

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15550

研究課題名（和文）3次元光-電子相関顕微鏡法によるオートファゴソーム膜構造の形態学的解析

研究課題名（英文）3D-CLEM analysis of the membrane structure in autophagy

研究代表者

角田 宗一郎 (Kakuta, Soichiro)

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80551209

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）：オートファゴソーム膜形成の形態学的な理解を深めるために、三次元電子顕微鏡法による解析を行った。本研究課題では目的とする構造・部位を選択的に観察するために光-電子相関顕微鏡法（CLEM）を用い、その手法を確立することを第一の目的とした。目的とするオートファジー形成部位の標識に加えてミトコンドリアを蛍光標識し、蛍光像と電子顕微鏡像を画像解析ソフトで重ねることで正確な位置補正をする方法を開発することができた。正常細胞ではオートファゴソーム、オートリソソームが多く、ATG7 KO細胞では隔離膜が多く見られた。膜形成が起きないとされているATG9A KO細胞においても一部隔離膜様の構造が生じていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは様々な疾病への関与が盛んに報告されている細胞内機構である。顕微鏡を用いた形態学的な研究は初期から行われていたが、蛍光顕微鏡では微細形態までは捉えることが出来ず、一方で電子顕微鏡では立体的な情報を得ることが難しく、また形態だけでは目的の構造かどうか判断できないことも多い。本研究では蛍光顕微鏡像と「FIB/SEMによる3次元電子顕微鏡像」を組み合わせた解析を行うことでそれぞれの欠点を補うことが出来た。これによりオートファジー関連構造体の変化についての新しい知見が得られ、またこれを進めることによってオートファジー現象全体の理解へと繋がるのが期待出来る。

研究成果の概要（英文）：To better understand the morphology of autophagosome membrane formation, we performed a three-dimensional electron microscopy analysis. The primary objective of this research is to establish a method for selective observation of target structures and sites using light-electron correlative microscopy (CLEM). In addition to the labeling of the target of autophagy formation site, the mitochondria were fluorescently labeled. We developed the method for accurate positional correction by overlaying the fluorescence image with the electron microscope image using image analysis software. Normal cells showed autophagosomes and autolysosomes, and ATG7 KO cells showed more isolation membranes. Some isolation membrane-like structures were observed in ATG9A KO cells, where membrane formation is not supposed to occur.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 電子顕微鏡 形態学 共焦点レーザー顕微鏡 CLEM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

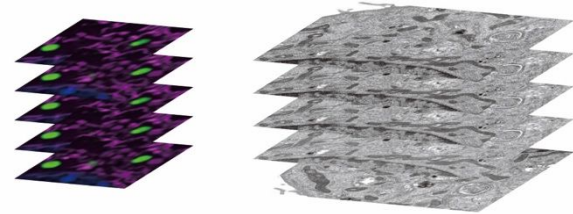
オートファジーは過剰なタンパク質や異常オルガネラなどの細胞質成分を二重膜構造「オートファゴソーム」の中に取り囲み、リソソーム酵素によって分解してリサイクルする現象である。オートファジーの分子生物学的研究は出芽酵母での関連遺伝子の発見に始まり、現在ではヒトにおける様々な生理的役割が報告されその重要性は高まっている。オートファジーにおける膜動態の解明はこの分野における中心的な課題の一つであり、蛍光顕微鏡による局在観察、共局在解析も行われているが、膜構造の有無やその形態、他の膜構造との関連性を知るためには電子顕微鏡により直接膜構造を観察することが必要となる。これまでも電子顕微鏡を用いた解析が行われているものの、従来の電子顕微鏡解析には限界があり、膜形成の中心的な機構には不明瞭な点が多かった。

