

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14744

研究課題名（和文）新・光-電子相関顕微鏡法による異常形態ミトコンドリア形成過程と微細構造変化の解明

研究課題名（英文）Clarification of mitochondrial malformation and ultrastructural change by new correlative light and electron microscopy

研究代表者

宮園 佳宏（Miyazono, Yoshihiro）

久留米大学・医学部・臨床研究員

研究者番号：80748674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では光学顕微鏡像から次世代電子顕微鏡FIB-SEMを用いて膜電位低下モデルで形態異常を来したミトコンドリアの微細構造変化を解析した。その結果、脱共役直後のミトコンドリア長軸方向収縮による形態変化はリング状ではなく球体陥没構造であることがわかった。長時間試薬暴露群ではミトコンドリア内部の膨張やクリステの形態変化を認めたものの球体陥没構造は維持していた。異なる脱共役薬を使用した場合には陥没球体構造は再現されず、球体構造のみ確認された。これらの形態変化は各種脱共役反応下では収束する形態が決定している可能性が示唆された。これらの結果は正常ミトコンドリアの形態維持機構の解明に寄与すると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞内の膜電位低下ストレスに応じてミトコンドリアの形態がどのように変化するかを形態的に明らかにすることを目的とした。ミトコンドリアは細胞内のストレスに対する適応反応としてリング状や顆粒状へと形態変化するが、ミトコンドリアの形態変化についての詳細は不明なままである。本研究では、細胞実験においてミトコンドリア形態変化の初動を動的かつ3次元的に捉えるため、形態異常のミトコンドリアを誘導後、電子顕微鏡FIB/SEMと光学顕微鏡を組み合わせたライブイメージング・三次元光-電子相関顕微鏡法を用いた。その動的変化と超微細構造変化はミトコンドリア形態変化の基盤的知見になり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：Loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) triggers dramatic structural changes in mitochondria from a tubular to globular shape, referred to as mitochondrial fragmentation; the resulting globular mitochondria are called swelled or ring/doughnut mitochondria. We evaluated structural changes during the  $\Delta\psi$  loss-induced transformation after carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine (CCCP) and valinomycin administration using a newly developed correlative microscopic method combined with fluorescence microscopic live imaging and volume electron microscopy. We found that most mitochondria changed from a tubular shape to a globular shape without fusion or fission and typically showed ring shapes after CCCP and Valinomycin exposure. In contrast, most ring mitochondria did not have a true through hole; rather, they had various indents. Our results suggested that loss of  $\Delta\psi$  triggered collapse of mitochondrial structural support mechanisms.

研究分野：ミトコンドリア

キーワード：ミトコンドリア FIB/SEM Live-imaging 3D CLEM

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは独自の DNA を持ち、分裂・融合を繰り返しながら品質管理を行うオルガネラである。正常な細胞では棒状、もしくは紐状の形態を呈することが多いが、ストレス環境下(酸化ストレス・低酸素・アポトーシスなど)では顆粒状やリング状の形態を呈することが知られている。網膜や神経細胞の例ではストレス環境下に晒されるとミトコンドリアは顆粒状の形態に移行する前段階でリング状に変化する。また、アルツハイマー型認知症・老化モデル動物の神経シナプスにおいてはリング状ミトコンドリアが出現すると記憶障害が出現する機能と形態が密接に関わる事が強く示唆されている。

