

成熟脂肪細胞におけるミトコンドリア 呼吸鎖複合体活性の包括的評価

Agilent Seahorse XF 細胞膜透過処理試薬を使用した解析

著者

Guoxiao (Grace) Wang and
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Seahorse XF アナライザーでの単離ミトコンドリアを用いた作用機序研究では、電子伝達系 (ETC) 複合体に直接アクセスし、基質を正確に制御し、しばしばインタクト細胞研究よりもミトコンドリア活性を明確に解明できます。しかし、培養細胞（特に脂肪細胞）からミトコンドリアを単離することは技術的に難しく、収量や品質の低下を招くことがよくあります。Agilent Seahorse XF 細胞膜透過処理試薬 (XF PMP) は、コレステロールに対して選択的親和性のある組み換え細胞溶解素であり、ミトコンドリアの完全性を維持しながら細胞膜を選択的に透過処理します。そのため、ミトコンドリアを単離せずに作用機序研究を実施できます。

このアプリケーションノートでは、3T3-L1 成熟脂肪細胞における電子伝達系 (ETC) 活性の包括的評価に最適な XF PMP ベースのワークフローについて説明します。このアッセイでは、長期間のアッセイ中にミトコンドリアの安定性と最大呼吸を維持しながら、同一サンプル内の複数の呼吸鎖複合体を同時に評価できます。また、メトホルミンによる複合体 I の時間/用量依存的阻害を証明する概念実証研究についても説明します。

概要

Agilent Seahorse XF 細胞膜透過処理試薬（PMP）は、コレステロールに対して選択的親和性のある組み換え細胞溶解素であり、ミトコンドリア膜の完全性を維持しながら細胞膜を選択的に透過処理できます。¹ XF ミトストレステストなどの Seahorse XF 生細胞アッセイでは、最大呼吸が多くの要素の影響を受け、基質輸送、基質酸化、電子伝達系（ETC）活性の変化により最大呼吸が減少する可能性があります。Agilent Seahorse XF 電子フロー（EF）アッセイでは、XF PMP を利用し、ミトコンドリア基質の利用可能性を正確に制御しながらインタクト細胞アッセイで見られる最大呼吸状態を再現することで、インタクト生細胞の制約を回避します。各基質は特定の代謝経路を通してミトコンドリアに入るため、このターゲットを絞った手法により、ミトコンドリア呼吸の阻害の原因となる経路を直接特定できます。

従来、代謝機能障害の根底にあるメカニズムを解明するにはミトコンドリアの単離が必要でした。このプロセスは技術的に難しく、時間がかかり、ミトコンドリアの品質が安定しないことが多く、培養細胞から作業を始める場合は特に部分選択のリスクが高くなります。さらに、ミトコンドリアの完全性を損なわずに細胞膜を選択的に透過処理する試薬がないため、酸化経路の in situ 調査には制約がありました。サポニンやジギトニンなどの従来の界面活性剤は慎重な滴定が必要であり、ミトコンドリア機能に悪影響を与える可能性があります（膜間腔からのシトクロム c の喪失など）。Seahorse XF PMP は、安全で再現性のある細胞膜の in situ 透過処理を可能にすることで、これらの制約に対応しています。このため、ミトコンドリア機能を維持しながらミトコンドリア基質を直接制御できます。この手法により、ミトコンドリア単離が不要になり、界面活性剤ベースの透過処理に関連する欠点を回避できます。

実験

3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化

3T3-L1 線維芽細胞を ATCC から入手し（部品番号 CL-173）、10 % の仔ウシ血清（ATCC、部品番号 30-2030）を添加した DMEM（Gibco、部品番号 11995）で培養しました。細胞は、約 80 % のコンフルエンスで継代培養しました。分化のために、ウェルあたり約 20,000 個の細胞を、（ウェルあたり 0.2 %、100 μ L で）ゼラチンコーティングした 24 ウェルの Agilent Seahorse XF V28 プレート（部品番号 100882-004）に播種しました。コンフルエンスに達してから（ポストコンフルエンス）1 日目（0 日目とする）に、2 % のウシ胎児血清（FBS）（HyClone、部品番号 SH30070.03）、0.5 mM の 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）（Sigma、部品番号 I5879）、5 μ M のロシグリタゾン（Sigma、部品番号 R2408）、1 μ M のデキサメタゾン（Sigma、部品番号 D4902）、400 nM のインスリン（Sigma、部品番号 I9278）を含む DMEM を使用して、脂肪細胞への分化を誘導しました。48 時間後（2 日目）に、誘導培地を 2 % の FBS と 400 nM のインスリンを含む DMEM に交換しました。4 日目以降は、2 % の FBS と 50 nM のインスリンを含む DMEM ベースの分化培地で細胞を維持しました。培地は 2 日ごとに交換しました。

Seahorse XF アッセイ

6 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を XF PMP と FCCP の滴定アッセイに使用し、7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を他のすべての XF EF アッセイに使用しました。すべてのアッセイは、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで Seahorse XF24 V28 細胞培養マイクロプレートを使用して実行しました。アッセイサイクルは、3 分の混合、0 分の待機、2 分 10 秒の測定期間で構成されます。測定期間は必要に応じて調整できますが、データの正確度を確保するには 2 分以上にする必要があります。

