

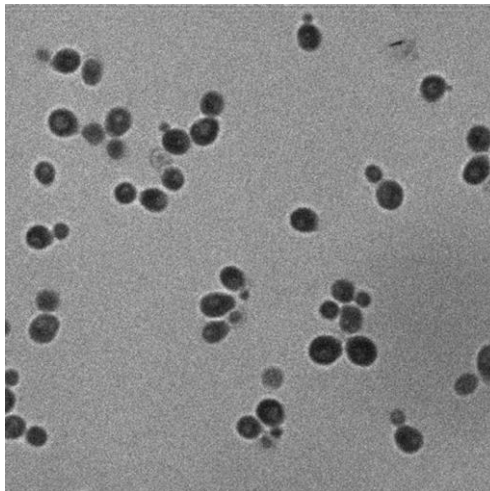


図 16：メチレンブルーを 400 μ l 入れた様子
(データ名：MK 94d10min mb400 1-4)

図 13 とくらべてみてもはっきりと酵母菌が染まっていることがわかる。400 μ l 加えることではっきりと染色できることを明らかにした。30 度で培養した酵母菌に対してもメチレンブルーを加えて 10 分間置き、その酵母菌が染まらないことを確認した。その時の様子を図 17 に示す。撮影は 10 枚行った。

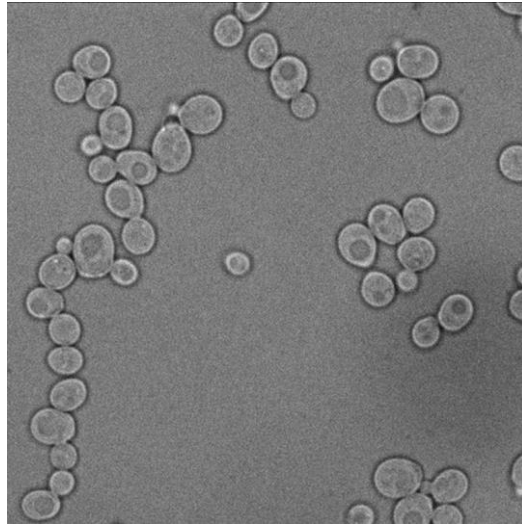


図 17：30 度で培養した酵母菌にメチレンブルー溶液 400 μ l 加えた時の様子

図 17 を見るとわかるように酵母菌の色は全く変化していない。

以上の確認実験で致死実験の方法を確立した。酵母菌をエッペンドルフチューブに 1ml ずつ移し、指定の温度と時間で加熱する。そのあと、0.1%メチレンブルー溶液を 400 μ l 加えて 10 分間置く。青色に染まっている酵母菌がどのくらい存在しているかを顕微鏡で確認しその数を数える。数はその場でランダムに 50 個程度数え、そのうちどのくらいの割合が染まっているかを確認した。この確認を一つの条件に対して 3 回行い、その平均を死んでいる割合(致死率)とした。致死実験の時は全てこの方法に従った。4-1 章の致死実験の結果にてこの割合についてまとめて述べる。

以上が実験方法である。基本的に 3-2-4 章にてまとめた流れに沿って実験を進め、データを取得し、3-2-5 章にまとめた方法でデータを解析した。次の章では得られた実験結果を詳しく述べる。

4. 実験結果

4-1 致死実験の結果

40 度の致死実験の結果から述べる。野生型酵母菌を 40 度の環境下に 15 分間置いたサンプルを観察したところ、メチレンブルーで染まっているサンプルは 1 つも存在しなかった。よって、40 度の熱ストレスを与えた時は 15 分以内であれば、酵母菌を死に至らしめないことがわかった。今回の実験では 40 度の熱ストレスに関しては時間の変更をせずに観察を行った。すなわち、5 分間、10 分間、15 分間 40 度の熱ストレスを与えたサンプルを用意し、ミトコンドリアを分類することにした。カルジオリピン欠損株に対しても全く同じように実験を行ったが、やはり全く変化はしなかった。

次に 50 度の致死実験の結果を述べる。50 度の致死率を時間に対して示したものを表 1 に示す。

	5 分	6 分	6 分 30 秒
致死率 (%)	1.04	4.89	11.4

表 1：50 度の時間と致死率

6 分 30 秒からは致死率が 10%を超えてしまった。観察しているサンプルの 10%近くが棄却すべきデータだとするとデータの正確さがかなり失われる恐れがある。したがって、今回の実験では 50 度の熱ストレスを 6 分、5 分、3 分あたえたサンプルを用意し、ミトコンドリアの分類を行うことにした。

最後に 60 度の致死実験の結果を述べる。野生型酵母を観察したところ 60 度の結果はかなり極端になってしまった。3 分間熱ストレスを与えた時にはほぼすべての酵母菌が死滅してしまった。しかし、1 分間程度の熱ストレスでは酵母菌は全く死んでいなかった。わずか 2 分程度でこれほどの差が出てしまったのは熱ではない他の影響が絡んでいると予想される。おそらく、原因は酵母菌が入っている容器の熱の伝わりやすさだと考えられる。1 分程度では容器にしか熱は伝わっていないが、3 分では熱が酵母菌に伝わりはじめ、たちまち死に至ってしまったのだろう。この微妙な時間の違いでミトコンドリアの形態が変化するとは考えにくいので、60 度に関する実験はとりやめることにした。カルジオリピン欠損株も野生型酵母の場合と比較できないようであればあまり意味がないと思われたので、とりやめた。

結局、60 度は観察をとりやめ、40 度に関しては時間変更をせず、50 度の場合は時間をかなり短くした。致死実験に関する結果は以上である。

4-2 解析の結果

解析で得られたデータを表とグラフを用いて示す。野生型酵母の結果から順に示す。まず、何も変化を与えなかった 30 度で培養した結果について示す。数えた結果を表 2 にまとめた。

30 度						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	73	36	60	56	19	11
粒	1	26	10	12	13	7
チューブ・粒	23	37	29	30	7	4
凝集	3	1	1	2	1	1
膜状	0	0	0	0	0	0
計	100	100	100	100		

表 2：野生型酵母 30 度での培養結果

総じてチューブ状のものが多く、粒状のものはかなり少なかった。次に 37 度の熱ストレスを与えた結果を示す。37 度の環境下で 30 分間置いた結果は表 3 の様になった。

37 度 30min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	31	93	84	69	36	19
粒	16	0	2	6	9	5
チューブ・粒	46	6	1	18	25	14
凝集	7	1	7	5	3	2
膜状	0	0	6	2	3	2
計	100	100	100	100		

表 3：野生型酵母 37 度の熱ストレスを 30 分間与えた結果

やはり、チューブ状のものが圧倒的に多く存在した。37 度の環境下で 1 時間置いた結果は表 4 の様になった。

37 度 1hr						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	97	53	86	79	23	13
粒	3	3	0	2	2	1
チューブ・粒	0	30	3	11	17	10
凝集	0	14	4	6	7	4
膜状	0	0	7	2	4	2
計	100	100	100	100		

