

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15075

研究課題名(和文) 老化過程におけるミトコンドリア・クリステ構造のリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real-time imaging of morphological changes in mitochondrial cristae during the aging process

研究代表者

大澤 郁朗(Ohsawa, Ikuroh)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：30343586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは老化と寿命制御の中核的オルガネラである。各呼吸鎖複合体はクリステ膜上に存在するが、その構造は200 nmの光学限界以下である為、そのダイナミズムとミトコンドリア機能との相関は不明である。本研究では、超解像STED顕微鏡を用いて、膜電位感受性色素(TMRM)で染色したミトコンドリアの内部構造(内膜クリステ)変化を数10 nmの解像度で経時的に観察する手法を確立した。さらに各呼吸鎖複合体のサブユニットを蛍光タンパク質でラベルしてクリステ上での局在を観察したところ、複合体IとIII、IVが近接したスーパーコンプレックスの存在を示唆する画像を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We applied stimulated emission depletion imaging with subdiffraction resolution to submitochondrial structures. Their shapes depend on both a cell's type and its physiological state. Staining with a cationic fluorescent dye, TMRM, unveiled intriguing details of lamellar structure, consisting of rapidly changeable, curtain-like formations. The TMRM-positive structure colocalized with neither protein in the matrix nor on the outer membrane, but partially localized with the nucleoid. Suppression of a component in the mitochondrial contact site disrupted the lamellar TMRM-positive structure. Uncoupling of the oxidative phosphorylation system released TMRM from the inner membrane without any alteration in the matrix structure. The approach presented here provides novel insights into the in vivo nature of submitochondrial structures, and can be used for further functional investigations of these complex structures.

研究分野：生体調節機能

キーワード：ミトコンドリア サブミトコンドリア構造 クリステ 超解像顕微鏡 膜電位 呼吸鎖複合体 スーパーコンプレックス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは活性酸素種の主要産生源であり、老化過程でミトコンドリア新生 (mitogenesis) は低下し、その除去機構 (mitophagy) の抑制が疾患の発症と寿命低下をもたらす (文献1)。申請者らもミトコンドリアの脂質過酸化で生じるアルデヒド類を除去する酵素 ALDH2 の活性低下で加齢に伴う認知機能障害が生じることを報告している (文献2)。近年、疾患や老化のメカニズムを知る上で、ミトコンドリアの断片化や巨大化などの構造異常を引き起こすミトコンドリア・ダイナミズム解明の重要性が増している。ミトコンドリアには内膜が存在し、ひだ状形態のクリステを形成している。マトリックス内に突き出たクリステ膜、外膜と面する内膜境界、両者を分けるクリステ接合部に分類でき、接合部にはミトコンドリア内膜形成機構 (MICOS) が存在する (図1)。酸化リン酸化 (OXPHOS) が主にクリステ膜上で行われることから、クリステ構造がミトコンドリア機能を制御している可能性が高い。実際、ミトコンドリア病患者では骨格筋細胞で異常増殖したクリステが観察され、老化過程では腎組織や筋細胞、神経細胞でクリステ構造の変性が見られる。しかし、クリステのミトコンドリア機能における重要性に鑑みて、生きた細胞での動的変化に関する研究はほとんど進んでいない。これは、クリステ構造が光学限界 (200 nm) より小さい為であるが、最近、50 nm 近い微細構造を観察できる超解像 STED 顕微鏡が開発された (文献3)。

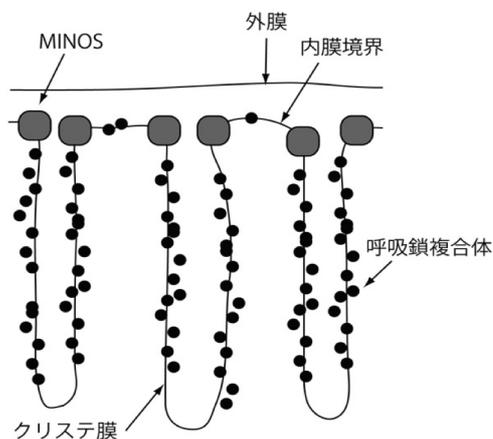


図1. クリステ構造の概略

### 2. 研究の目的

リアルタイムでのクリステ観察に適した蛍光タンパク質発現ベクターを作製し、特異的な蛍光色素と組み合わせ、超解像 STED 顕微鏡下でサブミトコンドリア構造の経時的変化を捉える。さらに MICOS 形成阻害や膜電位抑制などのミトコンドリア機能低下がクリステ構造変化に及ぼす影響を解明する。