1) 3T3-L1 成熟脂肪細胞における XF PMP 滴定

3T3-L1 成熟脂肪細胞で最適な XF PMP 濃度を滴定するための基質として、コハク酸と ADP を使用しました。これらはいずれも、インタクト細胞膜を通過しないためです。ミトコンドリアアッセイ溶液（MAS）バッファーを表 1、XF EF アッセイバッファーを表 2 のように調製しました。複合体 I（CI）により ROS が生成される可能性がある ETC バックフローを防ぐため、ロテノンを追加しました。この特定のアッセイでは、0.2 % の BSA を添加した MAS バッファーで XF PMP を調製し、注入ポートとの結合を軽減しました。その他の XF EF アッセイでは、ポート注入試薬を基礎 MAS バッファーで調製して気泡の形成を最小限に抑え、XF PMP を XF EF アッセイバッファーの成分として細胞ウェルに直接添加しました。最終的なアッセイバッファーの pH を 7.2 ～ 7.4 に維持することが重要です。化合物カタログと調製方法の詳細については、アジレント・テクノロジーの技術概要 5994-7548EN（『Agilent Seahorse XF 電子フローアッセイと Agilent Seahorse XF PMP による、透過処理細胞におけるミトコンドリア複合体活性の測定』（英語））をご覧ください。²

表 1. MAS バッファー

化合物	最終濃度
マンニトール	220 mM
スクロース	70 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
MgCl ₂	5 mM
HEPES	5 mM
EGTA	1 mM

表 2. XF PMP 滴定用の XF EF アッセイバッファー (MAS バッファー中)

化合物	最終濃度
コハク酸	10 mM
ロテノン	2 μM
ADP	4 mM
脂肪酸フリー BSA	0.2 %

標準の XF アッセイテンプレートには 12 分間の平衡化が含まれていますが、これは XF PMP 滴定アッセイでは無効になっています。その理由は、透過処理剤がない場合に高張 MAS バッファーへの細胞の曝露を最小限に抑えるためです。

1 回の基礎測定の後、XF PMP (0、10、20、40 nM) をポート A から注入し、プレートの 4 分の 1 の区画ごとに異なる濃度を割り当て (図 1)、最終濃度を 0、1、2、4 nM にしました。XF PMP の注入後に、酸素消費速度 (OCR) を 50 回、合計 258 分間測定しました。

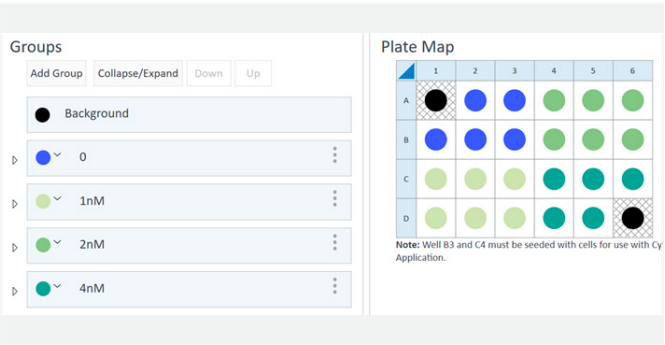


図 1. XF PMP 滴定実験用のプレートマップ

2) XF PMP で透過処理した3T3-L1 成熟脂肪細胞での FCCP 滴定

FCCP 滴定には、測定の明瞭性と安定性を上げるために、複合体 II (CII) の基質であるコハク酸を使用しました。いっぽう CI 駆動型呼吸は、NAD⁺/NADH 比の変動と上流輸送プロセス (ミトコンドリアキャリアタンパク質 (MCP) 系など) の影響を受ける可能性があります。

成熟脂肪細胞に最適な XF PMP 濃度を 2 nM と定め (図 3A)、これを後から XF EF アッセイバッファーに追加しました (表 3)。これ以降のアッセイでは、XF アッセイプロトコルで 12 分間の平衡化ステップを有効にしました。これは通常、細胞の透過処理後に OCR が最大レベルに達するまでに約 10 分かかるためです (図 3A)。

表 3. FCCP 滴定用の XF EF アッセイバッファー (MAS バッファー中)

化合物	最終濃度
コハク酸	10 mM
ロテノン	2 μM
ADP	4 mM
脂肪酸フリー BSA	0.2 %
XF PMP	2 nM

FCCP を MAS バッファーで調製し、0.5、1、2、4 μM の最終濃度で滴定しました。アッセイプロトコルは表 4 のとおりです。FCCP の注入後に長い測定期間を設定したのは、ミトコンドリアが最大呼吸を維持できる時間を評価するためです (この場合は脱共役条件下での CII 活性)。

表 4. FCCP 滴定アッセイプロトコル

	試薬	最終濃度	サイクル
基礎呼吸	-	-	3
ポート A	オリゴマイシン	2 μM	4
ポート B	FCCP	0.5 ~ 4 μM	50

3) 呼吸調節率の評価

呼吸調節率 (RCR) は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の効率を測定する、生体エネルギーにおける重要パラメーターです。これは、ADP 枯渇後の呼吸休止 (状態 4) に対する ADP 刺激性呼吸 (状態 3) の比率として定義されます。XF EF アッセイでは通常、状態 4o (ATP 合成酵素を阻害するためにオリゴマイシンを注入した後に取得) が状態 4 の代わりに使用されます。このオリゴマイシンによって誘導される状態により、リン酸化によらない呼吸を推定できるため、従来の状態 4 の測定で存在する可能性がある残留 ATP 代謝回転の寄与を減らすことができます。³⁻⁴