このように不良ミトコンドリアの蓄積は生体内にとって酸化ストレスを生み出す要因となり、やがては機能障害を引き起こす危険性を伴うため、速やかに処理される必要がある。上記のようなリスクを回避するためミトコンドリアは品質管理としてマイトファジーを行う。先行研究では細胞に脱共役薬 CCCP を暴露させると、その脱共役反応によってプロトンの濃度勾配が制御不能となり、ミトコンドリア膜電位低下を来した障害ミトコンドリアが隔離膜で被覆され、選択的に排除される事が報告されている。隔離膜が出現する排除機構の後期においてオートファジー関連因子などを含む分子レベルでの解明は進んで来たが、障害されたミトコンドリア自体がどのような形態変化を辿っているのかについての詳細は不明である。従来、この試薬 CCCP によるミトコンドリアの形態変化は膨化や分離であると解釈されて来たが、リング状ミトコンドリアの出現も報告されており、ミトコンドリアの形態変化に対して統一的な見解がなされていない現状にある。従って、ミトコンドリアの機能形態を理解するためにはミトコンドリアがどのように形態を変化させるのか、どのように正常な形態を維持しているのかの「問い」を明らかにする必要がある。ミトコンドリアの観察はその大きさ故、観察条件に制約が多い。概形観察は光学顕微鏡で可能だが、外膜・内膜レベルやその他膜接触を評価する上では分解能が足りない。また、外膜の連続性や空間的位置関係に重なりがある場合は光顕レベルの形態的評価を更に困難にする。一方、膜の形態評価においては電子顕微鏡観察が有効な反面、固定試料による評価のため形態変化を追従する動的な観察は出来ない。これらの問題を解消するため、申請者は共焦点蛍光レーザー顕微鏡および FIB/SEM を組み合わせた世界初の **Live-imaging 3D-CLEM** ( **Live-imaging 3D-CLEM** ) methods を確立した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は確立した Live-imaging 3D-CLEM 観察法を用いてミトコンドリアの形態が機能低下とともにどのように変化していくのかの形態変化機序を明らかにすることである。

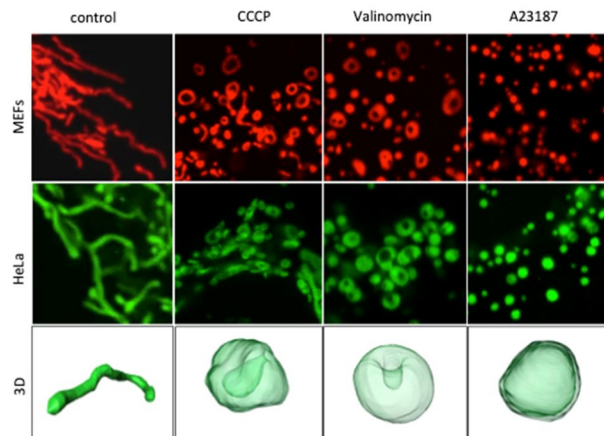
### 3. 研究の方法

対象生細胞(マウス胎児由来線維芽細胞、HeLa 細胞)のミトコンドリアを GFP、RFP でラベルし、各試薬(脱共役剤)投与前後で形態変化の初動を光顕(FV1000, Olympus)のタイムラプス動画で観察する。観察中に half-Karnovsky 固定液にて前固定し、電子染色(四酸化オスミウム、チオカルボ水溶液、酢酸ウラン、鉛)を経て、脱水・エボン樹脂包埋後、完全重合させ電顕観察用の試料作製を行う。培養皿底面に掘られた座標面が樹脂側へトレースされるため光顕観察部位と同部位の細胞を特定し、同部位のミトコンドリアを電子顕微鏡 FIB/SEM (Quanta3G

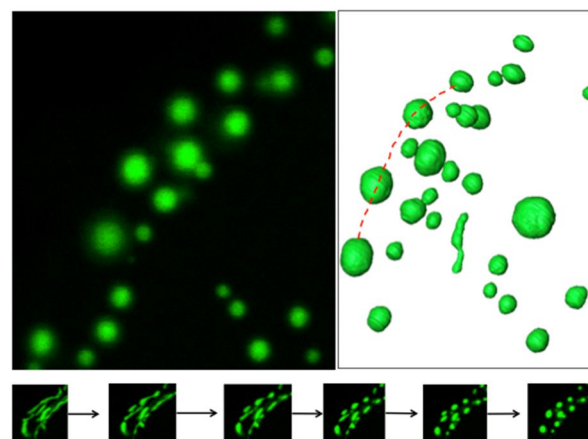
FEG, FEI)で観察する。観察条件はミトコンドリアの膜形態評価が最も適切な倍率である 15000 倍(ボクセルサイズ 4.8nm × 4.8nm × 15nm)を選択し、得られたデータを画像解析ソフト Avizo®にて 3次元再構築した。

#### 4. 研究成果

まずは細胞に各脱共役試薬を投与してミトコンドリアがどのように形態変化していくかを光学顕微鏡で調べた。細胞内のミトコンドリアは CCCP (10-20 μM) や Valinomycin (10 μM) の脱共役試薬投与後、光学顕微鏡レベルではドーナツ型やリング状に観察されたが、A23187 投与後は小球状に変化した。CCCP や Valinomycin 投与群で見られた陥没像は A23187 (10 μM) 投与群では

