科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号: 37104

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2015~2017

課題番号: 15K08165

研究課題名(和文)FIB/SEMによるミトコンドリアダイナミクスに関わる3次元的超微構造変化の解明

研究課題名(英文)Three dimensional ultrastructural background of mitochondrial dynamics using novel CLEM method

研究代表者

太田 啓介(Ohta, Keisuke)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号:00258401

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文):ミトコンドリアはその活動状態により大きく形を変えることが知られています。特に機能不全になるとその細長い形が球状に変化しますがその理由はわかっていません。本研究では、光学顕微鏡のリアルタイムイメージングと3次元電子顕微鏡技術を組み合わせた新しい観察法を開発することで、形態変化の瞬間に何が起こっているのかを詳細に解析することを可能にしました。その結果、機能を失ったミトコンドリアは物理的要素にのみ従って変形していくことを示唆する結果を得ました。これは、ミトコンドリアの形の本質を決める因子の存在を強く示唆するもので、我々の力の源であるミトコンドリアの特異な形の秘密を明らかにするガキとなる発見です。

研究成果の概要(英文): Mitochondria shape is drastically changed by cellular physiology. Mitochondrial dysfunction such as loss of membrane potential induces fragmentation of them, but the meaning of the mitochondrial structural variation has not been established. In this study, we developed a novel observation technique to address the detail structural backbone of mitochodrial dynamics and visualized the 3D microstructure of a moment of mitochondrial structural transformation. Here, we found that uncoupler administrated dysfunctional mitochondria shrank from their tubular shape into a globular shape without any fission and fusion and most of the globular mitochondria had some dents which shape was also referred as stomatocyte shape. This result strongly suggests existanse of hypothetic mitochondrial structural support mechanisms and loss of membrane potential probably trigger dissociation of the mechanisms. So our finding would be a key to understand the unique mitochondrial shape and their dynamics.

研究分野: 組織学・細胞生物学

キーワード: マイトファジー 膜電位低下 ストマトサイト 膜動態 リングミトコンドリア CLEM 3D-CLEM 電子

顕微鏡

1.研究開始当初の背景

真核生物において重要なエネルギー供給源であるミトコンドリアは、細胞内で極めて動的に動き回り、常にその形態を変化させる小器官である。その動的な形態変化の意義については多くの研究がなされているが、未だに明確な答えは得られていない。ダイナミクス、特に融合・分裂に関わる分子メカニズムの解析はかなり進んでいたものの、その詳細な形態学的背景はほとんど明らかになっていなかった。

ミトコンドリアの融合・分裂が最も注目さ れた理由の一つは、この動的変化が自身の品 質管理に深く関わっており、細胞の恒常性に 寄与すると考えられているからである。同様 に機能不全に陥ったミトコンドリアの除去 機構、マイトファジーも注目されている。細 胞内外の環境変化によりミトコンドリアの 膜電位が低下し機能しなくなると、ミトコン ドリアは急速にその形態を変え、断片化する。 この時分離された機能不全ミトコンドリア はマイトファジーと呼ばれるミトコンドリ ア選択的オートファジーにより除去される と考えられている。このようなミトコンドリ アの動的変化は主に蛍光顕微鏡による観察 と分子生物学的解析に基づいて示唆されて きたものである。しかし、これらの現象は分 子と形態の間をつなぐメソスケールと呼ば れる実空間において、どのような現象が起こ っているのか、ほとんど検証されていない。 膜の構造的変化を伴う生体現象の分子メカ ニズムには、数十 nm 程度の微小空間におけ る分子間相互作用が重要な役割を持ち、その 微小環境すなわち実空間での分子のふるま いを理解する必要がある。しかしながら、そ のような時間的、空間的に特異な環境を nm オーダーの分解能で可視化することは、技術 的に極めて困難であったため、技術的なブレ イクスルーが必要とされていた。ミトコンド リアがなぜ形態変化するのか?なぜ様々な 形態を持つのか?このような未だ推論にと どまる多くの生物学的課題において、極微領 域の時空間的構造情報の解明は、そのプロセ スを理解する上で重要な示唆を与えると共 に、近年発達してきた生物物理学的シミュレ ーション解析にも応用できる基礎データと なりえ、将来的には実空間での分子動態と実 際の生物現象のギャップをつなぐ検証を可 能にすると考えられる。