RCR 測定のために、表 5 のように ADP、オリゴマイシン、FCCP、ロテノン/アンチマイシン A を連続注入しました。CI および CII 駆動型 RCR を、それぞれピルビン酸/リンゴ酸とコハク酸を用いて評価しました (表 6)。

表 5. RCR 評価アッセイプロトコル

	試薬	最終濃度	サイクル
基礎呼吸	-	-	3
ポート A	ADP	4 mM	3
ポート B	オリゴマイシン	2 μM	4
ポート C	FCCP	2 μM	3
ポート D	ロテノン/アンチマイシン A	2 μM/10 μM	4

表 6. RCR 評価用の XF EF アッセイバッファー (MAS バッファー中)

複合体 I		複合体 II	
化合物	最終濃度	化合物	最終濃度
ピルビン酸	10 mM	コハク酸	10 mM
リンゴ酸	1 mM	ロテノン	2 μM
XF PMP	2 nM	XF PMP	2 nM
脂肪酸フリー BSA	0.2 %	脂肪酸フリー BSA	0.2 %

4) ミトコンドリア呼吸複合体活性の評価

同一サンプルで CI、CII、CIV 活性を連続評価するため、XF PMP で透過処理した 7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞にピルビン酸/リンゴ酸を添加し、CI 関連呼吸を発生させました。ADP、オリゴマイシン、FCCP を添加して、インタクト細胞 XF アッセイに使用される最大呼吸条件を総体的に誘導/再現しました (表 7)。その後、ポート A からロテノンを注入して CI 活性を阻害してから、ポート B からコハク酸を注入して CII 関連呼吸を評価しました。

表 7. ミトコンドリア呼吸複合体活性の評価用の XF EF アッセイバッファー (MAS バッファー中)

化合物	最終濃度
ピルビン酸	10 mM
リンゴ酸	1 mM
オリゴマイシン	2 μM
ADP	4 mM
FCCP	2 μM
脂肪酸フリー BSA	0.2 %

次にアンチマイシン A を使用して CIII 活性を阻害し、アスコルビン酸で還元した N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD) を人工電子ドナーとして使用して、CIV 関連呼吸を測定できるようにしました。試薬濃度と XF アッセイプロトコルの詳細については、表 8 をご覧ください。

表 8. CI、CII、および CIV 活性の連続評価用の XF EF アッセイプロトコル

	試薬	最終濃度	サイクル
基礎呼吸	-	-	3
ポート A	ロテノン	2 μM	3
ポート B	コハク酸	10 mM	4
ポート C	アンチマイシン A	10 μM	3
ポート D	TMPD/Asc	0.1 mM/10 mM	4

特定の呼吸鎖複合体の典型的な阻害を証明するために、DMSO (対照群)、ピエリシジン A (2 μM、Cayman、部品番号 15379)、アトペニン A5 (1 μM、Cayman、部品番号 11898)、またはアジ化ナトリウム (20 mM、Sigma、部品番号 S2002) を用いてアッセイの直前に細胞を前処理しました。

CI と上流の阻害を区別するため、7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を、透過処理後に 2 つの基質条件に分けました。1 つのグループには、表 7 のとおり最初の基質としてピルビン酸/リンゴ酸を添加し、もう 1 つのグループにはピルビン酸/リンゴ酸の代わりにグルタミン酸/リンゴ酸 (それぞれ 10 mM) を添加しました。XF EF アッセイを開始する前に、各基質条件内で、ウェルを vehicle 対照群 (DMSO) または 2 μM の UK5099 処理 (45 分間) にさらに分割しました。表 8 の同一プロトコルを用いて、すべてのグループのアッセイを実行しました。

複合体 I のメトホルミンによる阻害を評価するため、7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を表 7 の方法で透過処理し、表 9 のプロトコルに従ってアッセイを実行しました。メトホルミンストック溶液 (1 M、Milli-Q H₂O (Sigma、部品番号 D150959) で調製) を、ポート注入用に MAS バッファーで 100 mM、20 mM、400 μM に希釈し、最終濃度をそれぞれ 10 mM、2 mM、40 μM にしました。対照群ウェル (0 メトホルミン) には、対応するポートから MAS バッファーのみを添加しました。

表 9. メトホルミンによる複合体 I 阻害の評価用 XF EF アッセイプロトコル

	試薬	最終濃度	サイクル
基礎呼吸	-	-	3
ポート A	メトホルミン	0 ~ 10 mM	24
ポート B	ロテノン	2 μM	4

結果と考察

低血清条件下で 3T3-L1 脂肪前駆細胞が確実に脂肪細胞に分化

基質が十分にある条件下で複合体の最大活性を測定するときの酸素欠乏を最小限に抑えるため、従来の 10 % の FBS プロトコルではなく、2 % の FBS を使用して 3T3-L1 脂肪前駆細胞を分化させました。血清濃度を低くすることで、終末分化を阻害せずに誘導後クローン増殖が抑制されます。これは、明らかに脂質が蓄積した脂肪細胞の形態により確認できます (図 2)。この低血清分化戦略を褐色脂肪細胞の XF アッセイにも導入して、経験豊富なユーザーによる呼吸測定を改善できます。⁵

