

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19108

研究課題名（和文）超解像蛍光寿命イメージングによるミトコンドリア膜電位のシングルクリステ解析

研究課題名（英文）Super-resolution fluorescence lifetime imaging for analysis of mitochondrial membrane potentials at the cristae level

研究代表者

多喜 正泰（Taki, Masayasu）

名古屋大学・物質科学国際研究センター(WPI)・特任准教授

研究者番号：70378850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：環境応答性かつ超耐光性を有するミトコンドリア内膜標識剤を開発し、シングルクリステレベルでのミトコンドリア膜電位の可視化計測を目指した。開発したプローブはミトコンドリア膜の極性環境の違いを感受して、異なる蛍光寿命を与えることを見出し、単一のミトコンドリアにおいても膜特性は不均一であることを明らかにした。この不均一性は、飽和脂質と不飽和脂質の割合に起因しているものと思われる。脱共役剤によりミトコンドリア膜電位を消失させたところ、膜の流動性が著しく減少することがわかった。膜電位の変化が脂質特性の変化を引き起こし、内膜形態や機能異常を誘発することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自の蛍光プローブを開発することにより、これまで計測が困難であったミトコンドリア内膜特性を評価できるようになった。ミトコンドリア膜特性は同一細胞内においても不均一であることを示した意義は大きい。膜特性と膜電位の相関性を検証することにより、細胞の生命維持活動機構について新たな知見が得られるであろう。ミトコンドリアの形態と機能は、様々な疾病と密接に関連している。本手法は遺伝子組換えを必要としないことから、ヒト細胞に対しても直接応用することでき、病態解明や病理診断にむけたツールとしての利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed an environment-responsive, super-photostable mitochondrial inner membrane labeling agent to visualize and quantify mitochondrial membrane potential at the single-cristae level. We found that the probe exhibits different fluorescence lifetimes depending on the polar environment of the mitochondrial membrane, and that membrane properties are heterogeneous even within a single mitochondrion. This heterogeneity is potentially attributable to the ratio of saturated to unsaturated lipids. Upon disruption of the mitochondrial membrane potential by a decoupling agent, a significant reduction in membrane fluidity was observed. Changes in membrane potential lead to alterations in lipid properties, which subsequently induce abnormalities in inner-membrane morphology and functions.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ミトコンドリア 蛍光プローブ 生体膜特性 蛍光寿命イメージング 脂質過酸化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞エネルギーと代謝の重要な調節因子であり、細胞の生命活動を維持する上で不可欠なオルガネラである。ミトコンドリアの主要な機能は、酸化的リン酸化による ATP 合成であり、電子伝達系によって形成される膜電位勾配を利用してこれを維持することで、ATP 合成を促進している。ミトコンドリア膜電位は多様な因子によって変動し、それがミトコンドリアのホメオスタシス維持機構に影響を与え、最終的には細胞全体の生理機能に変化をもたらす。例えば、カルシウムイオンのミトコンドリアへの侵入、内膜の脂質組成、およびミトコンドリア構造の変化は、膜電位の崩壊を引き起こし、ATP 合成の阻害を経て疾患の発症につながる。

ミトコンドリア内膜はクリステと内境界膜から構成されている。以前は膜電位が内膜全体で均一であると考えられていたが、電子伝達系の構成要素および ATP 合成酵素がクリステ側面に集積していることから、クリステと内境界膜で膜電位が異なると考えられるようになった。最近の研究では、各クリステが異なる膜電位を持ち、独立した生体エネルギーユニットとして機能していることが示唆され (Shirihai et al., EMBO J, 2019)、新たなミトコンドリア機能の概念が提唱された。

蛍光イメージングは、生きた細胞内のミトコンドリア膜電位を測定する上で有用な手法である。現在、ミトコンドリア膜電位の測定には、DiOC6(3)、ローダミン 123、JC1、DASPMI、テトラメチルローダミンメチルエステルなどの蛍光プローブが利用されている。しかし、クリステごとの膜電位の違いを評価するには、高い空間分解能を持つ超解像顕微鏡が必要である。STED 顕微鏡を用いることでクリステ構造の可視化が可能であるが、強力なレーザー光照射が必要なため、蛍光プローブのシグナルが速やかに消失してしまい、膜電位の経時的変化を捉えることが困難であった。

このような状況下、我々は高い光安定性を持つミトコンドリア標識剤 MitoPB Yellow を開発しており、これを用いることで超解像 STED イメージングによるクリステ動態のタイムラプス観察が可能になることを報告した (Taki et al., PNAS, 2019, 図 1)。MitoPB Yellow を基盤に、ミトコンドリア膜電位応答ユニットを連結することで、クリステごとの膜電位を定量的に評価する新たなツールが開発できると考えた。