本課題で注目するミトコンドリアは、我々 真核生物において基本的な構成要素であり、 その形体は細胞の状態、また病態に依存して 大きく変化することが知られている。ミトコ ンドリアダイナミクスの形態学的背景を深 く理解し、その異議を明らかにすることが、 生命・医療の新しい視点になり得ることから、 現在も多くの研究者が注目する領域である。

2.研究の目的

(1) 本研究はミトコンドリアの動的形態変化

の過程に関わる微小環境・メソスケールの構造を電子顕微鏡レベルの分解能で且つ3次元構造として理解することを目的とした。

この目的を達成するには、先ず時空間的に特異な微小領域の構造を解析する手法の開発が必要であり、本研究の目的の一つは、その新技術の開発にあった。すなわち Live-Imaging combined 3D CLEM 法 (光電子相関顕微鏡法)である。

生体構造の高分解能3次元解析は我々がこれまでに開発発展させてきたFIB-SEMトモグラフィー法がある。本課題では、この手法に光学顕微鏡で動態を観るライブイメージングを組み合わせ、確実に時空間特異的構造を取得する手法を開発することにある。

(2) 新しく開発した手法を用いてミトコンドリアダイナミクスを新しい次元で解明することを目的としている。特に本課題では、ミトコンドリアの分裂機構、特に膜電位低下後に起こる急速な断片化に注目し、形態変化の意義を明らかにすることとした。

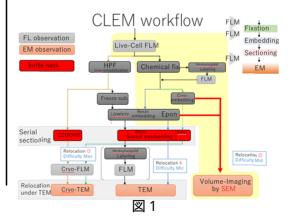
3. 研究の方法

HeLa細胞およびMEFの培養細胞系を用いミト コンドリアのダイナミクスを観察した。 ミトコンドリア自身は GFP 等の蛍光タンパク 質でラベルし、また、分裂関連タンパクも RFP、 APEX2 等を用いて遺伝的ラベルを行った。 観察はグリッドつき培養皿を用いて培養し た細胞に対し、共焦点レーザー顕微鏡で4秒 ~10 秒おきのタイムラプスイメージを取得 した。タイムラプス観察中に固定液で固定し、 位置と詳細な組織像を得た。その後 FIB/SEM 用の固定試料作成を行い、FIB-SEM トモグラ フィー観察を行い、3次元再構築像を得た。 膜電位低下には脱共役剤である CCCP(10uM) を用い、CCCP 投与前から固定終了後の 10 分 間までをタイムラプス観察した。 得られたデータをセグメンテーションし、そ

得られたデータをセグメンテーションし、そ の形態的特徴を解析した。

4. 研究成果

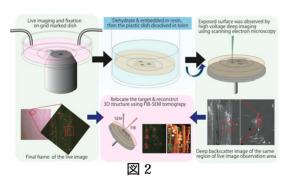
(1) Live-Imaging combined 3D CLEM 法の確立:従来の CLEM 法は、蛍光顕微鏡で観察後、固定脱水し、樹脂等に包埋後、連続切片を作製し、透過型電子顕微鏡(TEM)で観察するもので(図1)技術的ボトルネックにより、データを得るのに高い技術と長い時間