近年、複数の呼吸鎖複合体から形成されるスーパーコンプレックス (SC) とミトコンドリア機能との相関が示唆されていることから、生細胞でこの SC の存在を確かめる。

### 3. 研究の方法

本研究では、比較的密度が高く、細長い枝分かれ構造を示すミトコンドリアを観察できるヒト肺基底上皮腺癌細胞由来の A549 細胞を用いた。細胞は 35 mm ガラスディッシュ (IWAKI) に播種し、一晚培養した。ミトコンドリア内膜は 50 nM TMRM で、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は SYBR Green (SG, 1/1000) で染色した。

複合体 I サブユニット NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 3、複合体 II サブユニット succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur protein、複合体 III サブユニット ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4 kD subunit、複合体 IV サブユニット cytochrome c oxidase、複合体 V サブユニット mitochondrial ATP synthase,  $\gamma$  subunit 1、ミトコンドリア外膜タンパク質 metaxin 2 の各遺伝子を HeLa 細胞由来の cDNA より PCR 法で増幅し pAcGFP1-N1 ベクターあるいは pDsRed2-N1 に挿入することで、蛍光融合タンパク質でラベルした各発現ベクターを構築した。Lipofectamine を用いて、これらのベクターにより A549 細胞を一過的に形質転換した。また、MICOS 構成タンパク CHCHD3 は siRNA (Sigma 社製) で knockdown した。

超解像顕微鏡画像は Leica TCS SP8 STED 3X microscope を用いて取得した。STED 光は 660 nm を用い、ピクセルサイズは 5 から 20 nm に設定して、0.5-6.5 ns のゲートを懸けた。画像取得後、Huygens 社ソフトウェアで deconvolution し、ノイズを除去した。

### 4. 研究成果

A549 細胞ミトコンドリアを TMRM で染色した。従来の共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像ではミトコンドリア内部の超微細構造は観察できていない (図2A)。次に、STED 顕微鏡を使用して画像を取得し (図2B)、deconvolution を行った (図2C)。これにより、ミトコンドリア内部にドレープ様のひだ状構造を観察することが出来た。その半値幅 (FWHM) は  $\sim 90$  nm で (図2D)、75-300 nm 程の間隔で存在していた (図2E)。

ミトコンドリア構造体であるマトリックスはマトリックスに局在する mtYFP タンパク質で、mtDNA は SG で、外膜は metaxin 2-GFP 融合タンパク質でそれぞれ可視化し、TMRM で染色後に STED を用いて観察した。また、ミトコンドリアの代表的色素である MitoTracker Green (MTG) と TMRM での二重染色を行った (図3J-L)。その結果、mtYFP と TMRM はほとんど重なり合わず、縞状に存在していることがわかった (図3A-

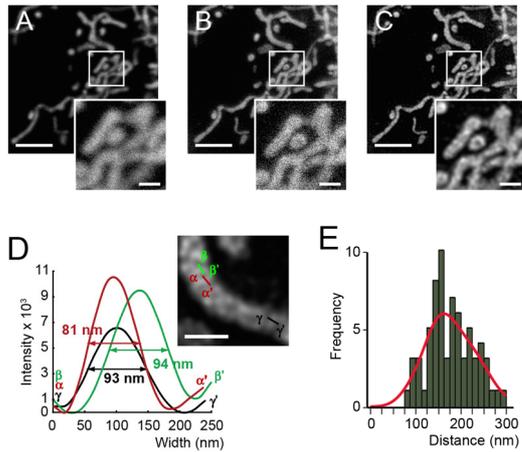


図2. 生細胞ミトコンドリアのTMRM染色像.  
A: 共焦点, B: STED, C: Bのdeconvolution画像. Scale bars, 2  $\mu\text{m}$  (挿入画像内 500 nm).  
D: 半値幅. E: ひだ状構造中心線からの距離