2. 研究の目的

通常の電子顕微鏡解析では、1) 特に未知の構造については形態的特徴のみによる同定が困難である、2) 超薄切片の解析となるため三次元的な構造の理解が出来ない、といった制限があった。本研究ではこれらの障害を解消するために蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の長所を備えた「光-電子相関顕微鏡法 (CLEM)」による解析と、三次元解析用電子顕微鏡 FIB/SEM とを組み合わせることによって三次元 CLEM の手法を独自に確立することを目指した。またその技術によるオートファジーの膜動態の解明を目指した。

3. 研究の方法

蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を相関させる、観察位置を合わせるために内在性の基準としてミトコンドリアを用いた。オートファジー関連構造体の目印としてはオートファジーのターゲットである p62 を用いた。培養細胞に GFP-p62 を発現し、ミトコンドリアは MitoTracker により蛍光染色を行なった。この細胞を Zeiss LSM880 Airy scan を用いて高解像度の Z スタック撮影を行い、その後細胞を電子顕微鏡標本として包埋した。培養ディッシュ上のグリッドマークを基準にして目的の部位をマイクロームで切り出し、蛍光観察部位に相当する領域を FIB/SEM で連続断面撮影を行なった(図1)。得られた蛍光像、電子顕微鏡像は画像解析ソフト Amira を用いて重ね合わせ、目的とする構造を解析した。細胞はコントロールの MEF 細胞と、オートファジー関連遺伝子 ATG9A を欠損した細胞 (ATG9A KO 細胞) を用いた。

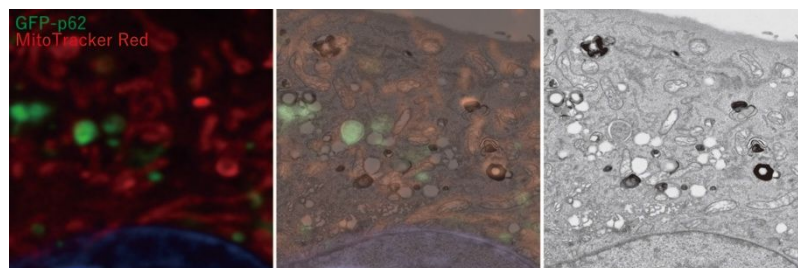


(図1) 蛍光 Z スタック像と FIB/SEM 連続断面像との相関顕微鏡解析

4. 研究成果

高解像度の撮影によりミトコンドリアの蛍光像と電子顕微鏡像を重ね合わせて三次元的な正確な位置合わせをすることに成功した。これによりランドマークであるミトコンドリアとの位置関係から、目的のタンパク質 (今回の場合 GFP-p62) と対応する超微形態を電子顕微鏡で観察することが可能になった。(図2)。

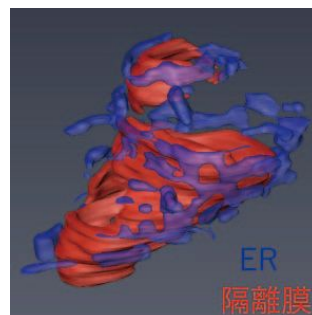
(図2)



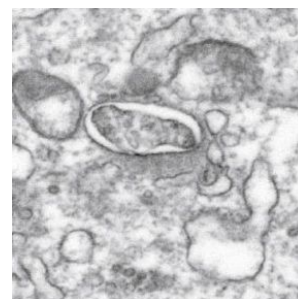
コントロールの細胞では GFP-p62 の近傍に主にオートファゴソームが見られたが、ATG9A KO 細胞ではオートファゴソームは殆ど見られなかった。一方で ATG9A KO 細胞では GFP-p62 に隣接して断片的な隔離膜や粗面小胞体が見られた(図3)。ATG9A はオートファゴソーム膜形成に必須と考えられており、オートファゴソームが観察されないことはその知見を裏付けたが、他方ある程度の膜形成は一定頻度で生じることが明らかとなった。また膜がない部分の p62 にも小胞体が近接していることから、ATG9A は小胞体からオートファゴソーム膜が形成される際に機能しており、KO 細胞ではそのステップが阻害されることで膜形成がそこでスタックしていることが示唆された。