表 4：野生型酵母 37 度の熱ストレスを 1 時間与えた結果

30 分後の結果と比べてもあまり大きな変化が見られなかった。チューブ状がやはり圧倒的に多く存在した。37 度の環境下で 2 時間置いた結果は表 5 の様になった。

37 度 2hr						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	57	99	72	76	21	12
粒	6	0	3	3	3	2
チューブ・粒	33	0	15	16	17	10
凝集	2	1	5	3	2	1
膜状	2	0	5	2	3	1
計	100	100	100	100		

表 5：野生型酵母 37 度の熱ストレスを 2 時間与えた結果

30 分後、1 時間後の結果とあまり変わらなかった。これらの結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 18 に示す。

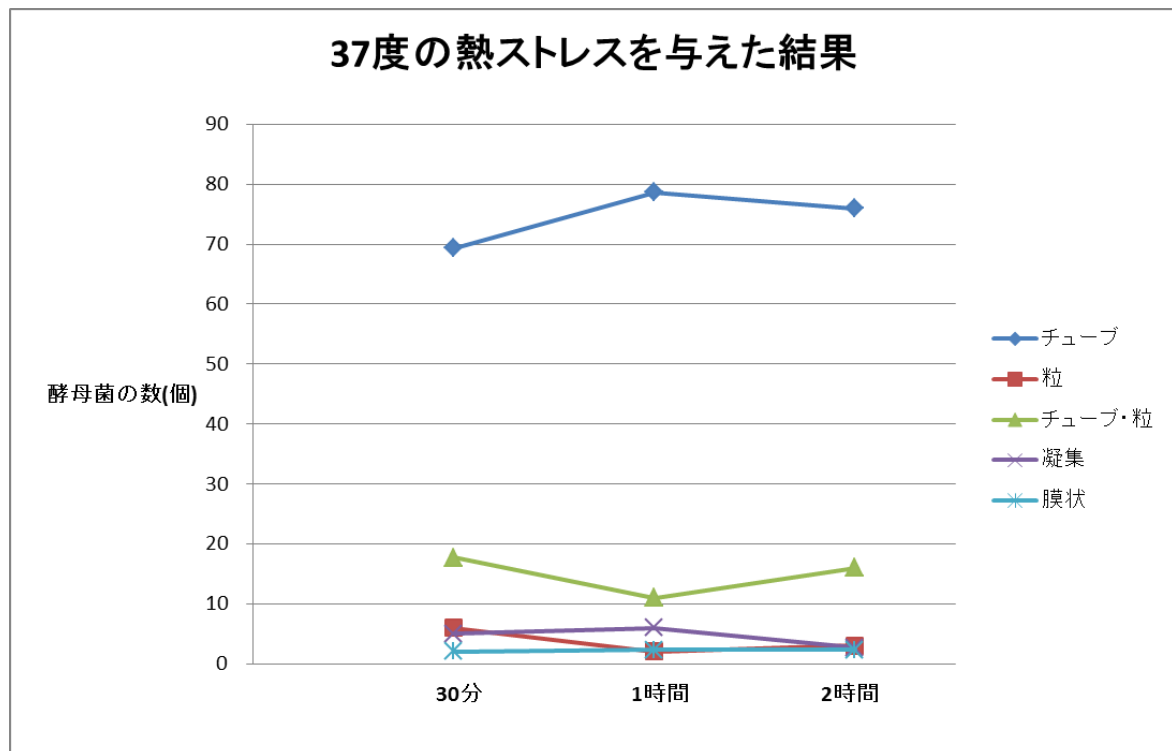


図 18：野生型酵母 37 度の熱ストレスを与えた結果

グラフで見るとよく分かるが、総じてチューブ状が多く、その数にはあまり大きな変化が見受けられないことがわかる。今度は 16 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

16 度 30min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	68	78	53	66	13	7
粒	3	2	18	8	9	5
チューブ・粒	15	11	29	18	9	5
凝集	10	7	0	6	5	3
膜状	4	2	0	2	2	1
計	100	100	100	100		

表 6：野生型酵母 16 度の熱ストレスを 30 分間与えた結果

16 度の環境下で 30 分間置いた結果は表 6 の様になった。チューブ状のものが圧倒的に多く存在した。16 度の環境下で 1 時間置いた結果は次ページの表 7 の様になった。

16 度 1hr						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	80	72	68	73	6	4
粒	3	1	11	5	5	3
チューブ・粒	7	17	19	14	6	4
凝集	6	3	2	4	2	1
膜状	4	7	0	4	4	2
計	100	100	100	100		

表 7：野生型酵母 16 度の熱ストレスを 1 時間与えた結果

やはり、チューブ状の個数が圧倒的であった。30 分間の結果よりもさらにその個数は増えた。16 度の環境下で 1 時間置いた結果は次ページの表 8 の様になった。

16 度 2hr						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	53	72	57	61	10	6
粒	19	3	9	10	8	5
チューブ・粒	27	15	29	24	8	4
凝集	1	5	4	3	2	1
膜状	0	5	1	2	3	2
計	100	100	100	100		

表 8：野生型酵母 16 度の熱ストレスを 2 時間与えた結果

チューブ状の個数は減ってしまったが、チューブ・粒混在型の個数がさらに増えた。チューブ状のものがより増えたと考えられる。これらの結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 19 に示す。