が必要であった。そのため、本課題は、この 技術的障壁をスキップするための新技術と して走査電子顕微鏡(SEM)ベースの3次元再 構築法、中でも FIB-SEM トモグラフィー法 をもちいたワークフローを採用した(図1黄 色背景 』 しかし試料調整には若干の困難が あり、再現性に欠けていたため、本課題では、 試料包埋後に、光学顕微鏡で観察した場所を 簡便に電子顕微鏡下に再観察する (Relocation) ための新技術を検討した。そ の結果、有機溶媒による試料表面露出法、樹 脂表面高加速電子観察法を開発し、簡易に目 的領域を観察する手法を見いだした(図2)。 細胞を SEM で観察するには細胞下面の基材 を除去する必要がある。従来法はカバーグラ スを用いるのが一般であるが、目印無しカバ ーグラスは細胞の Relocation が難しく CLEM に向かないこと、グリッドマーク付き カバーグラスを用いた場合はガラスの除去 の歩留まりが悪いこと、またガラス自身をフ ッ化水素で溶かす方法もあるが危険が伴う ことなど、いずれも問題点があった。我々は、 iBidi 社製グリッドつきプラスチックディッ シュを用い、観察後試料を型どおりにエポキ シ樹脂に包埋し、これをトルエンに浸漬し、 溶解する方法を見いだした。トルエンはこの プラスチックディッシュを溶かすが、エポキ シ樹脂には何の影響もなく、安全且つ確実に 試料表面を露出することができた。このブロ ックをそのまま SEM の試料台に乗せ、15k V の加速電圧で細胞を観察すると、細胞の形 態、内部の小器官の一部をそのまま観察する ことができた。この技術の確立により、極め て簡単に標的のリロケーションが可能にな り、光学顕微鏡で観察した領域と同じ場所を voxel サイズ 15nm³の分解能で確実に再構築 することが可能となった。

この技術の成果は、文部科学省科学研究費助成事業・新学術領域研究・学術研究支援基盤形成 「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」の支援メニューの一つとして、H28年度より提供を開始した。

http://www.nibb.ac.jp/abis/about-support/e m/e04



(2) 分裂関連タンパクの APEX2 ラベリング とその電子顕微鏡的局在観察

APEX2 を Drp1, MFF 等と連結し、細胞レベルでの 3 次元空間における分布解析を行った。

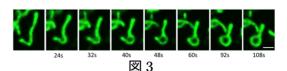
APEX2 を CMV プロモータ直下につないだ コンストラクトの強制発現株では、細胞内局 在に正常とは異なる分布を示したが、電子顕 微鏡レベルではミトコンドリア周囲に DAB 反応産物の分布が観察された。

(3) ミトコンドリア分裂タンパク局在微小領域の可視化

本目的のためにはミトコンドリア分裂予定 域を正確に把握する必要がある。我々は Drp-1RFP 発現株を作製し、ミトコンドリア上で Drp1 陽性を示す部位を前述の CLEM 法で観 察した。その結果、明確な点状 DRP1 陽性を 示す部位には、直径 50nm 程度のチューブで 連結されたミトコンドリアを観察すること ができた。しかし、その周囲に、MAM は観 察されず、従来の理解とは大きく異なること が明らかとなった。しかし、その周囲には MAM も多く、時として従来の説に近いチュ ーブ上小胞体の存在が観察されることもあ った。自然の状態でのミトコンドリアの分裂 頻度はそれほど高くなく、その過程をより精 度良く解析するには人工的に分裂を誘導し その過程を観察する必要があった。

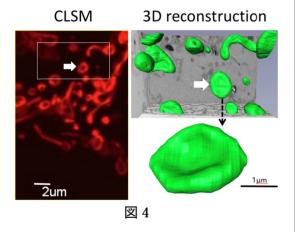
(4) 脱共役剤投与後の急性期ミトコンドリア形態変化の解析における Fission independent structural transformationの発見: CCCP 投与後の変化について多くの論文では4時間後~6時間後の時点で観察しているものが多く、この段階でミトコンドリアのほとんどは球形、もしくはマトリックスを蛍光タンパクで染めた場合(Su-9-GFP)は、中心部に蛍光の少ない領域を持つ、リングミトコンドリアと呼ばれる特殊な形態のミトコンドリアが観察される。球状のミトコンドリアが観察される。球状のミトコンドリアが観察される。球状のミトコンドリアが観察される。球状のミトコンドリアが観察される。球状のミトコンドリアの分裂が促進され、断片化が起こると考えられてきた。