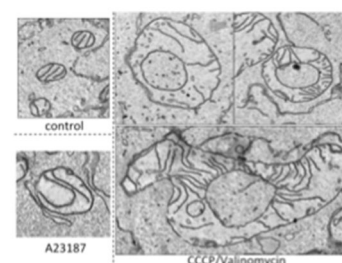


一切認められなかった。次に、実際の三次元形態を確認するため、光学顕微鏡のライブイメージングにて観察を行った同一ミトコンドリアを電子顕微鏡 FIB/SEM にて観察したところ、CCCP 投与群と Valinomycin 投与群はミトコンドリアが陥没構造を有する壺状形態に変化する傾向にあった。しかし、A23187 投与群は単なる小球状に変化していたことが分かった。(右上図：各試薬投与後の光学顕微鏡像と 3D 像の比較)



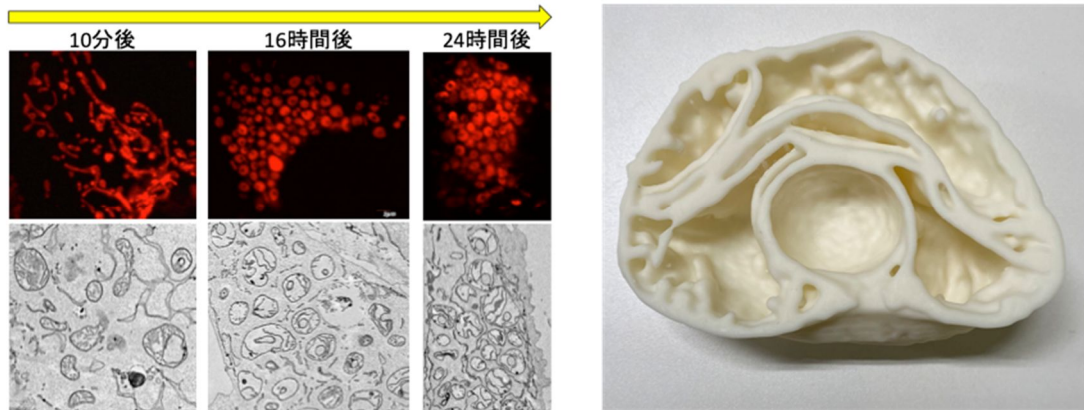
ライブイメージング観察中において、CCCP 投与群や Valinomycin 投与群は1つのミトコンドリアが長軸方向に収縮していく動きを見せていくのに対して、A23187 投与群のミトコンドリアは1つの紐状ミトコンドリアが複数の小球状ミトコンドリアに断裂したかのように見えた。(右図:A23187 投与後のライブイメージング像およびその形態変化後の 3D 像)

光学顕微鏡上では A23187 投与後にミトコンドリアの膜破壊が起こったかのように見えたが、透過型電子顕微鏡(TEM)で確認してみたところ、ミトコンドリアに明らかな膜の損傷は見受けられず、何らかの分裂が起きたと考えられた。(右図:各試薬投与後の TEM 像)これらの結果から各脱共役試薬に関連する水素イオン、カリウムイオン、カルシウム

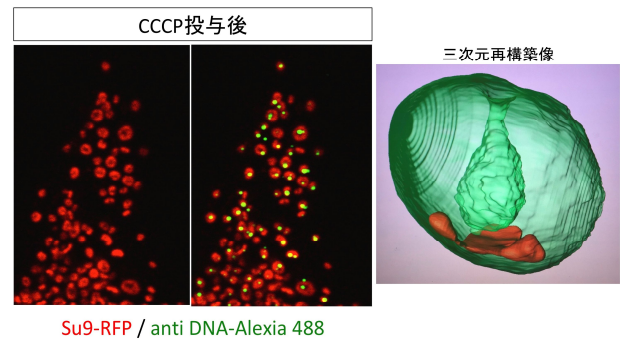


イオンの濃度勾配の変化が壺状ミトコンドリアの出現パターンに関連があることが示唆された。また、CCCP や Valinomycin で認められた壺状ミトコンドリアが長時間経過するとどのような変