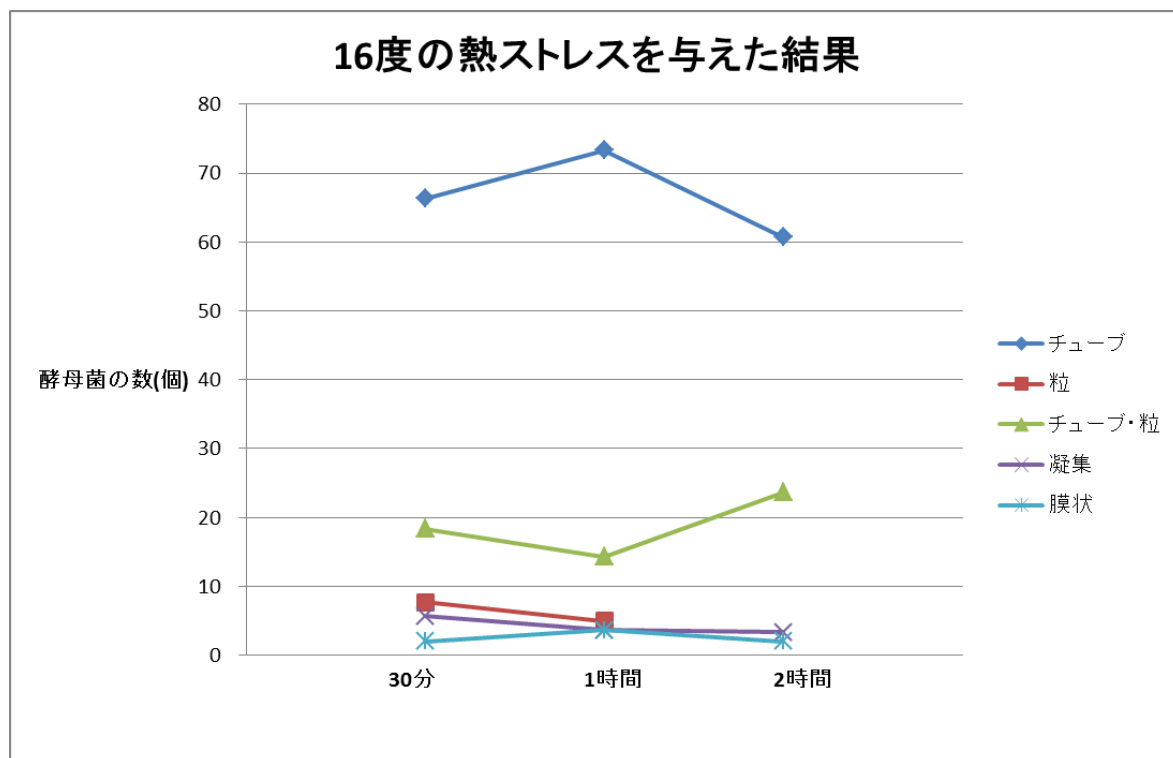


図 19：野生型酵母 16 度の熱ストレスを与えた結果

チューブ状のものが圧倒的に多く存在していた。また、そのチューブ状の個数は 30 度の時のチューブ状の個数に比べてもかなり多くなっていた。40 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

40 度 5min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	87	46	42	58	25	14
粒	5	18	8	10	7	4
チューブ・粒	5	35	41	27	19	11
凝集	3	1	9	4	4	2
膜状	0	0	0	0	0	0
計	100	100	100	100		

表 9：野生型酵母 40 度の熱ストレスを 5 分間与えた結果

40 度の環境下で 5 分間置いた結果は表 9 の様になった。チューブ状のものが多かったが、チューブ・粒の混在型のものも比較的多く存在した。40 度の環境下で 10 分間置いた結果は次ページの表 10 の様になった。

40 度 10min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	38	92	80	70	28	16
粒	34	1	1	12	19	11
チューブ・粒	24	3	19	15	11	6
凝集	4	4	0	3	2	1
膜状	0	0	0	0	0	0
計	100	100	100	100		

表 10：野生型酵母 40 度の熱ストレスを 10 分間与えた結果

チューブ状のものが増えた。一方で粒状のものも増えた。40 度の環境下で 15 分間置いた結果は次ページの表 11 の様になった。

40 度 15min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	34	56	38	43	12	7
粒	39	6	28	24	17	10
チューブ・粒	24	25	34	28	6	3
凝集	2	12	0	5	6	4
膜状	1	1	0	1	1	0
計	100	100	100	100		

表 11：野生型酵母 40 度の熱ストレスを 15 分間与えた結果

チューブ状のものが減り、粒状型、チューブ・粒混在型のものがより増えた。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 20 に示す。

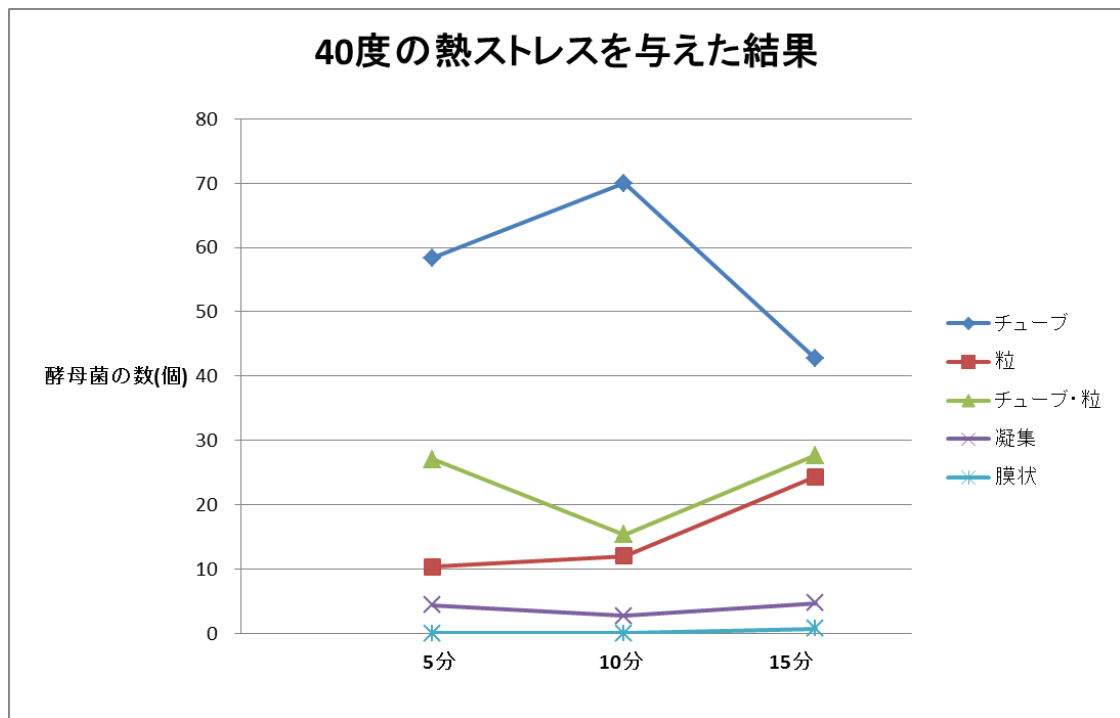


図 20：野生型酵母 40 度の熱ストレスを与えた結果

チューブ状の割合がやはり多く存在したが、時間がたつにつれて確実に粒状のものが増えていることが見て取れる。50 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

50 度 3min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	7	24	20	17	9	5
粒	28	35	50	38	11	6
チューブ・粒	16	32	23	24	8	5
凝集	40	4	7	17	20	12
膜状	9	5	0	5	5	3
計	100	100	100	100		

表 12：野生型酵母 50 度の熱ストレスを 3 分間与えた結果

50 度の環境下で 3 分間置いた結果は表 12 の様になった。ある形態が圧倒的にその割合を占めるような状態ではなくなってきた。その中でも粒状の個数がかなり多く存在した。50 度の環境下で 5 分間置いた結果は次ページの表 13 の様になった。

50 度 5min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	3	18	8	10	8	4
粒	33	51	62	49	15	8
チューブ・粒	48	22	23	31	15	9
凝集	15	5	6	9	6	3
膜状	1	4	1	2	2	1
計	100	100	100	100		

表 13：野生型酵母 50 度の熱ストレスを 5 分間与えた結果

3 分間よりも粒状の個数が増えた。一方でチューブ状の個数が減少した。50 度の環境下で 6 分間置いた結果は次ページの表 14 の様になった。

50 度 6min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	5	5	13	8	5	3
粒	43	61	68	57	13	7
チューブ・粒	44	27	14	28	15	9
凝集	8	5	4	6	2	1
膜状	0	2	1	1	1	1
計	100	100	100	100		

表 14：野生型酵母 50 度の熱ストレスを 6 分間与えた結果

粒状の個数がさらに増えた。そして、やはりチューブ状の個数がより減少した。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 21 に示す。

