

ダリオ・ドメニコ・ロフルメント1、クラウドディオ・ロフルメント2、ニコラ・エリオ・ロフルメント3

1-生物環境科学技術学部 (DiSTeBA)、サレント大学、Ecotekne、Via Monteroni 165、73100 Lecce、イタリア
2-独立研究者、エンジニア、70100 Bari、イタリア 3-独立研究者、生化学者、70100 Bari、イタリア

はじめに: 細胞研究に関する多くの出版物では、関係するテーマに関係なく、通常、酸素消費量(OCR)と細胞外酸性化速度(ECAR)の値が報告されています。これらは、細胞の代謝を特徴付けるだけでなく、分析対象の細胞の完全性と効率を研究するための有効なパラメーターと考えられています。蛍光プローブと専用のインキュベーション媒体を使用してOCRとECARを測定するための機器と実験手順(一部は特許取得済み)は市販されています。従来の酸素電極システム(Oxygraph+, Hansatech Instruments Ltd, キングスリン、英国)とガラスpH電極を組み合わせたOCRおよびECAR分析の新しい手順が利用可能になりました。酸素消費量とpH変化率は瞬間ごとに視覚化でき、間接蛍光プローブ法や機器のように、実験終了時にOCRやECARでの変換のための測定を必要とせずに実際の値を取得できます。専用のプロトコルにより、培養細胞の生体エネルギー特性を取得し、さまざまな代謝経路とそのエネルギー効率に関する情報を得ることができます。注目すべき点は、実験中に結果がリアルタイムで視覚化され、実験を中止するか新しい物質をテストするかを決定できることです。これは、あらかじめ決められた固定の薬剤添加数と順序で開始する前に実験をプログラムする必要がある機器とは対照的です。さらに、完全なグルコース酸化の各段階に関する生化学的知識に基づいて、解糖および酸化的リン酸化プロセスによるATP生成速度の正確な値を与える、直感的な新しいアルゴリズムが進行中です。生化学的知識によって示唆されているように、合成されるATPは、明確な代謝活性の実体と効率を表す最適な指標です。このレポートでは、実験の痕跡を視覚化して、pHガラス電極と組み合わせたOxygraph+装置で得られた機能と結果を説明します。

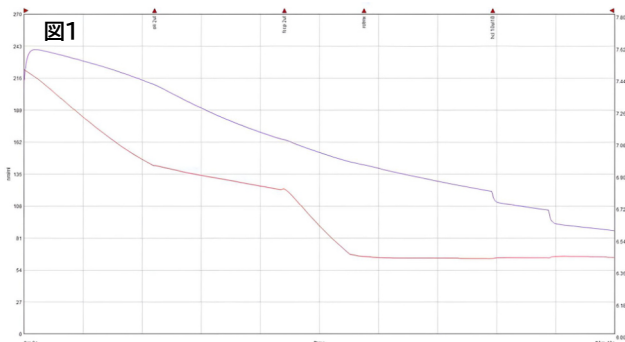


図1: ガラスpH電極と結合したOxygraph+で分析した、HepG2細胞の酸素消費と細胞外pH変化の代表的なトレース
300~500万個の細胞を37°CのDMEM中で増殖させ、0.5 mM Piを含む1mlの緩衝培地を含むインキュベーションチャンバーに移した。軸上に表された値は、それぞれnmol O₂/mlおよび37°Cでのインキュベーション培地のpH値です。電子輸送鎖(ETC)活性の効率をテストするための追加: 1 μM オリゴマイシン(oli; ATPシンターゼの阻害剤)。1 μM FCCP(脱共役剤); 各1 μMのロテノンおよびミキソチアゾール(rm; それぞれETCの複合体IおよびIIIの阻害剤)

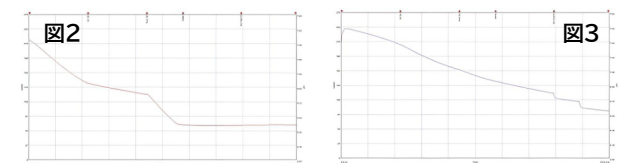


図2および図3: OxyTrace+ソフトウェアでは、酸素消費量のトレース(図2)とpH値のトレース(図3)を個別に選択して視覚化することができます。この機能により、2つのトレースの動作を詳細に検査し、2つのパラメーターのそれぞれのレート異なる時間間隔で測定および視覚化することができます。

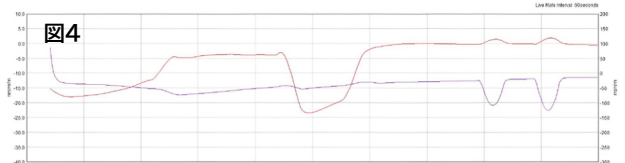


図4: 酸素濃度(nmol O₂/ml)およびpH値を表すトレースと、酸素消費速度(OCR: nmol O₂/min/ml)および細胞外酸性化速度(ECAR: mpH/min)をそれぞれ表すトレースの比較表示。この図は、新たに追加した後、一定のレート値を持つ時間間隔を選択し、グラフ表示用に保存する方法を示しているため、重要な関連性があります。