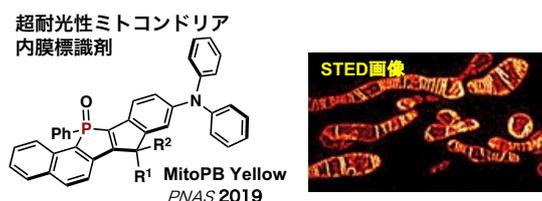


図 1. MitoPB Yellow によるミトコンドリアクリステ観察

2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 つのテーマを遂行することを目的とした。

① ミトコンドリア膜電位変化に応答する分子ツールの開発

超耐光性色素の分子骨格を基盤に、膜電位差に応じて蛍光寿命が変化する超耐光性のミトコンドリア膜電位プローブを開発する。

② 膜電位の定量的解析手法の確立

得られる知見を統合し、超解像蛍光寿命イメージング (STED-FLIM) によってクリステごとの蛍光寿命を取得する。

3. 研究の方法

① ミトコンドリア内膜標識剤の開発と機能評価

MitoPB Yellow で得られた成果を踏まえ、第 2 世代のミトコンドリア内膜プローブである MitoPB Red を開発した。その光物性について評価し、超解像 STED 顕微鏡および蛍光寿命顕微鏡 (FLIM) を用いて、ミトコンドリア染色能について検討した。

② 膜電位応答能の評価

超解像蛍光寿命イメージング (STED-FLIM) によりクリステ内膜を観察し、ミトコンドリアに酸化ストレスを与えた際のクリステ動態を可視化した。また、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP で処理した細胞の内膜特性の変化を追跡した。

4. 研究成果

① ミトコンドリア内膜標識剤の開発と機能評価

環境応答性の高い赤色蛍光ミトコンドリア内膜プローブとして MitoPB Red を開発した。

MitoPB Red で染色した細胞を STED 顕微鏡で観察した結果、明瞭なクリステ構造が観察され、内膜特異的な集積能が確認された (図 2)。次に FLIM を用いてミトコンドリア内膜特性を検証したところ、脂質組成の違いによる膜極性環境の変化を感受し、異なる蛍光寿命を示すことが明らかとなった (図 3)。FLIM 画像解析により、単一ミトコンドリア内で蛍光寿命が不均一であることが示され、内膜組成が不均一であることが示唆された。

ミトコンドリアの形態は膜組成や膜電位と関連している。光照射やアポトーシス誘導剤で処理した細胞では、脂質膜の酸化に伴って膜電位が消失し、ミトコンドリアが膨潤することが知られている。FLIM 観察の結果、膨潤したミトコンドリアは長い蛍光寿命、すなわち低極性の膜組成を有することが判明した (図 4)。これは、不飽和脂質が酸化されることで膜組成が再構成され、飽和脂質濃度が高くなるためと推察される。膜特性の変化は細胞内すべてのミトコンドリアで同時に起こるわけではなく、不均一に進行することが明らかになった。

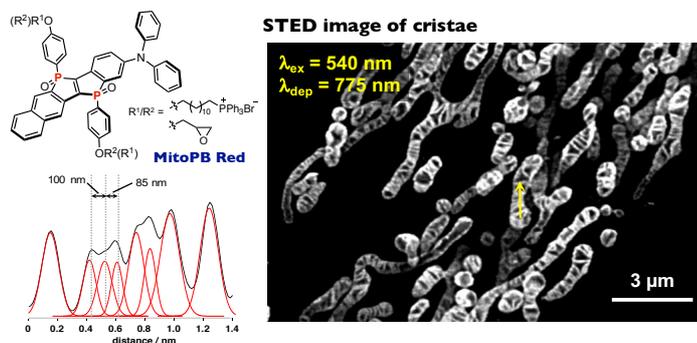


図 2. MitoPB Red の構造 (左上) とミトコンドリア内膜の STED イメージング画像 (右). 黄色の矢印に沿った蛍光強度をプロットし、フィッティングによりピークを分離したもの (左下).

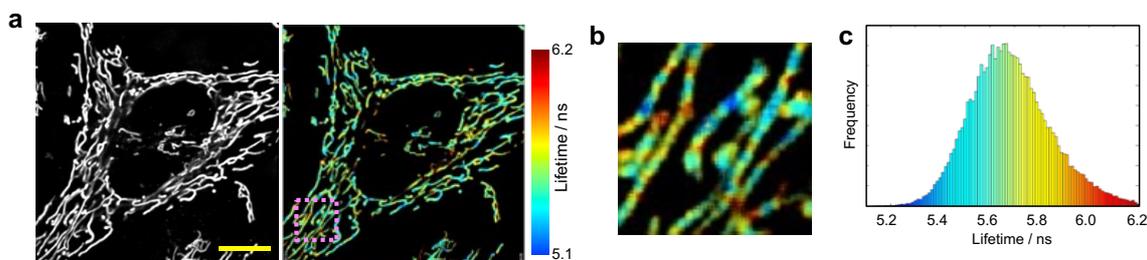


図 3. (a) MitoPB Red で染色したミトコンドリアの共焦点画像, および対応する FLIM 画像. 色は蛍光寿命を示す. (b) 破線四角内の画像の拡大図. (c) 1 細胞内における蛍光寿命のヒストグラム.