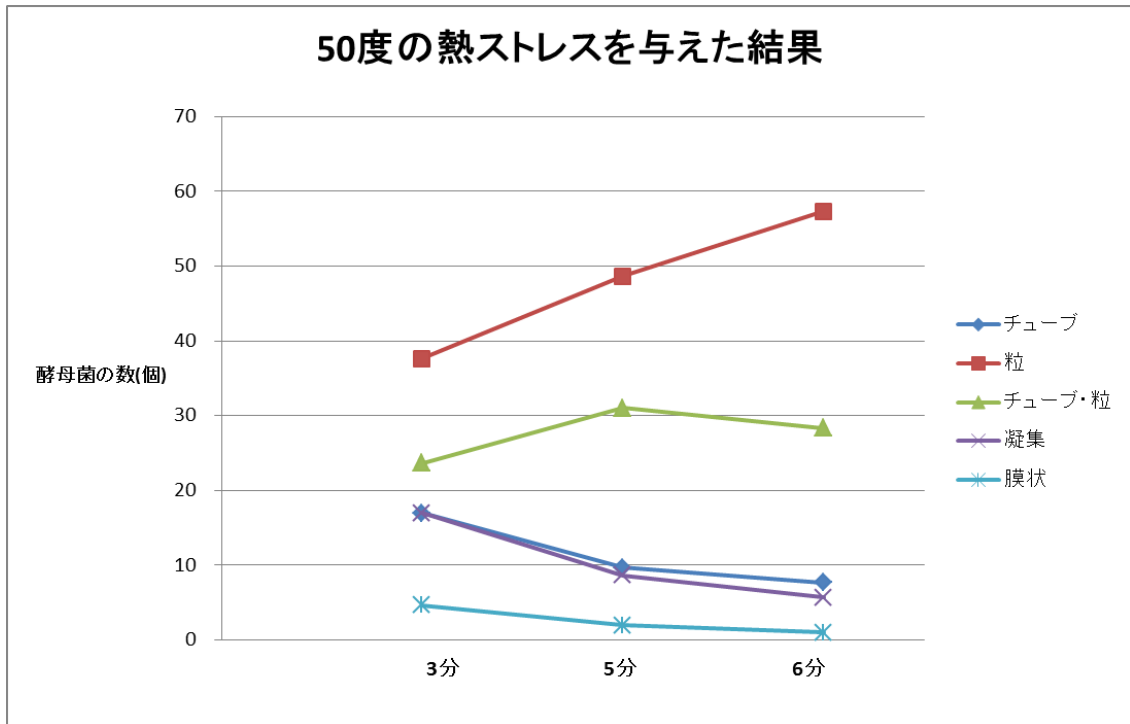


図 21：野生型酵母 50 度の熱ストレスを与えた結果

グラフで見ると、今までの結果と明らかに異なることがわかる。チューブ状の個数は減少傾向になったが、粒状の個数は逆に増えていった。また、粒状がかなり多く存在していることがグラフからわかる。野生型酵母に関する実験結果は以上である。

カルジオリピン欠損酵母に関する実験結果を示す。まず、何も変化を与えなかった 30 度で培養した結果について示す。数えた結果を表 2 にまとめた。

30 度				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	3	77	81	54
粒	29	2	5	12
チューブ・粒	14	6	12	11
凝集	8	0	0	3
膜状	46	0	2	16
計	100	85	100	95

表 15：カルジオリピン欠損酵母 30 度での培養結果

個数を数える段階で、数が 100 個にならないサンプルが 1 つ存在した。実験の時間的な都合上、もう一度行うことができなかった。グラフでその変化を読み取る際には全体の個数を 100 とし、その平均値をとってプロットした。カルジオリピン欠損酵母はこのような事態がいくつかのサンプルでも発生してしまったので、同じように数をそろえてその平均値をとり、グ

ラフにプロットした。30 度の段階ではチューブ状の個数がやはり多かったが、野生型酵母と比べてある形態が圧倒的にその割合を占める結果にはならなかった。37 度の環境下で 30 分間置いた結果は表 16 の様になった。

37 度 30min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	5	72	31	36	34	20
粒	1	3	36	13	20	11
チューブ・粒	12	22	30	21	9	5
凝集	8	3	3	5	3	2
膜状	74	0	0	25	43	25
計	100	100	100	100		

表 16：カルジオリピン欠損酵母 37 度の熱ストレスを 30 分間与えた結果

30 度の結果と同じようにチューブ状の個数が多かったが、やはりその割合は少なかった。また、膜状の個数が野生型酵母に比べて多くなっていた。37 度の環境下で 30 分間置いた結果は表 17 の様になった。

37 度 1hr				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	13	64	62	46
粒	3	3	11	6
チューブ・粒	3	20	24	16
凝集	8	7	2	6
膜状	73	1	1	25
計	100	95	100	98

表 17：カルジオリピン欠損酵母 37 度の熱ストレスを 1 時間与えた結果

チューブ状の個数が増えた。しかし、膜状の個数は安定して変わらなかった。サンプル数が足りなかったので 30 度の時と同じような処理を行った。37 度の環境下で 2 時間置いた結果は表 18 の様になった。

37 度 2hr				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	0	76	68	48
粒	3	2	2	2
チューブ・粒	15	17	7	13
凝集	12	3	2	6
膜状	70	2	1	24
計	100	100	80	93

表 18：カルジオリピン欠損酵母 37 度の熱ストレスを 2 時間与えた結果

チューブ状の個数がさらに増えた。サンプル数が足りなかったので 30 度の時と同じような処理を行った。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 22 に示す。

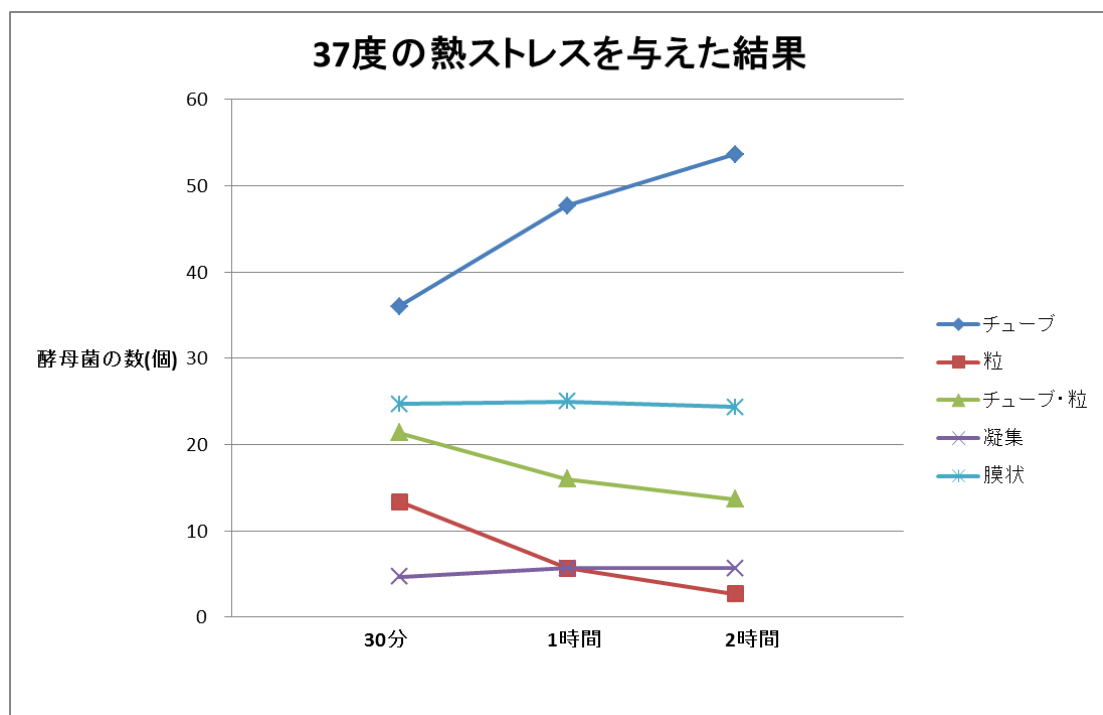


図 22：カルジオリピン欠損酵母 37 度の熱ストレスを与えた結果

グラフにしてより明確にわかるが、野生型酵母のように圧倒的にその割合を占めるような結果にはならなかった。今度は 16 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