前述の結果は GFP-p62 を過剰発現した細胞で行なっていたため、その影響で本来の構造とは異なるものを見ている可能性があった。そこで次に内在性の p62 の解析を行なった。ここでは p62 の抗体染色を行なったが、通常の抗体染色手法では膜構造が壊れて不明瞭となるため、固定の条件を改良してなるべく構造を保ったまま抗体染色ができる条件を見つけ出すことができた。その結果、ATG9AKO 細胞の内在性の p62 の周囲においても不完全な膜構造が形成されることが確認できた(図4)。

またこの解析の途中で、ATG9A KO 細胞で蓄積する p62 の周囲で、オートファジー初期因子の一つ FIP200 がドット上の構造として存在することを見出した。これは同じ初期因子で複合体を形成しているはずの ULK1 では見られないことから、FIP200 独自の局在化に ATG9A が関与する可能性がある。この構造が何を意味するのかは現時点では不明で、現在も解析を進めている。



(図3)



(図4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Junji, Suzuki Chigure, Nanao Tomohisa, Kakuta Soichirou, Ozawa Kentarou, Tanida Isei, Saitoh Tatsuya, Sunabori Takehiko, Komatsu Masaaki, Tanaka Keiji, Aoki Shigeki, Sakimura Kenji, Uchiyama Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Atg9a deficiency causes axon-specific lesions including neuronal circuit dysgenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 764 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1314897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuya Norihiko, Kakuta Soichiro, Sumiyoshi Katsuhiko, Ando Maya, Nonaka Risa, Suzuki Ayami, Kazuno Saiko, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 19
2. 論文標題 NDP52 interacts with mitochondrial RNA poly(A) polymerase to promote mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e46363 ~ e46363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimura Koichiro, Miyaki Takayuki, Kawasaki Yuto, Kinoshita Mui, Kakuta Soichiro, Sakai Tatsuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Morphological Processes of Foot Process Effacement in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis Revealed by FIB/SEM Tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 96 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018020139	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 Kakuta S, Yamaguchi J, Suzuki C, Sasaki M, Kazuno S, Uchiyama Y.	4. 巻 31(9)
2. 論文標題 Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 3757~3773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201601052R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sou Yu-shin, Kakuta Soichiro, Kamikubo Yuji, Niisato Kazue, Sakurai Takashi, Parajuli Laxmi Kumar, Tanida Isei, Saito Hiromitsu, Suzuki Noboru, Sakimura Kenji, Maeda Yusuke, Kinoshita Taroh, Uchiyama Yasuo, Koike Masato	4. 巻 6
2. 論文標題 Cerebellar Neurodegeneration and Neuronal Circuit Remodeling in Golgi pH Regulator-Deficient Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0427-18.2019	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 Ichimura Koichiro, Miyaki Takayuki, Kawasaki Yuto, Kinoshita Mui, Kakuta Soichiro, Sakai Tatsuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Morphological Processes of Foot Process Effacement in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis Revealed by FIB/SEM Tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 96 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018020139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 角田 宗一郎、オリバ トレハンドロ、鈴木 ちぐれ、内山 安男
2. 発表標題 FIB/SEMを用いた三次元光-電子相関顕微鏡解析によるオートファゴソーム関連構造体の解析
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

1. 発表者名 角田 宗一郎、鈴木 ちぐれ、オリバ アレハンドロ、内山 安男
2. 発表標題 Three-dimensional correlative light and electron microscopy analysis of autophagy-related structures
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会 (2018年3月、東京都武蔵野市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田 宗一郎、鈴木 ちぐれ、オリバ アレハンドロ、内山 安男
2. 発表標題 三次元光-電子相関顕微鏡法によるオートファゴソーム関連構造体の解析
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学・研究業績詳細 https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/achievement.php?MID=4852 https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/achievement.php?MID=4852</p>

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