C)。それぞれの輝度をチャートにした図3Cでも mtYFP と TMRM のピーク位置は異なっており、交互に存在していることがわかる。さらにマトリックスに存在する核様体に内包された mtDNA は、TMRM で染められたひだ状の構造にはまり込むように存在し、ひだ状構造体と一部で接触している (図3D-F 内矢印)。これは核様体が内膜にアンカーしているという報告と一致する。一方、TMRM 染色像は metaxin 2 で標識された外膜に囲まれ、交差は見られない (図3G-I)。尚、ミトコンドリア膜電位に対する感受性が低い MTG は、ドット状の染色像がミトコンドリア全体を非特異的に覆っており、TMRM 染色像とは全く異なる (図3J, K)。以上の結果から、TMRM で染められたひだ状の構造は、外膜内でマトリックスと核様体を覆うように存在すること

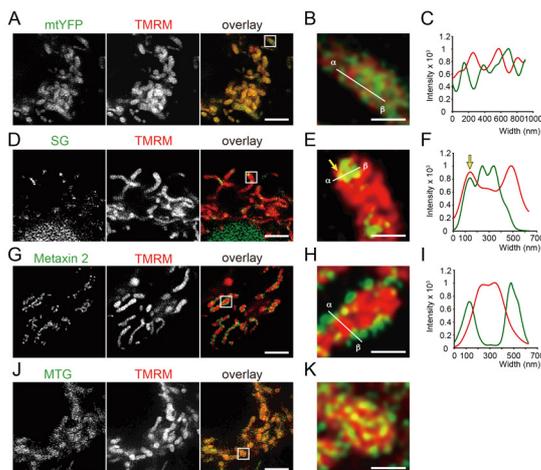


図3. サブミトコンドリア構造とTMRM染色像.  
Scale bars, 2  $\mu\text{m}$  in A, D, G, and J, and 500 nm in B, E, H, and K.

から、内膜クリステ構造であることが示された。

この TMRM で染色されたクリステ構造を経時的に観察した。その結果、サブ秒で急激にひだ状の構造が変化していることを突き止めた (図4)。

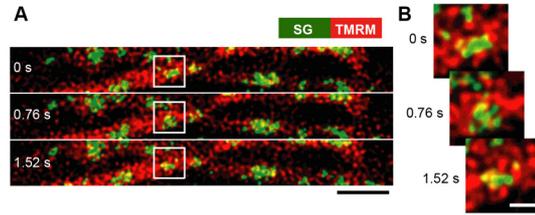


図4. 急激に変化するクリステ構造. Scale bars, 500 nm in A and 100 nm in B.

TMRM で染色されたクリステ構造が MICOS 変性により消失することを確認するため、MICOS サブユニットである CHCHD3 を siRNA により knockdown し、クリステ構造の変化を観察した (図5)。断片化したミトコンドリアは mtDNA を中心に球状の形態を

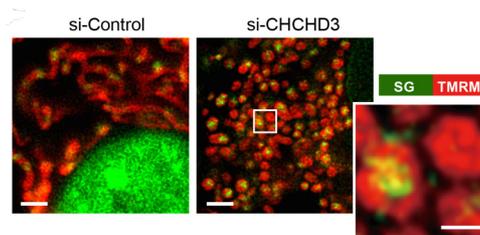


図5. MICOS 変性によるクリステ構造の消失.  
Scale bars, 2  $\mu\text{m}$  (挿入画像内 500 nm).

示し、予想通り、内部にクリステを示唆するような特徴的ひだ状構造を持ったミトコンドリアはほとんど観察されなかった。

次いで、ミトコンドリア膜電位が消失するとクリステ構造にどのような変化が起きるのか観察した (図6)。細胞に antimycin A、oligomycin、FCCP を順次投与し、TMRM の変化を観察した。FCCP 投与5分後に TMRM の解離が始まり、10分後には消失した。一方、mtYFP で標識されたマトリックスの形態は保たれていた。このことから、膜電位が消失しても短時間ではクリステ構造が破壊されないことが判明した。

大半の呼吸鎖複合体 I-V はクリステ上に存在すると考えられている。そこで TMRM 染色像と呼吸鎖複合体の位置関係を解析した。GFP でラベルした呼吸鎖複合体 I-V のサブユニットを一過的に発現させ、TMRM で染色したところ、全ての呼吸鎖複合体サブユニットとも TMRM の近傍に発現しているが、完全に重なり合っていない (図7A-E)。そこで GFP の輝度のピークから最も近い TMRM の輝度のピークまでの距離を測定し、