16 度 30min				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	14	57	33	35
粒	6	14	17	12
チューブ・粒	6	7	17	10
凝集	23	2	4	10
膜網目	51	1	0	17
計	100	81	71	84

表 19：カルジオリピン欠損酵母 16 度の熱ストレスを 30 分間与えた結果

16 度の環境下で 30 分間置いた結果は表 19 の様になった。チューブ状のものが多く存在したが、膜状の個数もかなり多く存在した。サンプル数が足りなかったので 30 度の時と同じような処理を行った。16 度の環境下で 1 時間置いた結果は表 20 の様になった。16 度の環境下で 1 時間置いた結果は次ページの表 20 の様になった。

16 度 1hr				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	10	55	56	40
粒	4	26	19	16
チューブ・粒	0	17	21	13
凝集	28	2	4	11
膜網目	55	0	0	18
計	97	100	100	99

表 20：カルジオリピン欠損酵母 16 度の熱ストレスを 1 時間与えた結果

膜状の個数が増えて、チューブ状の個数は減った。サンプル数が足りなかったので 30 度の時と同じような処理を行った。16 度の環境下で 1 時間置いた結果は次ページの表 21 の様になった。

16 度 2hr						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	16	63	69	49	29	17
粒	6	4	3	4	2	1
チューブ・粒	6	29	26	20	13	7
凝集	11	2	2	5	5	3
膜網目	61	2	0	21	35	20
計	100	100	100	100		

表 21：カルジオリピン欠損酵母 16 度の熱ストレスを 2 時間与えた結果

膜状の個数が増えた。一方でチューブ状のものも増えた。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 23 に示す。

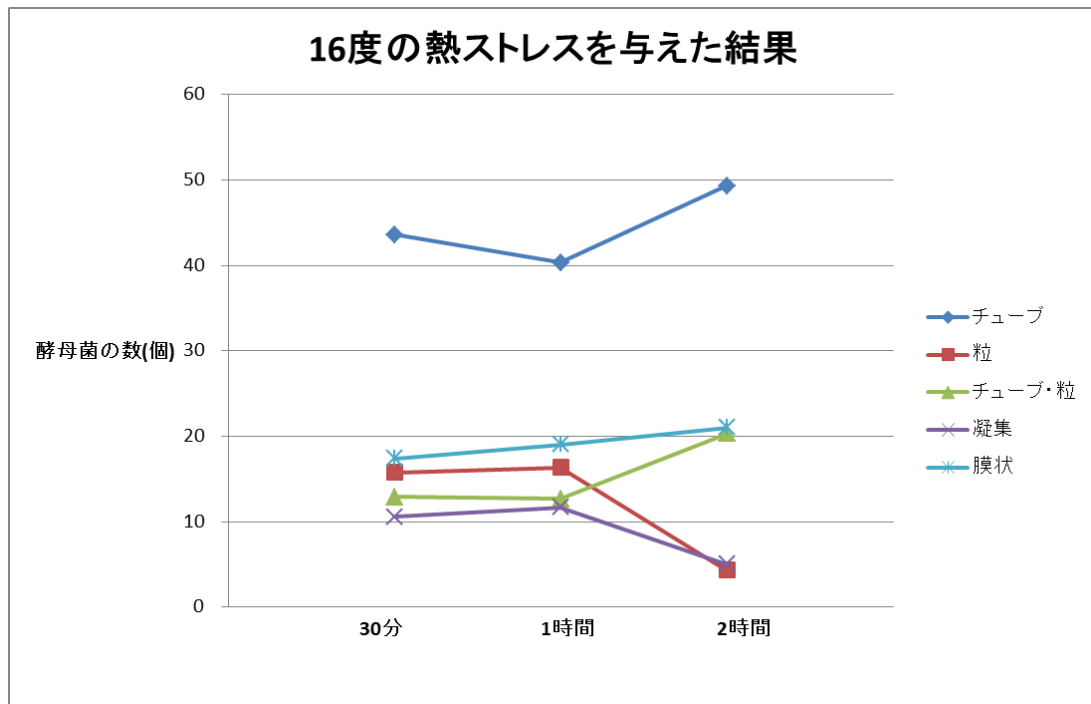


図 23：カルジオリピン欠損酵母 16 度の熱ストレスを与えた結果

時間に対して何らかの明確な相関性が見受けられなかった。数えた個数が少なかったためにデータに正確さが失われてしまった可能性が高い。40 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

40 度 5min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	19	19	39	26	12	7
粒	17	32	15	21	9	5
チューブ・粒	5	44	41	30	22	13
凝集	46	4	5	18	24	14
膜状	13	1	0	5	7	4
計	100	100	100	100		

表 22：カルジオリピン欠損酵母 40 度の熱ストレスを 5 分間与えた結果

40 度の環境下で 5 分間置いた結果は表 22 の様になった。ある形態が圧倒的に多くの割合を占めるような結果にはやはりならなかった。チューブ状の個数が多かったが、粒状の個数も同じくらい多く存在していた。40 度の環境下で 10 分間置いた結果は表 23 の様になった。

40 度 10min				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	10	31	40	27
粒	21	24	18	21
チューブ・粒	3	15	38	19
凝集	41	4	3	16
膜状	25	2	1	9
計	100	76	100	92

表 23：カルジオリピン欠損酵母 40 度の熱ストレスを 10 分間与えた結果

サンプル数が足りなかったなので 30 度の時と同じような処理を行った。チューブ、粒ともに個数あまり変化しなかった。40 度の環境下で 15 分間置いた結果は次ページの表 24 の様になった。

40 度 15min				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	20	39	30	30
粒	15	17	30	21
チューブ・粒	3	41	27	24
凝集	32	3	7	14
膜状	30	0	4	11
計	100	100	98	99

表 24：カルジオリピン欠損酵母 40 度の熱ストレスを 15 分間与えた結果

サンプル数が足りなかったなので 30 度の時と同じような処理を行った。チューブ、粒ともに個数あまり変化しなかった。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめた。このグラフを図 24 に示す。