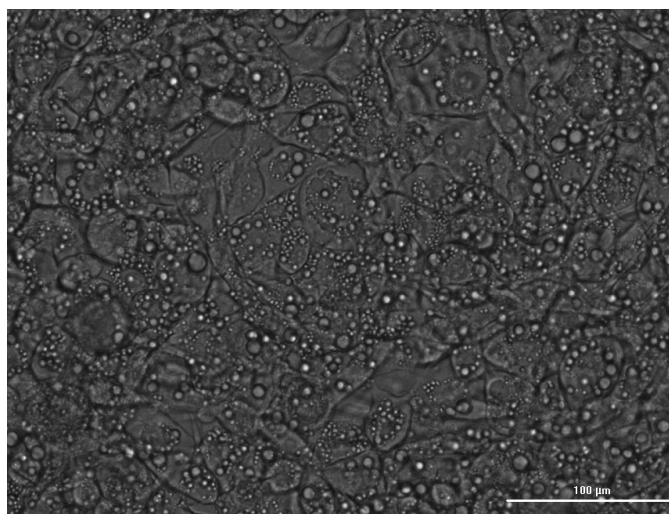


図 2. 2 % の FBS を含む培地で培養した、分化 7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を Agilent BioTek Cytation により 20 倍で撮影した代表的な画像。
スケールバー = 100 μ m

3T3-L1 脂肪細胞の透過処理研究のための XF PMP 濃度の最適化

ほとんどの細胞の種類では、ミトコンドリア ETC 複合体活性の評価用に 1 nM XF PMP を推奨しています。詳しくは、アジレント・テクノロジーの技術概要 5994-7548EN (Determine Mitochondrial Complex Activities in Permeabilized Cells Using the Agilent Seahorse XF Electron Flow Assay with Agilent Seahorse XF PMP) や以前の発行物をご覧ください。しかし、脂肪細胞は培養密度が高く、細胞内の脂質含有量が非常に多いため、XF PMP の濃度を再最適化して、細胞を効率的に透過処理できるようにしました。

図 3A のとおり、1 nM の XF PMP での処理では、最大 OCR を達成して透過処理を完了するのに約 1 時間かかりました。これはほとんどの XF アッセイにとって実用的ではありません。これに対し、2 nM または 4 nM の XF PMP を使用した場合は、完全な透過処理を 10 分以内に完了できました。いずれの濃度でも、最大 OCR が 4 時間以上維持され、アッセイ全体を通して酸素レベルが常に推奨される閾値 (50 mmHg) を上回りました。

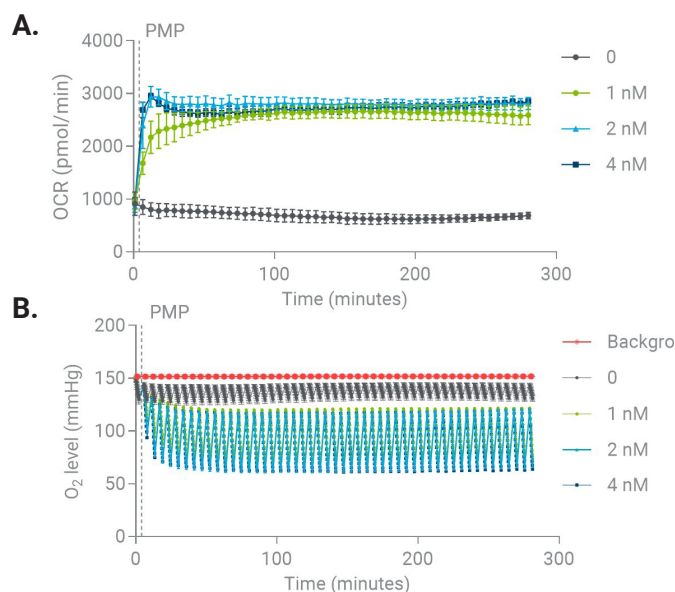


図 3. 3T3-L1 脂肪細胞における XF PMP 滴定。A) OCR カイネティクス、B) O₂ レベルトレース

透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞を用いた XF アッセイの脱共役剤濃度の最適化

一般的に、インタクト細胞用に確立された最適な FCCP 濃度は、XF PMP 電子フローアッセイに適しています。これが 3T3-L1 脂肪細胞にも当てはまるかどうかを確認するため、XF PMP で透過処理した成熟脂肪細胞において約 2 μ M の FCCP を滴定しました。この濃度は以前に、インタクト生細胞での最適な濃度として特定されたものです。

FCCP 滴定では、すべての試験対象濃度 (0.5、1、2、4 μ M) で、最終的に同等の最大呼吸を達成しました。ただし、0.5 μ M と 1 μ M の FCCP では、最大 OCR に到達するのに長い時間がかかりました。FCCP 注入後の 50 回の測定全体 (約 258 分) で、最大の CII 関連呼吸が維持されました。これは、XF PMP で透過処理した条件において、CII の最大活性が非常に安定していることを示します (図 4)。迅速かつ持続的な応答を考慮して、2 μ M の FCCP をその後の実験用に選択し、ETC 複合体の最大活性を評価しました。

