

62. 拡散障壁と融合分裂がミトコンドリアの若返りにおよぼす影響の定量的解析

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 助教 吉井 紗織

概要

出芽酵母の非対称細胞分裂では、娘細胞においてミトコンドリア機能が高まる「ミトコンドリア若返り」現象が観察される。本研究では、この現象の基盤となる仕組みの解明を目的として解析を行った。従来、この現象は質の良いミトコンドリアが優先的に娘細胞へ分配されることで生じると考えられてきた。そこで、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を指標としたフローサイトメトリー解析系を確立し、培養条件およびミトコンドリアダイナミクス変異体を用いて若返り機構を解析した。その結果、ミトコンドリア若返りは呼吸依存的なグリセロール培地で顕著に観察され、グルコース培地ではほとんど検出されなかった。さらに、ミトコンドリア分裂欠損株では若返りが消失するどころかむしろ増強しており、分裂が若返りの前提となる従来モデルと一致しない結果が得られた。蛍光顕微鏡解析からは、連続したミトコンドリアネットワーク内で娘細胞側に高膜電位領域が形成されることが示唆された。また、ミトコンドリア拡散障壁がこの非対称性形成に関与する可能性も見出された。今後は、拡散障壁がどの分子種の母娘間分配を制御することでミトコンドリア若返りに寄与しているのか、その分子メカニズムの解明を目指す。本研究では、助成金により導入した Pixel illuminator がこれらの解析を可能にし、研究の推進に大きく寄与した。最後になりましたが、本研究の遂行にあたり貴財団よりご支援を賜りましたことに、厚く御礼申し上げます。

背景および目的

非対称細胞分裂では、タンパク質、核酸、オルガネラなどが二つの娘細胞に不均等に分配され、それぞれが異なる機能や細胞運命を獲得する。出芽酵母は非対称分裂を行うモデル生物であり、老化因子を蓄積して最終的に寿命を迎える母細胞と、ほぼ完全に若返った状態で生まれる娘細胞に分かれる。この過程において、娘細胞に分配されるミトコンドリアは母細胞と比較して膜電位 ($\Delta\Psi_m$) が高く、活性酸素種の産生が低いなど、機能的に若い状態にあることが知られており、「ミトコンドリアの若返り」と呼ばれる現象が観察される (1, 2)。このミトコンドリアの若返り現象においては、質の良いミトコンドリアと悪いミトコンドリアが選別され、それぞれ娘細胞と母細胞に分配されると考えられてきた。しかし実際には、多くのミトコンドリアは母細胞と娘細胞の間で連続した構造を形成し、さらに分裂と融合を繰り返しながら流動的なネットワークを構築している。このような連続した構造の中で、どのように機能的不均一性が形成され、維持されるのかは明らかになっていない。

最近我々は、ミトコンドリア上に母娘境界において拡散障壁が形成されることを報告した (3)。この拡散障壁は、一続きのミトコンドリア上で膜タンパク質の母娘間の拡散を顕著に抑制する。本研究では、ミトコンドリアの若返りを定量的に検出する解析系を確立し、ミトコンドリアの分裂・融合ダイナミクスおよびミトコンドリア拡散障壁がミトコンドリア若返りに与える影響を総合的に評価することを目的とした。

方法

ミトコンドリア機能の指標としてミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を測定するフローサイトメトリー解析系を構築した。膜電位は蛍光色素 DiOC₆ により測定し、ミトコンドリア量は外膜タンパク質 Tom70 に融合した mCherry 蛍光強度で補正した。また、細胞年齢を推定するため、培養前に細胞壁をビオチン化するとともに出芽痕を WGA で染色する方法を用い、若齢から高齢までの細胞群を分離して解析した。さらにミトコンドリア分裂因子 Fis1 や Dnm1、融合因子 Fzo1 の欠損株を用い、ミトコンドリアダイナミクスの変化がミトコンドリア若返りに与える影響を評価した。加えて蛍光顕微鏡を用い、娘細胞と母細胞の間で形成されるミトコンドリア拡散障壁の強度を、膜タンパク質が母娘境界をまたいで拡散する速度を指標として評価した。現在は、同一細胞において拡散障壁の強度とミトコンドリア膜電位の母娘間非対称性を直接比較する解析を進めている。この解析は、三菱財団からの寄付金により導入した Pixel illuminator により細胞内の特定領域を選択的に光操作できるようになったことで可能となった。