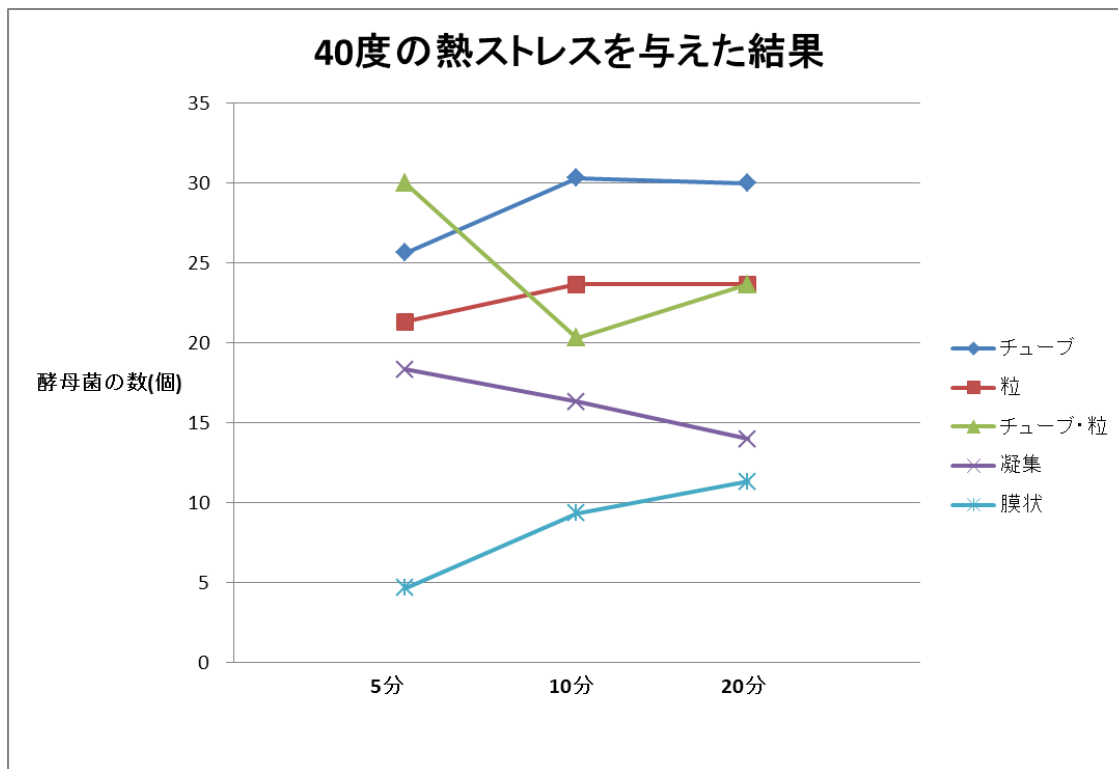


図 24：カルジオリピン欠損酵母 40 度の熱ストレスを与えた結果

図 24 をみるとわかるように、ある形態が圧倒的にその割合を占めるような結果にはならなかった。しかしながら、やはりチューブ状の個数がかなり多かった。最後に 50 度の熱ストレスを与えた結果を示す。

50 度 3min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	1	30	22	18	15	9
粒	54	36	40	43	9	5
チューブ・粒	0	26	34	20	18	10
凝集	37	4	2	14	20	11
膜状	8	4	2	5	3	2
計	100	100	100	100		

表 25：カルジオリピン欠損酵母 50 度の熱ストレスを 3 分間与えた結果

50 度の環境下で 3 分間置いた結果は表 12 の様になった。粒状の個数が圧倒的に多く存在した。50 度の環境下で 5 分間置いた結果は次ページの表 13 の様になった。

50 度 5min						
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差	標準誤差
チューブ	6	13	7	9	4	2
粒	64	63	72	66	5	3
チューブ・粒	6	22	18	15	8	5
凝集	20	2	3	8	10	6
膜状	4	0	0	1	2	1
計	100	100	100	100		

表 26：カルジオリピン欠損酵母 50 度の熱ストレスを 5 分間与えた結果

3 分間の結果よりも粒状の個数がより増えた。粒状の個数がその過半数を占めた。50 度の環境下で 6 分間置いた結果は次ページの表 27 の様になった。

50 度 6min				
	1 回目	2 回目	3 回目	平均
チューブ	0	6	8	5
粒	63	63	61	62
チューブ・粒	6	22	27	18
凝集	25	0	2	9
膜状	6	2	2	3
計	100	93	100	98

表 27：カルジオリピン欠損酵母 50 度の熱ストレスを 6 分間与えた結果

サンプル数が足りなかったなので 30 度の時と同じような処理を行った。5 分間の解きとその結果はあまり変わらなかった。結果を、時間に対して個数の平均値をプロットしたグラフにまとめ

た。このグラフを図 25 に示す。

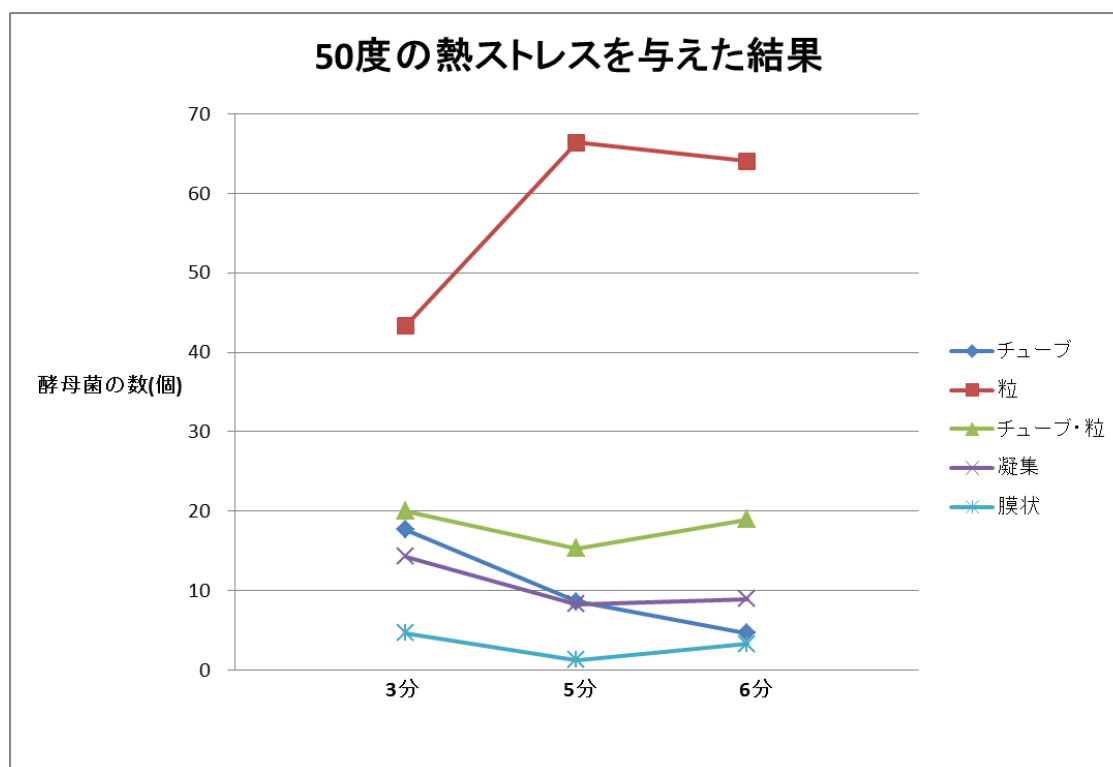


図 25：カルジオリピン欠損酵母 50 度の熱ストレスを与えた結果

野生型酵母の 50 度結果と同じように、粒状の個数が非常に多かった。50 度の高温状態に置くと粒状の個数が圧倒的な割合を占めるということはどちらにも共通する事実だと考えられる。