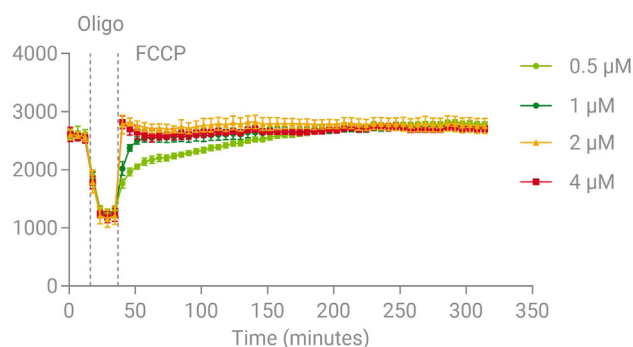


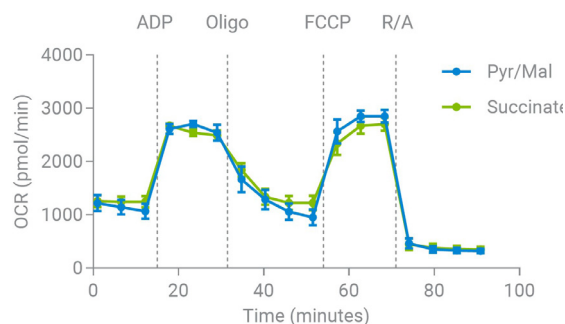
図 4. XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞での FCCP 滴定アッセイの OCR カイネティクストレス。Oligo：オリゴマイシン

3T3-L1 脂肪細胞中の正常な共役ミトコンドリアにおける XF PMP 透過処理の結果

図 5A は、XF PMP で透過処理した 7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞の、基礎条件下と ADP、オリゴマイシン（オリゴ）、FCCP、ロテノン/アンチマイシン A (R/A) を連続注入した後の OCR カイネティクストレスを示しています。呼吸調節率（RCR）は、次の式を使用して計算しました。

$$RCR = \frac{\frac{max\ OCR(ADP) - min\ OCR(R/A)}{min\ OCR(Oligo) - min\ OCR(R/A)}}{\frac{State\ 3\ respiration}{State\ 4\ respiration}}$$

A.



B.

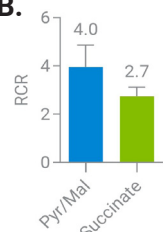


図 5. XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞での RCR 評価。A) OCR カイネティクストレス。B) ビルビン酸/リンゴ酸（Pyr/Mal）またはコハク酸を基質として使用した RCR の計算結果。データは、7～8 technical replicate の平均 ± SD を表しています。R/A：ロテノン

XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞で得られる RCR は、CI 駆動型呼吸で約 4、CII 駆動型呼吸で約 2.7 です（図 5B）。これらの値は、ジギトニンで透過処理した白色脂肪組織⁶や、白色脂肪細胞から単離したミトコンドリア⁷を用いた実験に関する文献の報告値よりずっと大きいものです。これは、XF PMP 透過処理手順を使用するとミトコンドリアの完全性と共役効率が向上することを示しています。

Agilent Seahorse Analytics（SHA）はクラウドベースのデータ解析ツールであり、デルタ OCR 値を計算できる **Bar Chart - Delta Calculator** ウィジェットが搭載されているため、RCR を簡単に測定できます（図 6）。

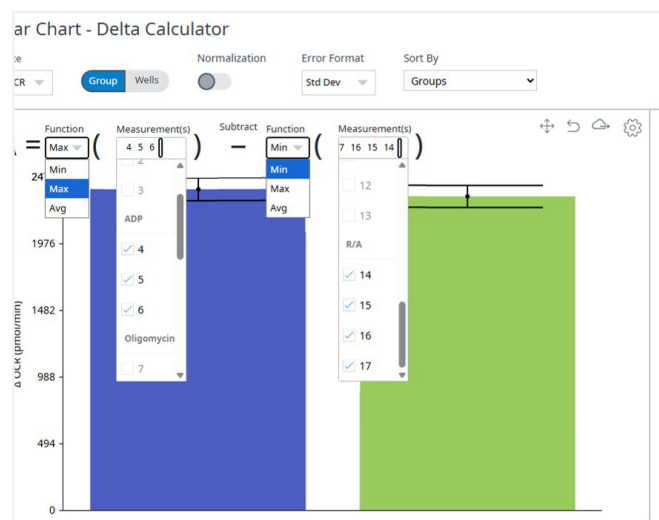


図 6. Agilent Seahorse Analytics の **Bar Chart - Delta Calculator** ウィジェット。複数の実験グループの RCR 分子、OCRmax (ADP) – OCRmin (R/A) の計算が表示されています。結果の値は状態 3 の呼吸を表しており、Microsoft Excel や Graph Prism にエクスポートできます。

同一サンプルでの CI、CII、CIV 活性の連続評価

アッセイを開始する直前に、XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞を、ピエリシジン A（CI 阻害剤）、アトベニン A5（CII 阻害剤）、アジ化ナトリウム（CIV 阻害剤）で処理しました。これは、XF 電子フローアッセイがミトコンドリア阻害剤の薬物作用部位の特定にどのように役立つかを証明するための概念実証として使用するためです。対照群細胞を DMSO で処理し、最初のミトコンドリア基質としてビルビン酸/リンゴ酸が含まれる MAS バッファーでアッセイを実行しました。

予想どおり、ピエリシジン A は明らかに CI 関連呼吸を阻害し、CII または CIV 関連呼吸には影響しませんでした。アトペニン A5 は CII 関連呼吸を選択的に阻害し、CI および CIV 関連経路には影響しませんでした。これに対して、アジ化ナトリウムは CI、CII、CIV 駆動型の呼吸を広く抑制しました（図 7A～D）。アジドによる CI および CII 駆動型呼吸の阻害は間接的であり、その原因は電子フローを失速させる CIV でのボトルネックです。これに対し、ピエリシジン A とアトペニン A5 は下流のボトルネックを発生させずに分岐特異的に阻害します。影響を受けない複合体からの電子は残りの経路を通過できるためです。それぞれの経路は、CI » ユビキノン » CIII » CIV および CII » ユビキノン » CIII » CIV です。