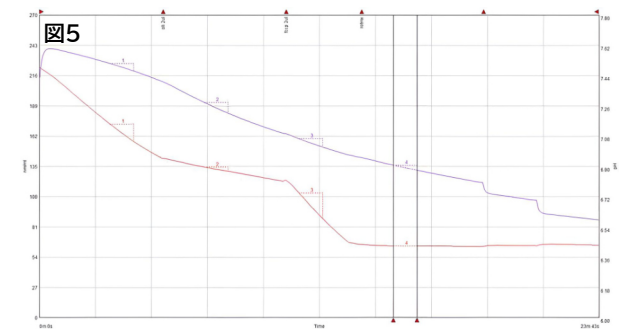
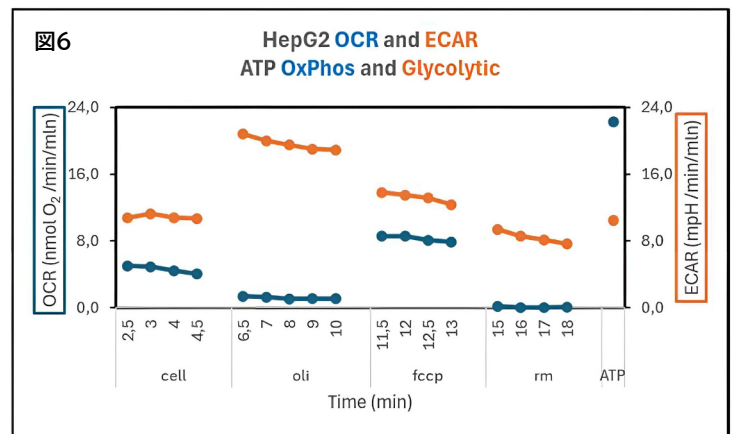


図5: レート計算手順
「速度カーソル」機能により、選択した時間間隔を定義することができ、「速度をテーブルに追加」により、選択されたすべての値が専用のテーブルに保存され、それぞれnmol O₂消費量/分として表され、pH低下がmpH/分(ミリpH/分)として表示されます。1秒で機器取得レートを設定する60ポイントの平均レート値が得られる1分のインターバル時間を選択することをお勧めします。

図6 - HepG2 ストレステストのグラフ表示
a) オリゴマイシンの添加によりATP合成を阻害すると、予想通り、ミトコンドリア膜電位の急激な上昇により酸素消費速度が阻害されます。これは、阻害されたATP合成酵素が、呼吸鎖の活性と連動したプロセスである、ミトコンドリアマトリックス内部へのプロトンの再流入を許可しないためです。ATP合成酵素が阻害されると、細胞は解糖系ATPを増加させることでATP OxPhosの減少を補い、ECARが刺激されます。
b) ミトコンドリア内外のプロトン勾配を平衡化する脱共役剤FCCPを添加すると、膜電位が消散し、刺激されてもOCRが回復します。
c) ロテノン+ミキソチアゾール添加(rm)では、OCRは完全に阻害されますが、ECARの廃止ではなく減少によって示されるように、細胞は解糖系ATPを利用して生存し続けます。生化学的観点から見ると、(酸素消費がない場合)酸性化速度の減少は、(rm)によって阻害されているETCによってサポートされるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルによって触媒される細胞質NADH酸化の阻害が、少なくとも部分的には原因であると考えられます。

結論: ECAR率(主に解糖による)がOCR(ETC活性)を上回ることを示すOCRおよびECARの値は、HepG2細胞が主に解糖性であることが示唆される。しかし、より適切なパラメーターとしてATP合成効率を考慮すると、これらの細胞は、解糖系の2倍のATP速度(nmol/分/ml)を有するETCのOxPhos活性によって生成されるエネルギーに生存を依存している(表1)



additions	time (min)	OCR (nmol/min/ml)	ECAR (mpH/min/ml)
cells	2.5	5.0	10.8
	3	4.9	11.2
	4	4.4	10.8
	4.5	4.1	10.7
oligom.	6.5	1.4	20.8
	7	1.3	20.0
	8	1.1	19.5
	9	1.1	19.0
	10	1.1	18.9
	11.5	8.6	13.8
fccp	12	8.6	13.5
	12.5	8.1	13.2
	13	7.9	12.4
	15	0.2	9.4
rot.+myx.	16	0.9	8.6
	17	0.0	8.1
	18	0.1	7.7
	ATP	22.3	10.5

表1: HepG2細胞のOCRおよびECARストレステスト
報告された値は、図4および5に示された適応症に従う手順で得られた値です。1 μM オリゴマイシン、ATPシンターゼ阻害剤(oli);ミトコンドリアの内側と外側の間のプロトン勾配を消散させる1 μM FCCP。ETCの複合体Iおよび複合体IIIのそれぞれのロテノンおよびミキソチアゾール(rm)阻害剤1 μM。