結果および考察

まず、ミトコンドリア若返りが顕著に観察される培養条件を解析した。出芽酵母は炭素源によりエネルギー代謝様式が大きく変化するため、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の母娘間非対称性に対する培養条件の影響を検討した。その結果、グリセロールやエタノールを炭素源とする呼吸依存的な培地では、娘細胞のミトコンドリア膜電位が母細胞より高く、ミトコンドリアの若返りが明確に観察された。一方、グルコースを炭素源とする培地では母娘間の膜電位差はほとんど検出されなかった。出芽酵母はグルコース培地では主に発酵によってエネルギーを獲得できるのに対し、グリセロールやエタノール培地ではミトコンドリア呼吸が必須となる。この結果は、本研究で観察されるミトコンドリア若返りが、呼吸機能を中心としたミトコンドリア機能の世代間分配を反映している可能性を示唆するものである。以降の解析では、ミトコンドリア若返りが最も明瞭に観察されたグリセロール培地を用いた。

従来、ミトコンドリア若返りは、品質の高いミトコンドリアが選択的に娘細胞へ分配されることで実現すると考えられてきた。このモデルでは、機能の異なるミトコンドリアが分離して存在し、それらが母娘間で不均等に分配されることが前提となっている。この仮説を検証するため、上記条件下でミトコンドリアダイナミクスの関与を解析した。野生型細胞では、娘細胞のミトコンドリア膜電位が母細胞より高く、ミトコンドリアが若返った状態で娘細胞へ分配されることが確認された。一方、ミトコンドリア分裂因子 Fis1 を欠損した細胞では、母細胞の膜電位が加齢とともに急速に低下する一方で、娘細胞では野生型よりもさらに高い膜電位が観察された。すなわち、ミトコンドリア分裂が起こらないにもかかわらず、ミトコンドリア若返りは失われるどころかむしろ増強していた。これは、機能の異なるミトコンドリアが分離して存在し、それらが選択的に分配されることで若返りが生じるとする従来の枠組みとは一致しない、予想外の結果であった。

蛍光顕微鏡解析の結果、ミトコンドリア分裂不全細胞では母細胞と娘細胞の間でミトコンドリアが連続したネットワークを形成したまま、娘細胞側に高い膜電位を示す領域が局在していることが観察された。すなわち、ミトコンドリア分裂による物理的分離がなくても、連続したミトコンドリアネットワーク内で機能的極性が形成されている可能性が示唆された。これらの結果は、ミトコンドリアが連続した構造を保ちながら機能的に異なる領域を形成し、それらが母細胞と娘細胞へ非対称に分配されることでミトコンドリア若返りが生じる可能性を示している。

さらに、ミトコンドリア拡散障壁に関与する因子を欠損した細胞ではミトコンドリアの若返りが弱まる可能性が示唆された。ミトコンドリア拡散障壁は、母娘境界においてミトコンドリア膜タンパク質の母娘間拡散を抑制する構造であり、ミトコンドリア膜上の分子の空間的分布を制御している可能性がある。このことから、ミトコンドリア若返りにおいては、ミトコンドリアネットワーク内で形成された機能的極性が拡散障壁によって維持されることで、母細胞と娘細胞への非対称分配が実現している可能性が考えられる。ただし、この現象についてはミトコンドリア分裂欠損株との二重変異解析や、ミトコンドリア以外の細胞機能への影響を排除する追加解析が必要である。

現在、蛍光顕微鏡を用いて、ミトコンドリア拡散障壁の強度（膜タンパク質が母娘境界をまたいで拡散する速度を指標とする）と、ミトコンドリア膜電位の母娘間非対称性を同一細胞内で定量比較する解析を進めている。この解析は、三菱財団からの助成により導入した Pixel illuminator によって細胞内の特定領域を選択的に光操作できるようになったことで可能となった。今後は、拡散障壁がどの分子種の母娘間分配を制御することでミトコンドリア若返りに寄与しているのか、その分子メカニズムの解明を目指す。

(完)

引用文献

- 1) J. D. Vevea, T. C. Swayne, I. R. Boldogh, L. A. Pon, Inheritance of the fittest mitochondria in yeast. *Trends in Cell Biology* 24, 53–60 (2014).
- 2) T. Klecker, B. Westermann, Asymmetric inheritance of mitochondria in yeast. *Biological Chemistry* 26;401(6-7): 779-791 (2020)
- 3) S. R. Yoshii, Y. Barral, Fission-independent compartmentalization of mitochondria during budding yeast cell division. *Journal of Cell Biology* 223(3):e202211048 (2024)