確率密度関数をカーネル密度推定により求めた。その結果、各呼吸鎖複合体サブユニット

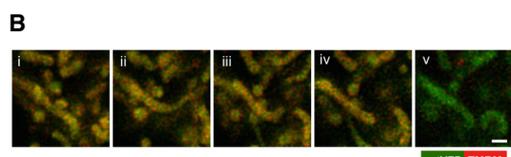
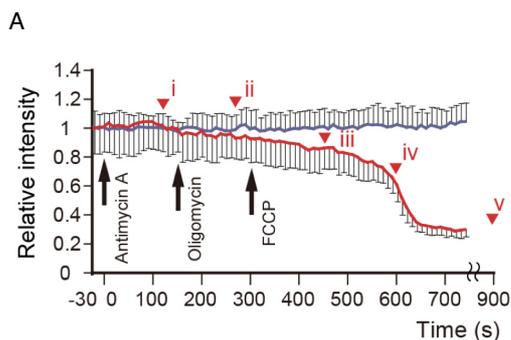


図6. 膜電位の消失によるクリステ構造の変化. (A) TMRMの蛍光強度で示した阻害剤投下による膜電位の低下. (B)サブミトコンドリア構造変化. Scale bar, 500 nm.

とも TMRM によって染められたクリステ構造から 20 nm 前後の距離に分布していた (図 7 G-K)。

本研究で観察されたクリステ構造のモデル図を示す (図 8)。TMRM 1 分子が発した蛍光の FWHN は~60 nm であり、TMRM で染色されたクリステ構造の FWHN は~90 nm ほどの幅を持って存在していた。この結果から、TMRM が発した蛍光は 20~30 nm の幅で重なり合って観察されていると推定される。

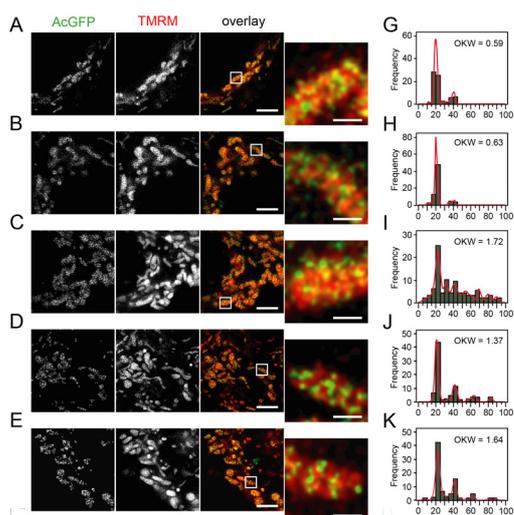


図7. 呼吸鎖複合体サブユニットの STED 画像. Scale bars, 2  $\mu$ m (挿入画像内 500 nm). (G-K) カーネル密度推定 (赤線). OSW, optimal kernel width. A, G: 複合体 I サブユニット; B, H: 複合体 II サブユニット; C, I: 複合体 III サブユニット; D, J: 複合体 IV サブユニット; E, K: 複合体 V サブユニット.

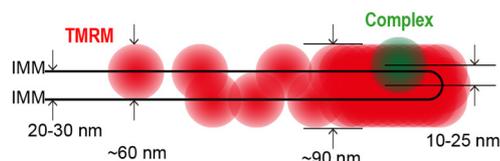


図8. STED 画像において TMRM で染色されたクリステ構造のモデル. ミトコンドリア内膜 (IMM) が陥入したクリステのマトリックス側に TMRM (赤) が局在し、IMM 上に複合体サブユニット (緑) を観察できる。

また、各呼吸鎖複合体サブユニットはクリステ構造から 20 nm 前後の距離で存在していた。TMRM が発した蛍光が最も強く観察される部分 (重なり合っている部分) をクリステの中心とすると、そこから 20 nm 前後の距離に GFP の蛍光 が存在している。すなわち、クリステの膜表面から 5~10 nm の距離で、各複合体サブユニットがそれぞれの複合体に組み込まれる形で存在していると考えられる。

