

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860830

研究課題名(和文) 脂肪酸代謝異常症におけるミトコンドリア品質管理

研究課題名(英文) The organelle quality control in the fatty acid beta-oxidation disorder

研究代表者

森山 陽介 (MORIYAMA, Yohsuke)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：00452532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脂肪酸代謝異常症がもたらすミトコンドリアの品質低下の機序を明らかにし治療法の開発に寄与することを目的とし、ミトコンドリア呼吸鎖異常症と同様に脂肪酸代謝異常がミトコンドリアDNA量の維持の妨げとなると考えて研究を開始した。しかし糖源の枯渇による飢餓時においてもミトコンドリアDNAの顕著な減少は示されなかった。そこで連続スライスSEMを用いた超微細三次元構造観察に主眼を移し、ラット組織やヒト培養細胞で脂肪酸代謝における重要なオルガネラであるペルオキシソームの形態と分布、増殖様式について知見を得たほか、ミトコンドリア内膜(クリステ)の観察を行い、三次元化を行った。

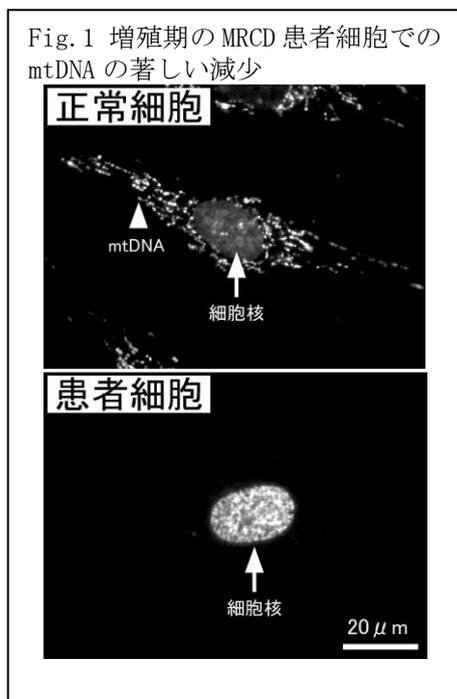
研究成果の概要(英文)：This study aimed to show how fatty acid β -oxidation disorder (FAOD) induce the mitochondrial damage, and tend to contribute the development of drugs or treatment for FAOD. Our previous data showed that the mitochondrial respiratory chain disorder causes rapid and transient reduction of mitochondrial DNA amount. However, the fibroblasts of FAOD patients did not showed distinguished reduction of mitochondrial DNA, even in the glucose depleted condition. Then we tried to observe the ultrafine three-dimensional structure of the peroxisome and mitochondria in the rat organ and human culture cell using serial slice SEM. They are key organelles for fatty acid oxidation. We observed the three-dimensional morphology, distribution and the mode of fission of the peroxisome, and the structure of mitochondrial inner membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪酸代謝異常症 ミトコンドリア ミトコンドリアDNA ペルオキシソーム 連続スライスSEM

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアのエネルギー産生の異常は、電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体の機能異常によるミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCO: mitochondrial respiratory chain disorder) と脂肪酸代謝異常症 (FAOD: mitochondrial fatty acid oxidation defect) とに大きく分けられる。研究代表者はこれまでに、次世代シーケンサーを用いた研究により複数の新規MRCO原因遺伝子の同定を行い、2016年に論文化している (神田・森山ら、論文(1))。同定されている複数のMRCOの原因遺伝子は呼吸鎖複合体のみならずミトコンドリアの分裂・融合、細胞内輸送、mtDNAの転写・複製・維持に関わる遺伝子、代謝産物のトランスポーターなど多岐にわたっている。研究代表者はこれらのMRCO患者由来の線維芽細胞の蛍光顕微鏡観察により、増殖期にmtDNAが大幅に減少することを見出している (Fig. 1)。