化を経ていくのかを調べた。壺状のミトコンドリアは 16~24 時間経過しても窪みが消失することなく、陥没構造を維持していた。また、マトリックス領域が初期形態より膨張し、クリステ構造は内膜寄りに網状構造を呈し、一部隔壁の様な特徴的なクリステ構造を認めた。(左下図: CCCP 投与後 10 分後~24 時間後の光学顕微鏡像および透過型電子顕微鏡像、右下図: 3D プリンターで作製した CCCP 投与 24 時間後のミトコンドリア断面像の写真)



また、光学顕微鏡像でリング状ミトコンドリアとして観察される時にミトコンドリア DNA はリング中央に位置することが多い傾向にあった。この理由は壺状ミトコンドリアの陥没基底部にミトコンドリア DNA が局在する場合にリング中央に存在するように観察されてしまうことが原因であることが分かった。(右図)



本課題では脱共役剤投与によって誘導できた壺状ミトコンドリアのモデルに焦点をあてた実験系を組んだ。これらの結果から壺状ミトコンドリアの形態的特徴や傾向を断片的にはあるが伺い知ることが出来た。これらの構造は何らかの方法でこの陥没形態を維持していると思われるが、今回はそこを正確に解明できる統計的な形態評価や生化学的な評価まで踏み込めなかったのが反省点である。しかし、今まで考えられてきた光学顕微鏡像とは明らかに異なる三次元像を捉えることが出来たし、3D-CLEM 観察法がミトコンドリア形態観察において有効な手法であったことを再確認することが出来た。これらの結果や CLEM 観察法は今後ミトコンドリアの形態維持機構やミトコンドリアダイナミクスに関わる形態研究の一助になるものだと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirashima S, Ohta K, Kanazawa T, Okayama S, Togo A, Miyazono Y, Kusakawa J, Nakamura KI	4. 巻 55
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural analysis and histomorphometry of collagen bundles in the periodontal ligament using focused ion beam/scanning electron microscope tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Periodontal Res.	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12592.	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 -

1. 著者名 Shingo Hirashima, Keisuke Ohta, Tomonoshin Kanazawa, Satoko Okayama, Akinobu Togo, Yoshihiro Miyazono, Jingo Kusakawa, Kei-ichiro Nakamura	4. 巻 なし
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural analysis and histomorphometry of collagen bundles in the periodontal ligament using focused ion beam/scanning electron microscope tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research.	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12592	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 -

1. 著者名 AKIHIRO KOBA, RYUICHIRO TANOUE, SHOGO KIKUTA, SHINGO HIRASHIMA, YOSHIHIRO MIYAZONO AND JINGO KUSUKAWA	4. 巻 64
2. 論文標題 The Usefulness of Piezoelectric Surgery in Sagittal Split Ramus Osteotomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kurume Medical Journal	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2739/kurumemedj.MS643002	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮園 佳宏, 上村 慶一郎, 太田 啓介, 中村 桂一郎, 楠川 仁悟.
2. 発表標題 FIB/SEM を用いたマウス精子核および余剰核膜発生過程の3D超微形態解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第74回学術講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村 慶一郎, 林 篤正, 都合 亜記暢, 平嶋 伸吾, 宮園 佳宏, 太田 啓介, 中村 桂一郎, 井川 掌.
2. 発表標題 マウス前立腺及びその周囲器官における神経内分泌細胞の分布と微細形態について.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第74回学術講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 啓介, 宮園 佳宏, 岡山 聡子, 中村 桂一郎.
2. 発表標題 ミトコンドリアの膜電位低下後に起こる形態変化過程の3D-CLEM観察.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第74回学術講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Miyazono, Keisuke Ohta, Akinobu Togo, Kei-Ichiro Nakamura.
2. 発表標題 New live imaging combined 3D-CLEM revealed a quick response of mitochondrial transformation from tubular to a globular form after loss of membrane potential.
3. 学会等名 19th International Microscopy Congress 2018.9. 9-9.14(Australia) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 啓介, 宮園 佳宏, 中村 桂一郎
2. 発表標題 脱共役後のミトコンドリア断片化は本当にミトコンドリアの分裂を伴うのか? 3次元光電子相関顕微鏡法による機能イメージング解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Top 100 in Cell and Molecular Biology  
<https://www.nature.com/collections/hdgffbgbjj/content/26-50>

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
---------	---------