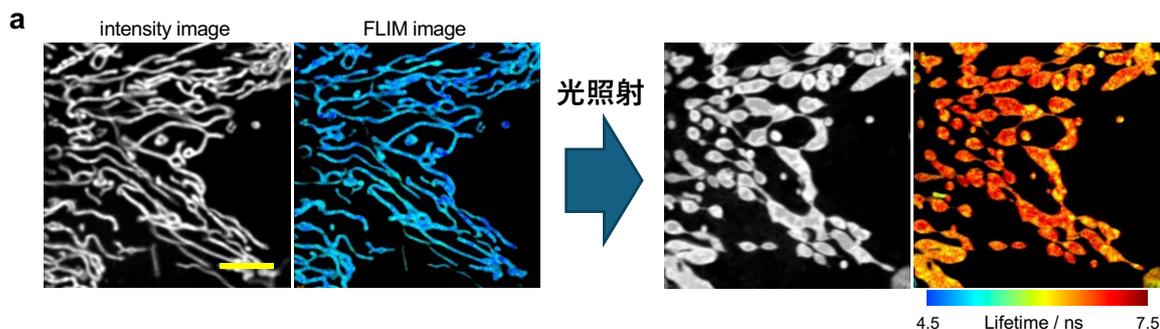


図 4. 光照射前後におけるミトコンドリア形態変化と膜特性変化

② 膜電位応答能の評価

FLIM と超解像 STED イメージングを組み合わせることで、クリステレベルでの膜不均一性の解析に取り組んだが、クリステ形態がダイナミックに変化するため、FLIM と STED の画像を同時に取得することが困難であった。そこで、ミトコンドリアの動きを抑制するために光照射を行い、ミトコンドリアを膨潤させた後に観察を行った。その結果、内膜と外膜が接触している領域 (IBM) は、クリステに比べて膜の流動性が高いことがわかった (図 5 a)。一方、クリステが密に集まっている領域では、比較的高い流動性が認められた。さらに、CCCP 処理により膜電位が喪失した場合、FLIM において蛍光寿命が大幅に延長し、膜の流動性が著しく減少することが確認された (図 5 b)。これは、膜電位の喪失によってマトリックスで活性酸素が発生し、これがミトコンドリア内膜の脂質を攻撃するため、脂質構成分子の再構成が進行したためであると考えられる。ATP 合成阻害剤バフィロマイシンで処理した場合も同様の傾向が見られた。膜電位の変化が脂質特性の変化を引き起こし、内膜形態や機能異常を誘発することが示唆される。

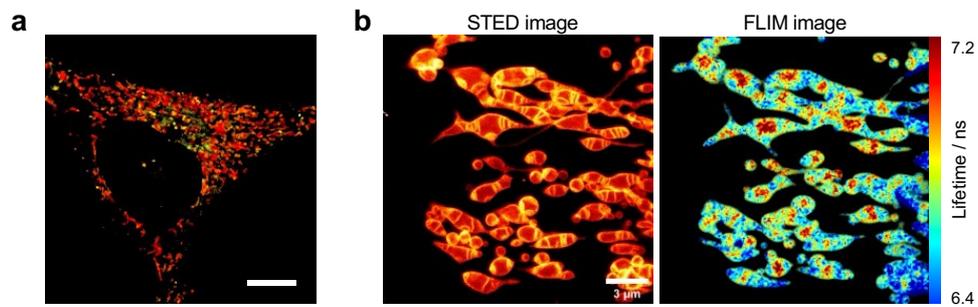


図5. (a) CCCPによって膜電位が低下したミトコンドリアの膜特性, (b) STED と FLIM を合わせたシングルクリステレベルの膜特性解析

クリステのダイナミックな挙動により、撮像に時間を要する STED と FLIM 観察は困難であったが、ミトコンドリアに酸化ストレスを与えて動きを抑制することで、単一クリステの蛍光寿命を観察することができた。蛍光寿命と膜電位の相関性については現在検討中である。高い時間分解能で超解像画像と蛍光寿命画像を取得できる新たな顕微鏡が開発されれば、本研究で開発したプローブによってクリステレベルでの膜電位解析が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Junwei, Taki Masayasu, Ohba Yohsuke, Arita Makoto, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Fluorescence Lifetime Imaging of Lipid Heterogeneity in the Inner Mitochondrial Membrane with a Super photostable Environment Sensitive Probe	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202404328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202404328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 多喜 正泰
2. 発表標題 環境応答性色素によるミトコンドリア膜動態追跡
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多喜 正泰
2. 発表標題 細胞内脂肪滴動態の長時間追跡に向けた分子技術開発
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多喜 正泰
2. 発表標題 超耐光性蛍光色素で観るオルガネラ動態
3. 学会等名 Evident Creative Forum 2024（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Masayasu Taki
2. 発表標題 Super-photostable Fluorescent Probes for Long-term Visualization of Cellular Lipids
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2024) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Masayasu Taki
2. 発表標題 Molecular Tools for Visualization of the Lipid Heterogeneity in Cells
3. 学会等名 9th International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry and Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ジアリールホスホニウム架橋型化合物及びそれを用いたミトコンドリア染色剤	発明者 多喜正泰, 山口茂弘, 村井征史, 袴田彩仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-031731	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------