

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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次元の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き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的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 mitochondrial 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 existance 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

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。従来法はカバーガラスを用いるのが一般であるが、目印無しカバーガラスは細胞の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ガ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、15kV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>

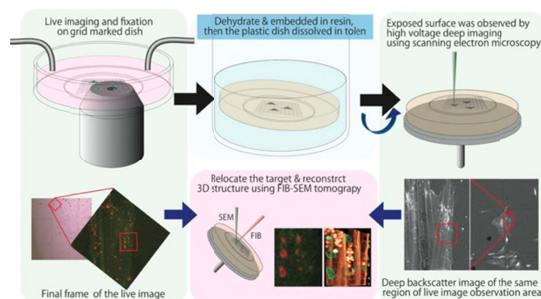


図2

(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Drp1 RFP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る。

(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は、その断片化により生じると考えられており、脱共役剤の投与後、ミトコンドリアの分裂が促進され、断片化が起これと考えられてきた。

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)。

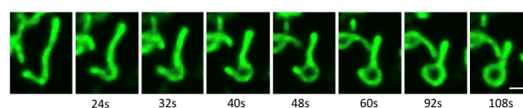


図3

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、光学顕微鏡ではリング状に見えなかったという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。

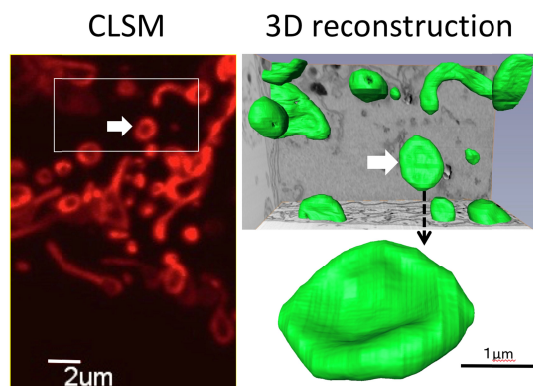


図 4

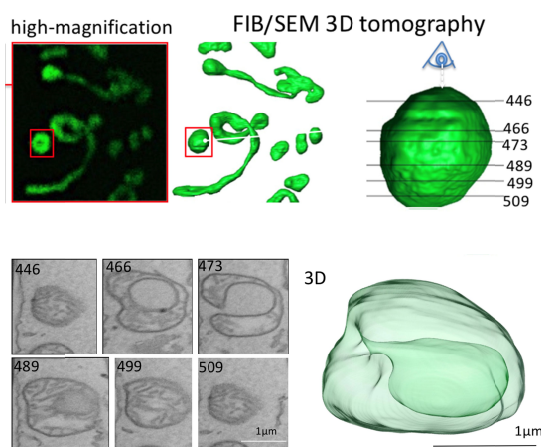


図 5

(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なく、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)。

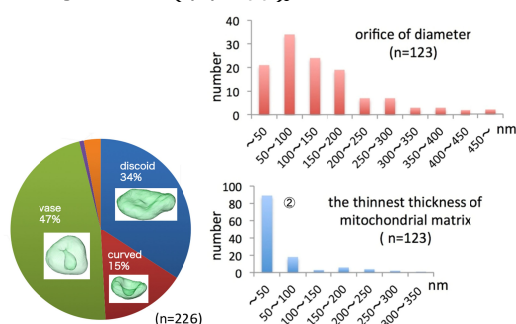


図 6

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場合、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, Ishihara N, Kusakawa J, Nakamura KI, Ohta K. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. (査読あり)

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

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

2. Tamada H, Kiryu-Seo S, Hosokawa H, Ohta K, 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 mitochondrial 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 mitochondria from tubular to a globular form by live imaging combined 3D-CLEM. **日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会**; 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/em/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