(2) FAODは脂肪酸代謝関連遺伝子が原因遺伝子群として知られており、ペルオキシソームまたはミトコンドリアで脂肪酸をβ酸化により代謝して呼吸鎖でのATP産生に利用することができない。FAODについては新生児を対象に代謝中間産物量の異常を指標にタンデムマススクリーニングが行われている。これは感染症などで経口で哺乳ができない際に脂肪酸をエネルギー源として利用できず、急性症状として乳児突然死症候群 (SIDS) などを引き起こすためである。患児は食餌療法等によ

る管理が行われているが有効な治療法はまだない。

2. 研究の目的

MRCOとFAODの2つの疾患は全く別の疾患と考えられていたが、近年SIDSにおいて呼吸鎖複合体活性が低下している例が報告された (Yamamoto *et al.* Mol. Genet. Metab 2012)。脂肪酸のβ酸化は長鎖の脂肪酸をペルオキシソーム→ミトコンドリアと順に代謝していくことで短鎖にする過程であり、結果として得られたアセチル-CoAなどを用いてミトコンドリアのクエン酸回路と電子伝達系を介して大量のATPが産生される。MRCOの上流としての脂肪酸代謝系の異常がmtDNAの減少を伴う呼吸鎖複合体の量的低下/活性低下やを招くことがあるのではないかと考え、FAODをMRCOの一種として捉え直すことを着想し、これまで見過ごされてきた脂肪酸代謝異常の発症機構を詳細に解析することを考えた。

3. 研究の方法

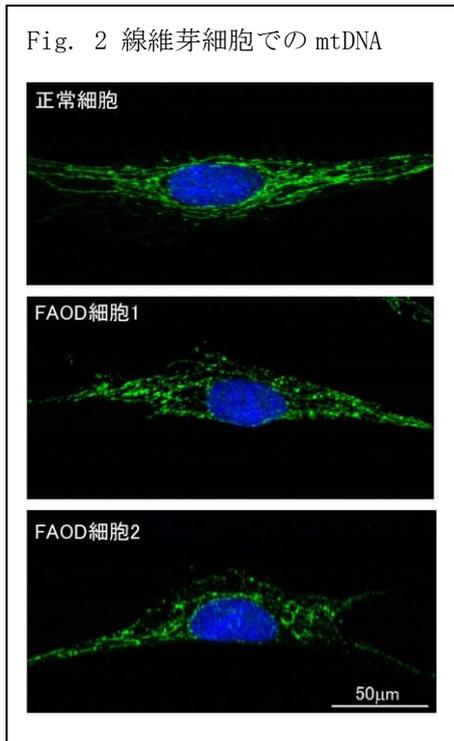
本研究では、FAODによりエネルギー需要に依存してmtDNA量、ミトコンドリア内タンパク質量が低下することを示し、ミトコンドリアの質的異常を時間依存的に蛍光が変化する蛍光タンパク質を用いて可視化する系を確立することを目指していた。しかしFAODにおいて糖源が枯渇した条件においてもmtDNAの顕著な減少が観られなかったため、脂肪酸代謝のキーとなるオルガネラであるペルオキシソームおよびミトコンドリアの形態について、比較的新しい電子顕微鏡による観察手法である連続スライスSEM (SBF-SEM、FIB-SEM) をもちいたnmスケールの解析を行い、今後の脂肪酸代謝異常症に関する研究の基盤を築いた。

具体的には以下の観察を行った。

- a) FAODにおけるmtDNAの生細胞イメージング
- b) カタラーゼ活性を利用したDABによる特異的な組織化学的染色法を用いたラット肝臓ペルオキシソームのSBF-SEM観察
- c) 同様の手法によるラット肝がん由来培養細胞のペルオキシソームのFIB-SEM観察
- d) FAOD患者細胞におけるミトコンドリア二重膜SBF-SEM観察