従来から SC は blue native ポリアクリルアミド電気泳動法 (BN-PAGE) で検出されているが、生細胞でその存在は確認されていない。そこで SC の存在を検証した (図 9)。DsRed (赤) で標識した複合体 I サブユニットと AcGFP (緑) で標識した他の複合体サブユニットとの距離を画像解析したところ、I と II は重ならず、距離が 10 nm 以上離れていた。I と II は SC 構造を取らないと考えられており、観察結果と一致する。一方、I と III 及び IV は重なって黄色くなり 10 nm より近接しているケースが観察された。V でも同様に I と近接しているケースが観察された。これらは SC を形成していると考えられる。また、I

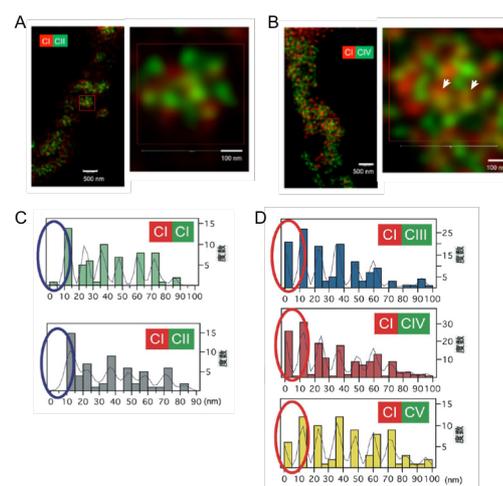


図9. 生細胞での SC 可視化. (A) 複合体 I と II. (B) 複合体 I と IV. 重なっている箇所を矢印で示す. (C) 複合体 I 同士及び複合体 I と II 間距離の分布. (D) 複合体 I と複合体 III, IV 及び V との距離の分布. 赤線で囲った 10 nm 以下で隣接したシグナルが認められる。

同士は予想通り 10 nm 以上離れ、近接していないことが示された。

本研究で、超解像 STED 顕微鏡によって、生細胞でミトコンドリア内クリステに相当するひだ状構造が観察できた。経時的解析により、クリステは高速(サブ秒)に変形していることが確認された。従来は主にミトコンドリアの外観から機能と構造の変化が議論されてきたが、今後は老化過程などにおける内部構造との機能相関が解析可能である。また、結晶構造解析から複合体 I、III、IV の SC は長径 10 nm と推定されているが、今回の画像解析により複合体 I、III、IV が 10 nm 以内に近接して検出された結果と一致する。複合体 I と SC を形成しない複合体 II や I 同士では近接しているものがほぼ検出されなかったことは、複合体 I、III、IV の近接画像が特異的であり SC を示している可能性を強く支持している。また、複合体 I と V でも近接画像が得られた。複合体 V も SC を形成しているとする報告もあり、今回の結果はこれを支持している。

#### <引用文献>

- ① 大澤郁朗.酸化ストレス防御系の破綻とアルツハイマー型認知症. 医学の歩み 2010; 232:698-704,
- ② Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S. Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. *J Neurosci.* 2008; 28(24):6239-6249.
- ③ Willig KI, Kellner RR, Medda R, Hein B, Jakobs S, Hell SW. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat Methods.* 2006; 3(9):721-723.

#### 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 4 件)

- ① Takahashi K, Ohsawa I, Shirasawa T, Takahashi M. Optic atrophy 1 mediates coenzyme Q-responsive regulation of respiratory complex IV activity in brain mitochondria. *Exp Gerontol.* 査読有, 98:217-223, 2017. DOI: 10.1016/j.exger.2017.09.002
- ② Murakami Y, Ito M, Ohsawa I. Molecular hydrogen protects against oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell death through the process of mitohormesis. *PLoS One.* 査読有, 12(5):e0176992, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176992
- ③ Takahashi K, Ohsawa I, Shirasawa

T, Takahashi M. Early-onset motor impairment and increased accumulation of phosphorylated- $\alpha$ -synuclein in the motor cortex of normal aging mice are ameliorated by coenzyme Q. *Exp Gerontol.* 査読有, 81:65-75, 2016.

DOI: 10.1016/j.exger.2016.04.023

- ④ Ishigaki M, Iketani M, Sugaya M, Takahashi M, Tanaka M, Hattori S, Ohsawa I. STED super-resolution imaging of mitochondria labeled with TMRM in living cells. *Mitochondrion.* 査読有, 28:79-87, 2016. DOI: 10.1016/j.mito.2016.03.009.