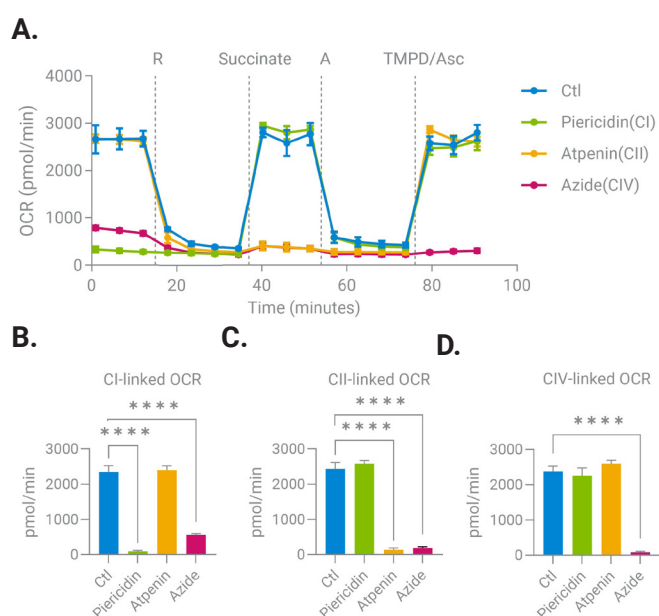


図 7. XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞において複合体阻害剤をテストする XF EF アッセイ。(A) OCR カイネティクストレース。(B) 複合体 I 関連呼吸（測定 3 – ロテノン添加後の最小 OCR）。(C) 複合体 II 関連呼吸（コハク酸添加後の最大 OCR – アンチマイシン A 添加後の最小 OCR）。(D) 複合体 IV 関連呼吸（TMPD/Asc 添加後の最大 OCR – アンチマイシン A 添加後の最小 OCR）。R：ロテノン。A：アンチマイシン A。TPMD/Asc：N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン/アスコルビン酸。データは 5～6 technical replicate の平均 ± SD であり、2 つの独立した実験結果を示しています。****P < 0.0001。

図 8 のとおり、SHA の **Bar Chart - Delta Calculator** ウィジェットを使用して、複合体関連呼吸を計算しました。



図 8. Agilent Seahorse Analytics の **Bar Chart - Delta Calculator** ウィジェット。ウェル全体の OCR 測定 3 – OCRmin (ロテノン) の計算が表示されています。結果の値は複合体 I 関連呼吸を表しており、Microsoft Excel や Graph Prism にエクスポートできます。

CI と上流の阻害の区別

CI 関連呼吸は、CI 酵素活性だけでなく、上流プロセスの総合的な寄与も反映します。これには、ミトコンドリア膜での CI 基質の輸送（ミトコンドリアビルビン酸キャリアによるビルビン酸の輸送など）、マトリックスの酵素による基質処理（グルタミン酸から α-ケトグルタル酸への変換など）、およびその後のトリカルボン酸（TCA）回路経路での酸化が含まれます。直接的な CI 阻害と上流ステップの阻害を区別するには、最初の CI 関連基質としてビルビン酸/リンゴ酸とグルタミン酸/リンゴ酸の両方を使用して XF EF アッセイを実行することを推奨します。

このためのツール化合物として、ミトコンドリアピルビン酸キャリア (MPC) 阻害剤である UK5099 を使用しました。ピルビン酸/リンゴ酸を最初の基質として使用すると、XF EF アッセイデータは選択的 CI 阻害を示します。これに対し、グルタミン酸/リンゴ酸を使用すると、CI 関連呼吸はほぼ維持されます (図 9)。この違いの理由は、UK5099 が CI を直接阻害するのではなく、ピルビン酸がミトコンドリア内に入るのをブロックするためです。この結果、ピルビン酸依存性の CI 関連呼吸のみが減少し、グルタミン酸依存性の CI 関連呼吸は維持されます。