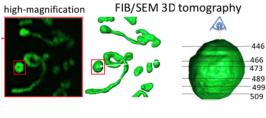
我々はミトコンドリアの分裂現象の過程を 段階的に観察する目的でこの現象の観察を 試みたが、当初全く予想外の結果が得られた。 CCCP 投与後のミトコンドリア形態変化は、 わずか数分で生じることが判った。さらにそ の過程を数100のミトコンドリアに対しライ ブ観察したところ、球形のミトコンドリア形 成がミトコンドリアの分裂とは全く独立に 生じており、長いミトコンドリアが、徐々に 軸方向に縮まりながら球形になることをみ いだした(図3)。

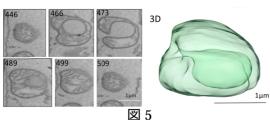


一方、この時、多くのミトコンドリアが蛍光 顕微鏡下にリング状を呈していた。リングミ トコンドリアは、高齢の生物の生体内でも時 折観察され、不全ミトコンドリアの特徴と考 えられており、その形成には自己融合が関わるとの報告がなされてきた。しかし、今回のライブ観察からは融合とも読み取りにくい結果であった。

(5) 不全リングミトコンドリアの CLEM 観 察は、光学顕微鏡的に観察されたリングミト コンドリアが真のリングでは無く、薄板状~ 壺型であることを明らかにした(図 4.5)。 CCCP 投与後、数分で分裂とは独立に球形に 変形したミトコンドリアの中心部は Su-9-GFP の蛍光強度の弱い領域が観られる。 この部分を CLEM 観察したところ、これら のミトコンドリアには貫通孔が観察されず、 中央部が大きくへこんだ、赤血球状~壺状の 形態を取っていることが明らかとなった。こ の時、ミトコンドリアのクリステの構造は正 常と大きく違わなかった。この結果は、この 試料の場合、マトリックス側を蛍光タンパク 質でラベルしているため、ミトコンドリアマ トリックスが極めて薄く、蛍光顕微鏡ではリ ング状に見えなかったといのが真実である ことを示しており、CCCP 投与後の形態変化 に自己融合が必須で無いことを明らかにし た。



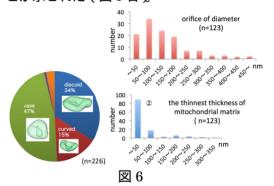




(6) 不全ミトコンドリアの真の形態が示唆する、不全ミトコンドリア形態変化の意味:我々は CCCP 処理後、球状ないしリング状になったミトコンドリアの 3 次元的構造226 個を解析し、その形態的特徴を明らかに

した。その結果、全体の7割近くが中央部に大きなへこみを有するものの、貫通孔を持たないことが明らかとなった(図6左)。しかも、そのうちの14%には、へこみの内部に小胞体やライソソーム、さらには別のミトコンドリアなどを引き連れているものが観察された。このことは、このへこみの中に引き込まれたオルガネラが特異的な現象で引き込まれたのでは無く、むしろ形態変化の途中で偶然周囲に存在していたオルガネラが細胞質と共にくぼみに吸い込まれた可能性を示唆している。

一方、壺型のミトコンドリア 123 個を対象に解析したところ、くぼみと周囲の細胞質をつなぐ細い連結路の直径がおよそ 100nm 程度と安定していること、また、最もへこんだところでは、マトリックスの厚さがほとんど 0 であり、反対側の内膜と接触する状態であることが示された(図 6 右)。



では、このような壺のような形の意味は何であろうか?膜で閉じられた構造と、その膜の表面積との表面積 / 体積比に関する物理学的なシミュレーションから予想されることは、この変化が単純な物理法則に従って起きたという可能性を示唆していた。

オルガネラの様な膜性小器官において、すべ ての外的な力がなくなると、最も安定な形態 は球体である。しかし、比表面積が球体より 大きい場合、中央が凹み赤血球様の形態が最 も安定となる。さらに高い比表面積では、ス トマトサイトと呼ばれる形が最も安定とな り、これは我々が観察した壺方ミトコンドリ アと本質的に同じ形態的特徴を持っていた。 以上より、今回の現象は元々チューブ状のミ トコンドリアが CCCP 暴露による膜電位消失 をトリガーに、その形を維持する何らかのシ ステムを破綻させ、その後物理法則に従い球 形に近づく収縮過程に従った考えることが できる。しかし、ミトコンドリアの比表面積 は球体より大きいため、中央がへこむストマ トサイト様構造になったと考えられる。