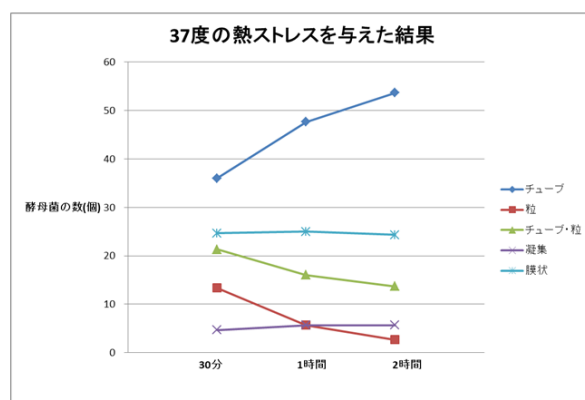
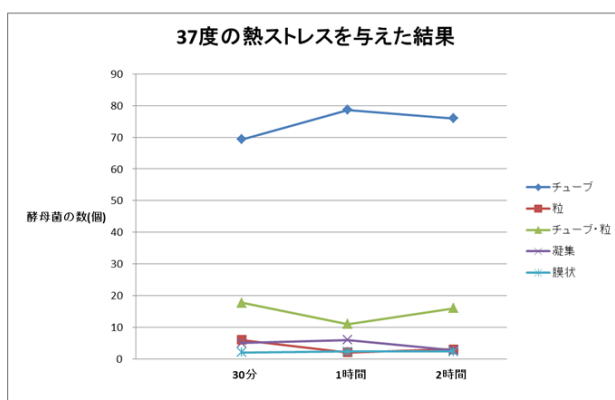
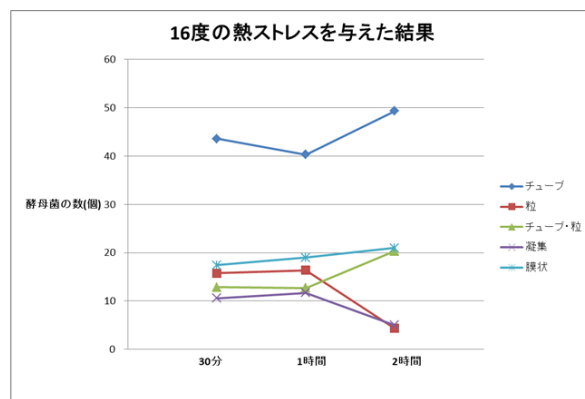
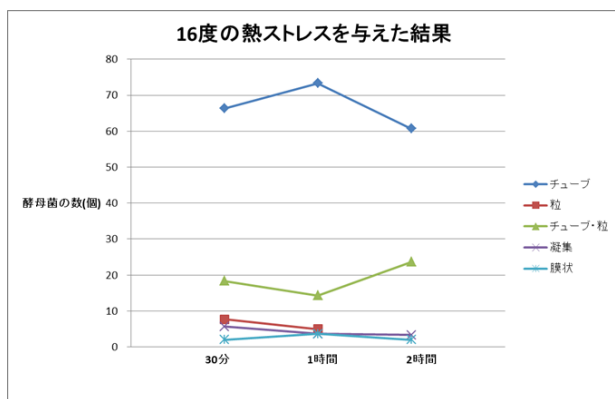
実験の結果は以上である。次の章でこれらの結果を踏まえた考察について述べる。

5. 考察

結果で得られたグラフをもとにその変化についてまとめ、その原因について考察を行った。温度の変化を基準に野生型酵母とカルジオリピン欠損酵母のどちらとも比較、考察していく。

5-1 16 度と 37 度の結果の比較について

実験結果の 16 度と 37 度のグラフを並べて次のページに示した。



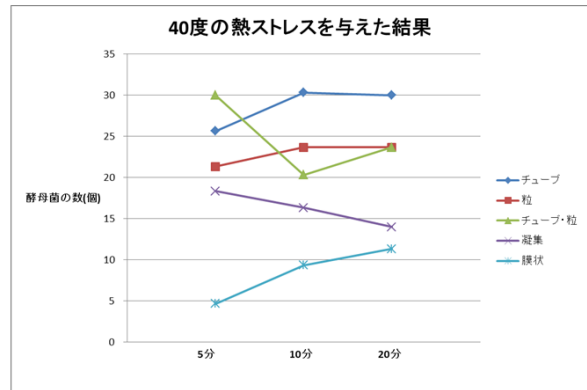
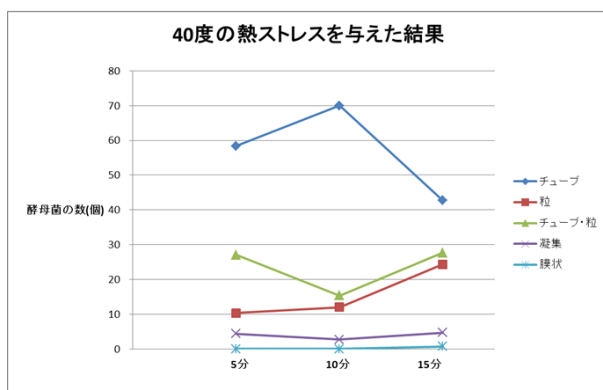
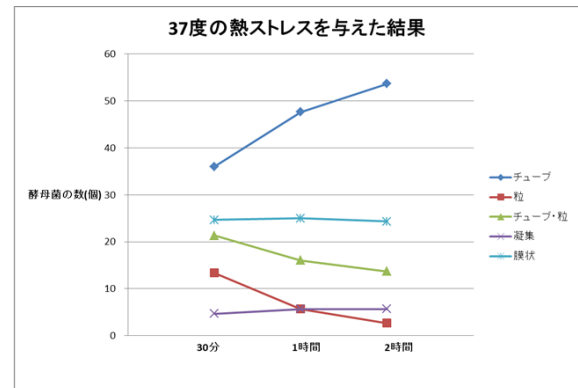
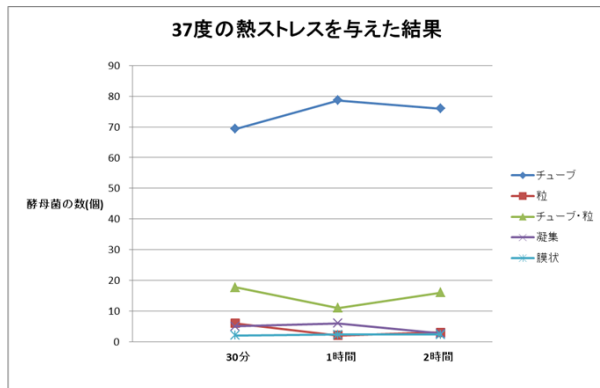
野生型酵母 16度と37度の結果