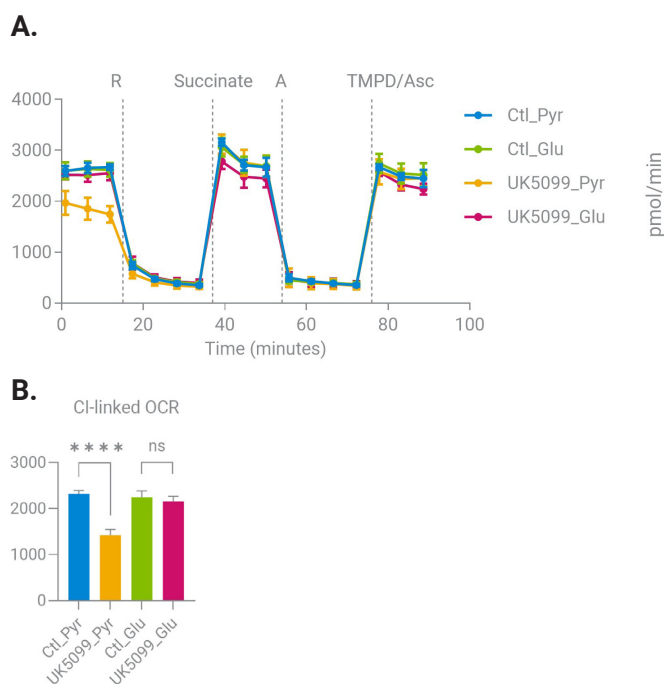


図 9. XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞において、ピルビン酸/リンゴ酸とグルタミン酸/リンゴ酸を最初の基質として使用して CI 関連呼吸に対する UK5099 の影響を比較テストする XF EF アッセイ。(A) OCR カイネティクストレース。(B) OCR 測定 3-ロテノン注入後の 最小 OCR として計算した複合体 I 関連呼吸。R : ロテノン。A : アンチマイシン A。TPMD/Asc : N,N,N',N' -テトラメチル-p-フェニレンジアミン/アスコルビン酸。データは 5 ~ 6 technical replicate の平均 ± SD であり、2 つの独立した実験結果を示しています。****P < 0.0001, ns : 有意でない。

メトホルミンによる複合体 I 阻害の評価

メトホルミンは、2 型糖尿病の治療に広く使用されている経口薬です。これはミトコンドリア CI の穏やかな阻害剤です。しかし、治療用血漿の濃度が有意な CI 阻害の誘導に十分かどうかについては、文献上で議論が続いています。メトホルミンには、ミトコンドリアへの作用だけでなく、AMP 活性化タンパク質キナーゼ (AMPK) の活性化を介した代謝面での利点があります。特に、約 5 μ M のメトホルミンは肝細胞で AMPK リン酸化を誘導するのに十分です⁸。いっぽう、3T3-L1 脂肪前駆細胞⁹や脂肪細胞¹⁰で AMPK リン酸化を誘導するには、かなりの高濃度 (2.5 ~ 10 mM) が必要です。

患者の一般的な血漿メトホルミン濃度が約 10 ~ 40 μ M¹¹であることを考慮し、XF PMP で透過処理した 7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞で、CI 関連呼吸に対する時間/用量依存的なメトホルミンの影響を、40 μ M、2 mM、10 mM の最終濃度で調査しました (図 10)。10 mM の場合、注入してから約 25 分後に、メトホルミンが CI 関連呼吸を有意に阻害し始めました (図 10A および B)。また 2 時間のモニタリング期間の最後 (測定 27) には、CI 活性が 50 % 以上低下していました (図 10C および D)。これに対し、2 mM のメトホルミンでは 2 時間で CI 活性がゆるやかに減少しただけであり、40 μ M では検出可能な影響はありませんでした。予想どおり、CII 関連呼吸はメトホルミンの濃度による影響を受けませんでした (図 10E および F)。

データ正規化

ほとんどの場合、画像ベースの細胞数カウントや総タンパク質含有量を使用して、測定後に XF EF アッセイの結果を正規化できます。個々のウェルに対して正規化するとデータのばらつきが大きくなる場合は、処理グループあたりの平均タンパク質含有量に対して正規化することを推奨します。

実験の目的が、化合物の処理が最大呼吸に与える影響の評価である場合は、化合物処理後の OCR 測定値を基礎 OCR (通常は最初の注入前の最後の測定) に対して正規化できます。この場合、すべての OCR 測定値は (図 10B、D、F のように) ベースラインシグナルのパーセンテージとして表示されます。この手法により、サンプル処理やタンパク質定量を追加で実行しなくても、テスト化合物の相対的影響を評価できます。

結論

Agilent Seahorse XF PMP はミトコンドリアの完全性を損なわずに成熟脂肪細胞を選択的に透過処理できる堅牢な方法であるため、ETC 複合体活性を直接測定できます。この戦略は、ミトコンドリアモジュレーターのスクリーニング、遺伝子ターゲットの特定、薬物の作用機序の解明を支援します。さらにこの手法を、細胞膜の選択的な透過処理を必要とする他のアプリケーションに拡張できます。