本課題では、分裂過程の観察のため脱共役剤を用いた分裂促進を見込んで実験系を組み立てたが、えられた結果からはそれとは真逆の驚くべき結論となった。このように、従来の見解をひっくり返す所見をもたらした新開発の CLEM 法は、従来法には無い本手法の有用性を示している。また、そこから得られた示唆は、未だ候補すら明らかでは無い、ミ

トコンドリア形態維持機構の存在を暗示するものであり、今後、ミトコンドリアダイナミクス研究を大きく前進させるものである。 5.主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

[雑誌論文](計8件)

1.Miyazono Y, Hirashima S, <u>Ishihara N</u>, Kusukawa J, <u>Nakamura KI</u>, <u>Ohta K</u>. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. (音読あり)

Sci Rep. 2018;8(1):350.

doi: 10.1038/s41598-017-18582-6.

2.Tamada H, Kiryu-Seo S, Hosokawa H, <u>Ohta</u> <u>K</u>, Ishihara N, Nomura M, et al. Three-dimensional analysis of somatic mitochondrial dynamics in fission-deficient injured motor neurons using FIB/SEM. (査読あり)

J Comp Neurol. 2017;525(11):2535-48.

doi: 10.1002/cne.24213

[学会発表](計 28 件)

- 1. Miyazono Y, Ohta K, Togo A, Nakamura K-i, New live imaging combined 3D-CLEM revealed a quick response of mito-chondrial transformation from tubular to a globular form after loss of membrane potential.

 19th International Microscopy Conference;
 2018 Sep.@ Sydney.
- 2. Ohta K, Miyazono Y, Okayama S, Nakamura K-i. Uncoupling induces fission independent transformation of mito-chondria from tubular to a globular form by live imaging combined 3D-CLEM. 日本顕微鏡学会第 74 回学術騰演会; 2018/5/29; 久留米 2018. p. 1p-S9-01.
- 3. Ohta K, Nakamura K-i. Electron micro-scopic three-dimensional visualization of cellular architecture. 第60 回日本顕微鏡学会記念シンポジウム; 宮崎: Oxford Univ. Press; 2017. i12. doi: 10.1093/jmicro/dfx051

4. Ohta K, Nakamura K-I, Correlative observation of mitochondrial dynamics in mammalian cells using live-imaging combined volume CLEM. The 3rd East-Asia Microscopy Conference: 2017; Busan.

[図書](計 1 件)

太田 啓介. SEM 連続断面観察(SSSEM)法による三次元形態観察 電子顕微鏡を用いたnm スケールの 3D 観察. In: 岡田 康,編. 初めてでもできる超解像イメージング. 東京: 用土社: 2016. p. 285-92.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

本課題で達成した、Live-Imaging Combined Volume-CLEM の技術は

文部科学省科学研究費助成事業・新学術領域研究・学術研究支援基盤形成 「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」の支援メニューの一つとして、

「培養細胞における Volume CLEM 支援」として H28 年度より技術提供を開始した。

http://www.nibb.ac.jp/abis/about-support/e m/e04

6.研究組織

(1)研究代表者

太田 啓介 (Keisuke, Ohta)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号:00258401

(2)研究分担者

(3)連携研究者

中村 桂一郎 (Kei-ichiro, Nakamura)

久留米大学・医学部・教授 研究者番号:20172398

岩根 敦子 (Atsuko, Iwane)

大阪大学・生命機能研究科・招聘教授

研究者番号:30252638

都合 亜記暢(Akinobu, Togo)

久留米大学・医学部・技術職員

研究者番号:80569517

岡山 聡子(Satoko, Okayama)

久留米大学・医学部・研究補助員

研究者番号:90733163

(4)研究協力者

宮園 佳宏 (Yoshihiro, Miyazono)

久留米大学・医学部・助教 研究者番号:80748674