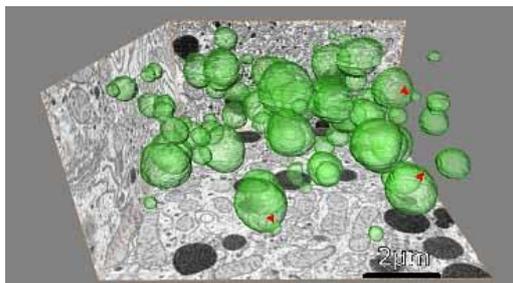
4. 研究成果

(1) 高感度な DNA 特異的蛍光色素 SYBR GreenI を用いて微量な mtDNA を可視化し、インキュベート装置を備えた共焦点顕微鏡 Zeiss 710 で FAOD 細胞のライブイメージングを7日間にわたって行った。このとき、培地のグルコース含量を様々に変えて観察を行ったが、グルコースが全くない糖源の枯渇状態でも期待していたような MRCD と同様の mtDNA 量の顕著な減少は観られなかった (Fig. 2)。



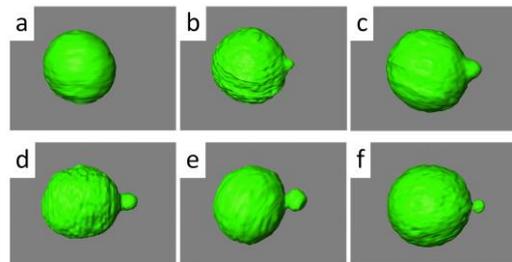
(2) ペルオキシソーム、ミトコンドリアの電子顕微鏡レベルの微細形態と脂肪酸代謝異常の関連についての知見は乏しいため、連続スライス SEM (SBF-SEM、FIB-SEM) を用いて観察を行うこととした。まずは脂肪酸代謝の初発オルガネラであるペルオキシソームについて、DAB によるカタラーゼの活性を利用した組織化学染色を行い、SBF-SEM で連続電顕像を取得し、ペルオキシソームについて三次元構築を行って nm スケールの微細形態および分裂様式についての知見を得た。

Fig. 3 ラット肝臓のペルオキシソームの FIB-SEM 観察と三次元構築



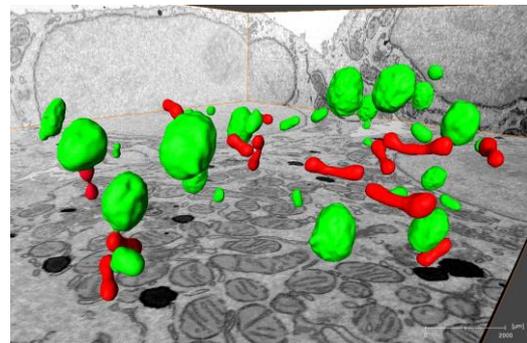
その結果、Fig. 3 に示すようにラット肝臓のペルオキシソームはほぼ球形であり、その直径は 0.15~1.4µm であることが示された。分裂に関しては Fig. 3 で赤矢印で示すように出芽様であり、Fig. 4 で示すように直径 0.1~0.2µm 程度の新たなマイクロペルオキシソームが分裂してできるということが明らかになった。このときの出芽・分裂中のペルオキシソームでも“母”ペルオキシソームの直径はほぼ 1µm であり、マイクロペルオキシソームが巨大化していき出芽できるようになるための閾値があると示唆された。

Fig. 4 ラット肝臓のペルオキシソームの分裂像



(3) 一方、ラット肝がん由来の培養細胞において、同様にペルオキシソームを染色し FIB-SEM で観察し三次元立体構築を行った。

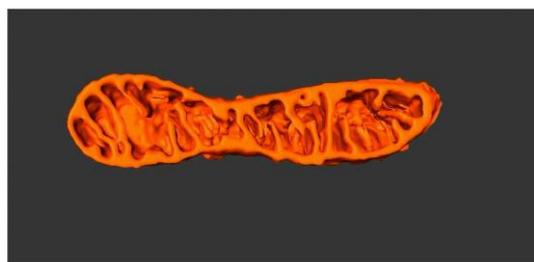
Fig. 5 肝がん由来培養細胞のペルオキシソームの分裂像



この培養細胞においては、Fig. 5 に示すようにほぼ球形~楕円形のペルオキシソーム (直径 0.3~0.8µm) の他、微小な球状~棒状の2種類のペルオキシソームがあった。分裂については微小ペルオキシソームでみられ、亜鈴状の形態をとる二分裂をおこなっていた (赤色)。