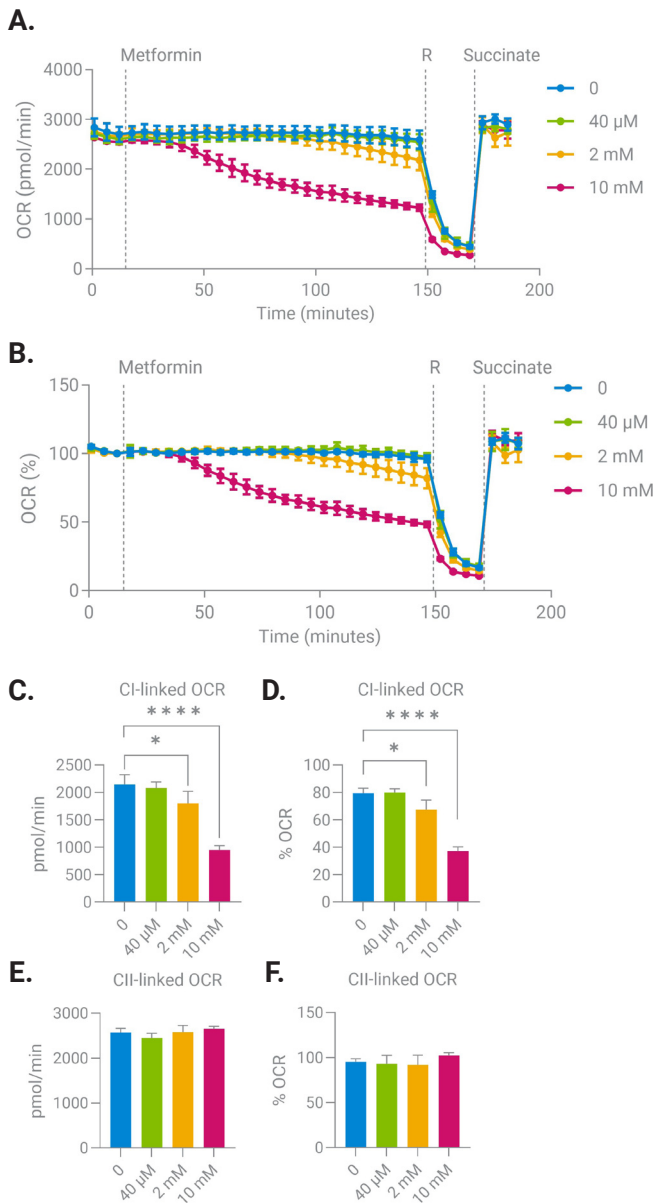


図 10. XF PMP で透過処理した 3T3-L1 脂肪細胞において CI 関連呼吸に対するメトホルミンの影響をテストする XF EF アッセイ。(A) と (B) はそれぞれ、正規化の前と、測定 3 (m3) に対して正規化/ベースライン化した後の OCR カイネティクストレースを示しています。(C) は生、(D) は m3 でベースライン化した CI 関連呼吸 (メトホルミン処理の 2 時間後) で、 $OCR_{m27} - OCR_{min(R)}$ として計算しています。(E) は生、(F) は m3 でベースライン化した CII 関連呼吸で、 $OCR_{max(コハク酸)} - OCR_{min(R)}$ として計算しています。R: ロテノン。* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ 、データ = 平均 $\pm$ SD。n = 4 ~ 6。

参考文献

- Divakaruni, A. S.; Wiley, S. E.; Rogers, G. W.; Andreyev, A. Y.; Petrosyan, S.; Loviscach, M.; Wall, E. A.; Yadava, N.; Heuck, A. P.; Ferrick, D. A.; et al. Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**, 110(14), 5422–7. DOI: 10.1073/pnas.1303360110
- Rogers, G. W.; Winer, L. P.; Wang, G.; Romero, N. Determine Mitochondrial Complex Activities in Permeabilized Cells Using the Agilent Seahorse XF Electron Flow Assay with Agilent Seahorse XF PMP. Agilent Technologies technical overview, 5994-7548EN, **2026**.
- Brand, M.D.; Nicholls, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. **2011**, 435(2), 297–312. DOI: 10.1042/BJ20110162
- Dott, W.; Mistry, P.; Wright, J.; Cain, K.; Herbert, K. E. Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. *Redox Biol*. **2014**, 2, 224–33. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.028
- Darcy, J.; Wang, C. H.; Tseng, Y. H. Analyzing Mitochondrial Function in Brown Adipocytes with a Bioenergetic Analyzer. *Methods Mol Biol*. **2020**, 2138, 289–296. DOI: 10.1007/978-1-0716-0471-7_20
- Chondronikola, M.; Volpi, E.; Børsheim, E.; Porter, C.; Saraf, M. K.; Annamalai, P.; Yfanti, C.; Chao, T.; Wong, D.; Shinoda, K.; et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab*. **2016**, 23(6), 1200–1206. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.04.029
- Vernochet, C.; Mourier, A.; Bezy, O.; Macotela, Y.; Boucher, J.; Rardin, M. J.; An, D.; Lee, K. Y.; Ilkayeva, O. R.; Zingaretti, C. M.; et al. Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. **2012**, 16(6), 765–76. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.10.016
- Ma, T.; Tian, X.; Zhang, B.; Li, M.; Wang, Y.; Yang, C.; Wu, J.; Wei, X.; Qu, Q.; Yu, Y.; et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2. *Nature*. **2022**, 603(7899), 159–165. DOI: 10.1038/s41586-022-04431-8
- Chen, D.; Wang, Y.; Wu, K.; Wang, X. Dual Effects of Metformin on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte in AMPK-Dependent and Independent Manners. *Int J Mol Sci*. **2018**, 19(6). DOI: 10.3390/ijms19061547
- Morita, N.; Hosaka, T.; Kitahara, A.; Murashima, T.; Onuma, H.; Sumitani, Y.; Takahashi, K.; Tanaka, T.; Kondo, T.; Ishida, H. Novel Mechanisms Modulating Palmitate-Induced Inflammatory Factors in Hypertrophied 3T3-L1 Adipocytes by AMPK. *J Diabetes Res*. **2018**, 9256482. DOI: 10.1155/2018/9256482
- LaMoia, T. E.; Shulman, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev*. **2021**, 42(1), 77–96. DOI: 10.1210/endrev/bnaa023

このアプリケーションで使用された製品

アジレント製品

[Agilent Seahorse XF Flex アナライザー](#) 

[Agilent BioTek Cytation ポートフォリオ](#) 

[Agilent Seahorse XF 細胞膜透過処理試薬](#) 

[Agilent Seahorse XF24 V28 細胞培養マイクロプレート](#) 

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

DE-015514

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2026
Printed in Japan, June 16, 2026
5994-9210JAJP

販売店