カルジオリピン欠損酵母 16度と37度の結果

どちらもチューブ状のミトコンドリアが多く存在した。しかし、野生型酵母の方が占める割合が非常に多く、一方でカルジオリピン欠損酵母の方は過半数を占めるほど多く存在しなかった。また、カルジオリピン欠損酵母の方は野生型酵母では全く見られなかった膜状のミトコンドリアが2番目に多く見受けられる。カルジオリピン欠損にはミトコンドリアの融合をつかさどる因子に何らかの欠陥が生じているかもしれない。

5-2 37度と40度の結果の比較について

実験結果の37度と40度のグラフを並べて次のページに示した。



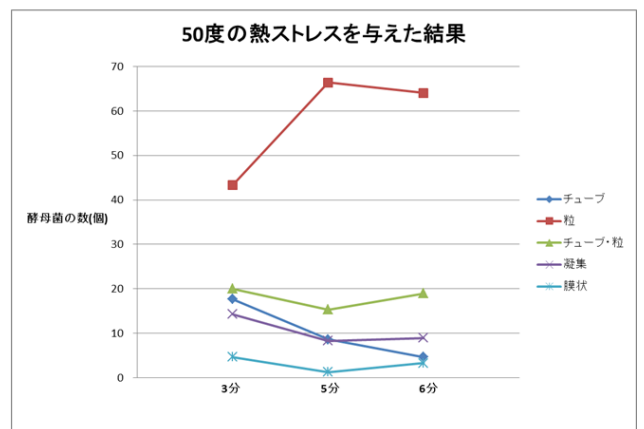
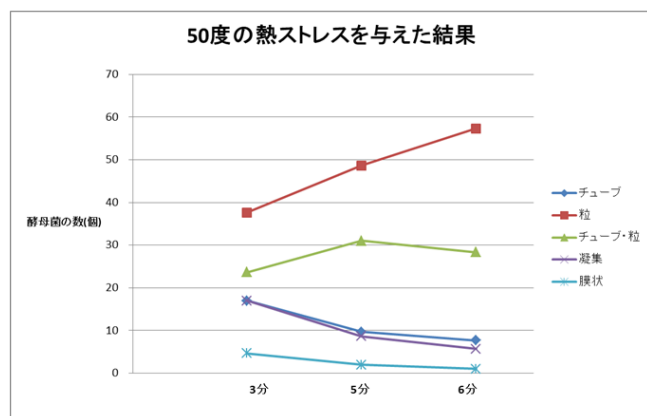
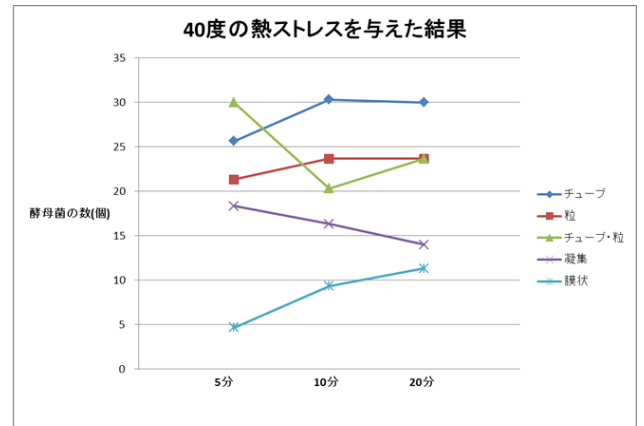
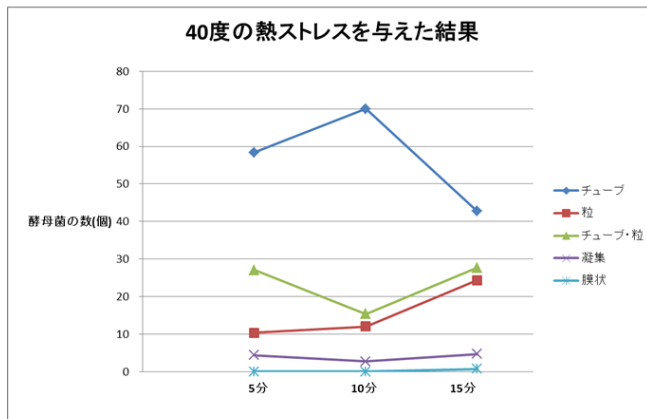
野生型酵母 37 度と 40 度の結果

カルジオリピン欠損酵母 37 度と 40 度の結果

やはり、チューブ状のものが多く存在した。そしてやはり同じように野生型酵母の方が占める割合が非常に多く、一方でカルジオリピン欠損酵母の方は過半数を占めるほど多く存在しなかった。また、カルジオリピン欠損酵母のデータをみると粒状のものが 37 度と比べてみてもかなり増えていることが見て取れる。

5-3 40 度と 50 度の結果の比較について

最後に 40 度と 50 度の結果を比べたものを示す。ここでの変化が最も興味深く、顕著なデータであった。



野生型酵母 40度と50度の結果

カルジオリピン欠損酵母 40度と50度の結果

50度になってチューブ状にかわり、粒状のものがその数を占めるようになってきた。時間の変化でそのチューブ状の個数は徐々に増えていることが野生型酵母にもカルジオリピン欠損酵母にもみとれる。カルジオリピン欠損酵母をみると、いままで、ある一つの形態が過半数を占めることはなかったにもかかわらず、50度では粒状のものが圧倒的になっている。この変化は野生型酵母、カルジオリピン欠損酵母のどちらにも普遍的に存在する重要な変化であると考えられる。

まとめよう。今回の結果をみると、チューブ状が大半占めていたのかかわらず、最も条件の厳しい50度になってはじめてどちらの種類の酵母もミトコンドリアが粒状になっていた。おそらく50度になるとミトコンドリアの融合に関する因子に何らかの悪影響を及ぼし、その活動が阻害されてしまうと考えられる。どの因子が重要なかわりを持っているかはまでは特定することはできないが、いずれにしろ熱変化はミトコンドリアの形態維持に影響を及ぼし、その形態を粒状に変化させてしまうことがわかった。今後の研究などでこれらの関連性についてより詳しく調べたら、ミトコンドリアの新たな事実が浮かび上がるかもしれない。

また、野生型酵母とカルジオリピン欠損酵母ではミトコンドリアの形態に大きなばらつきがあったことがわかる。カルジオリピン欠損酵母は様々な形のミトコンドリアの形態をとっていたが、野生型酵母はある形態、特にチューブ状が圧倒的に多く存在した。カルジオリピンの欠損はミトコンドリアの形態の幅広さを与えらる。

以上が実験結果の考察である。

6. 謝辞

今回の援助で実験をより有意義なものにすることができました。大量のデータを処理するのは大変でしたが、夏休みを意味ある時間にすることができたと思います。本当にありがとうございました。

7. 参考文献

生化学 第83巻 第5号、pp365-375、2011 「融合と分裂によるミトコンドリアの形態制御の分子機構と生理機能」