(4) ミトコンドリアについては特異的な染色は行わず、FAOD 患者由来の線維画細胞を用いて FIB-SEM 観察を行い、現在その二重膜について三次元構築を行っている過程にある。その一部を Fig. 6 に示す。

Fig.6 FAOD 細胞におけるミトコンドリア二重膜の FIB-SEM 観察



以上の結果について、まず

①「カタラーゼ活性を利用した DAB によるペルオキシソームの染色を SBF-SEM と組み合わせた観察により、肝臓細胞においては直径 15nm~1.4 μ m の球形のペルオキシソームが存在し、1 μ m 程度の直径のペルオキシソームからマイクロペルオキシソームが出芽して増えることが観察される」ことについて論文化を行っている。これを FAOD 患者由来細胞におけるペルオキシソームの nm スケールでの形態異常について今後解析する基盤とする。

②FAOD 患者由来細胞におけるミトコンドリア二重膜の微細構造については、糖源の枯渇状態でのクリステ（内膜）の構造変化に特に着目してデータを加え、論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

2016 年

(1) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. 他 30 人, 5 番目.

PLoS Genet. 12(1):e1005679, 2016. 査読有.
doi: 10.1371/journal.pgen.1005679

2014 年

(2) Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, 他 10 人, 7 番目.
The first case in Asia of

2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation.

J Hum Genet. 59, 609-14, 2014. 査読有.
doi: 10.1038/jhg.2014.79

(3) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: Exome sequencing for disease gene identification.

Biochim Biophys Acta. 1840, 1355-359. 2014. 査読有.
doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025.

(4) Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y 他 14 人, 7 番目.

New genetic MT-ND6 and NDUFAl mutations in Mitochondrial Respiratory Chain Disorders.

Ann Clin Transl Neurol. 1(5), 361-9, 2014. 査読有.
doi: 10.1002/acn3.59.

[学会発表] (計 7 件)

森山陽介、深澤元晶、新美元、白田信光
連続スライス SEM と組織化学的手法を用いた三次元超微構造観察技術によるペルオキシソーム分裂・増殖の解析
第 31 回医学生物学顕微鏡技術学会、2015 年 6 月 20 日、名古屋市立大学(愛知県名古屋市)

森山陽介、厚沢季美江、榎本早希子、荒井重
勇、臼田信光

超高压電子顕微鏡と連続スライス SEM による
細胞小器官の三次元超微構造解析の試み

第 71 回顕微鏡学会、2015 年 5 月 13 日、京都
国際会館（京都府京都市）

森山陽介、臼田信光、深澤元晶、宮崎直幸、
村田和義

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡
(SBF-SEM) を用いた三次元超微構造観察によ
るペルオキシソーム分裂・増殖の解析

第 120 回日本解剖学会全国学術集会、2015 年
3 月 21 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

森山陽介、宮崎直幸、村田和義、深澤元晶、
臼田信光

SBF-SEM Observation on Histochemically
Stained Specimens-Three Dimensional
Analyses of Peroxisomal Proliferations
IGER International Symposium on Frontiers
in Biological Research with Advanced
Electron Microscope Technologies, 2015 年
1 月 15 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

森山陽介、臼田信光、宮崎直幸、村田和義、
深澤元晶

組織化学的手法を応用した SBF-SEM によるペ
ルオキシゾーム分裂の三次元超微構造観察
生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージング
の医学・生物学への応用」、2014 年 11 月 13
日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡
崎市）

森山陽介、臼田信光、深澤元晶、宮崎直幸、
村田和義

SBF-SEM によるペルオキシゾーム増殖の電顕
組織化学的観察

第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集

会、2014 年 10 月 18 日、TKP 市ヶ谷カンファ
レンスセンター（東京）

森山陽介、臼田信光、厚沢季美江、宮崎直幸、
村田和義、深澤元晶

SBF-SEM を用いたペルオキシソーム増殖の三
次元超微構造観察

第 119 回日本解剖学会全国学術集会、2014 年
3 月 27 日、自治医大（栃木県下野市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 陽介 (MORIYAMA Yohsuke)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：00452532