#### [学会発表] (計 13 件)

- ① 高橋真由美、大澤郁朗、白澤卓二、高橋和秀. OPA1はコエンザイムQによる脳ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの活性調節に関与する. 第40回日本分子生物学会大会. 神戸、2017.12.6-9
- ② 大澤郁朗、池谷真澄、村上弥生、高橋真由美. 水素分子のミトホルミシス効果. 第17回日本ミトコンドリア学会年会. 京都、2017.11.22-23.
- ③ Masumi Iketani, Takuya Urushibara, Jumi Ohshiro, Mayumi Takahashi, Hideo Kawaguchi, Ikuroh Ohsawa. Preadministration of H<sub>2</sub>-water protects mice against LPS-induced liver injury with HO-1 expression. 第40回日本基礎老化学会大会. 名古屋、2017.6.14-16.
- ④ 池谷真澄、高橋真由美、大澤郁朗. 超解像 G-STED 顕微鏡を用いた生細胞ミトコンドリア内部構造の可視化. 第6回 TOBIRA 研究交流フォーラム. 東京、2017.5.12
- ⑤ 高橋真由美、井上律子、三浦正巳、大澤郁朗、白澤卓二、高橋和秀. 水溶化コエンザイム Q は老齢マウス運動皮質におけるリン酸化  $\alpha$ -synuclein の蓄積を抑制し運動機能低下を改善する. 日本コエンザイム Q 協会第14回研究会、八王子、2017.2.7
- ⑥ 高橋真由美、大澤郁朗、白澤卓二、高橋和秀. 水溶化コエンザイム Q は老齢マウスにおける運動機能低下を改善しリン酸化  $\alpha$ -synuclein の運動皮質への蓄積を抑制する. 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016.11.30-12.2
- ⑦ Iketani M, Hata N, Ishigaki M, Sugaya M, Takahashi M, Tanaka M, Hattori S, Ohsawa I. STED imaging of super complex in mitochondrion. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research

and Medicine (ASMRM), The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Tokyo, Japan, 2016.10.30-11.1

- ⑧ 大澤郁朗. ミトコンドリア酸化ストレス防御の破綻と認知症. ゲノム創薬・医療フォーラム第6回談話会、招待講演、東京、2016.6.30
- ⑨ 畑七瀬, 石垣匡也, 菅谷麻希, 池谷真澄, 高橋真由美, 田中雅嗣, 服部成介, 大澤郁朗. ミトコンドリア上における呼吸鎖スーパーコンプレックスの可視化. 第39回日本基礎老化学会大会. 伊勢原、2016.5.27-28
- ⑩ 大澤郁朗. 招待講演. ミトコンドリア酸化ストレス防御とサブミトコンドリア構造. 第4回ミトコンドリア機能研究会. 大阪、2016.1.30
- ⑪ 石垣匡也, 池谷真澄, 高橋真由美, 服部成介, 大澤郁朗. 超解像顕微鏡を用いた生細胞クリステの可視化. 第15回日本ミトコンドリア学会年会、福井、2015.11.19-20
- ⑫ 日野雅予, 石渡理花子, 深澤みゆき, 内田俊也, 大澤郁朗. ネフローゼ症候群モデルでのミトコンドリア活性増強を介した細胞障害と水素分子によるその抑制効果. 第15回日本ミトコンドリア学会年会、福井、2015.11.19-20
- ⑬ 高橋真由美, 大澤郁朗, 高橋和秀. 加齢に伴うマウス大脳のミトコンドリア機能低下とコエンザイムQによる回復. 第38回日本基礎老化学会年会、横浜、2015.6.12-14

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmghig.jp/research/team/roukas eigyo/seitaichousetsukinou/>

大澤郁朗. 超解像顕微鏡で見たミトコンドリアの内側. 耳寄り研究情報, 東京都健康長寿医療センター研究所

<http://www.tmghig.jp/research/topics/201608/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大澤 郁朗 (OHSAWA, Ikuroh)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：30343586

(2)研究分担者

本田 修二 (HONDA, Shuji)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40100127

(3)連携研究者

池谷 真澄 (IKETANI, Masumi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60644359