

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570069

研究課題名（和文）オートファジーにおいて新規に同定された膜構造体の超微形態解析

研究課題名（英文）Ultrastructural analysis of newly indentified membrane structure in autophagy

研究代表者

馬場 美鈴（BABA MISUZU）

工学院大学・総合研究所・研究員

研究者番号：80435528

研究成果の概要（和文）：オートファジーは、自己の構成成分を分解し、分解産物をリサイクルして利用する細胞内分解系の一つである。酵母細胞において、オートファジーが欠損した変異株が遺伝学的解析によって取得された。オートファジーが誘導されると、分解する過程で新たな膜構造体が形成される。この膜構造体がどうやって形成されるかを調べるために、酵母の変異株の細胞内形態を電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、形成初期の膜構造体を見つけた。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is one of the intracellular degradative process. In this process, cells sequester their own cytoplasmic components into a novel double-membrane structure which is newly formed in cytoplasm, and then transport it into the lytic compartment for the reuse. Autophagy defective yeast mutants were isolated by genetic screening. To investigate how these membrane structures are generated during autophagy, I observed intracellular structure of autophagy defective mutants by using an electron microscope. As a result, I found the initial stage of this membrane structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：免疫電子顕微鏡・電子線トモグラフィ・オートファジー・タンパク質分解、酵母細胞・微細構造

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、ほとんどの真核細胞において自己の細胞質構成成分をリソソーム（動物細胞）・液胞（酵母細胞）に取り込んで分解する大規模な、あるいは選択的な蛋白分解機構である。その細胞内での膜動態は、酵母細胞と動物細胞で類似しており、最も重

要な過程は、オートファゴソームと呼ばれる新たな二重膜構造体が形成される素過程である。この膜形成時に分解すべき細胞内成分を、確実に二重膜構造体の中へ囲い込む。酵母の系におけるオートファジーの膜動態は、研究代表者により急速凍結置換固定法を用いた電子顕微鏡法を多角的に駆使して証

明された。膜動態研究の基盤が築かれた。

オートファジーに関わる必須遺伝子 (*ATG*) が同定され、その遺伝子群は機能的にグループ化された。これらの遺伝子群のほとんどがオートファゴソームの二重膜構造の形成過程に関与することが、分子レベルでの解析により進みつつあるが、まだ十分な解釈には至っていない。特に膜形成の極めて初期の過程において、ファゴフォアと呼ばれる膜が形成されるが、その形成機序、脂質とたんぱく質の挙動、この膜がどこからくるのかその由来など、現時点でも生物学的に解明されるべき課題は多い。

2. 研究の目的

オートファジーは、神経変性疾患、自然免疫、細胞内浄化作用など多くの病態及び生理機能の維持になど関与するという知見が急速に展開してきた。オートファジーの基本的な膜動態の解明が進むことは、哺乳動物細胞における、代謝機能の解明、疾患の解明、新規創薬への進展などに直結する問題である。

本研究では、膜の由来が問題となっているオートファゴソーム形成初期過程についての理解を進めるために、オートファジー不能変異株について、細胞内膜構造を超微細形態レベルで詳細に観察し、変異株に特有な構造体およびその周辺の構造体の立体的関係を把握し、そこで機能する蛋白質の局在を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母細胞と動物細胞では、オートファゴソーム形成の膜動態は類似しているため、形態学的手法を選択するにあたり、細胞内膜系が比較的単純な酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* の系を用いた。

(2) オートファジー必須遺伝子 (*ATG*) の多くが、オートファゴソーム構造体の形成に関与している。その中で *Atg8* はオートファゴソーム形成の過程において、二重膜上に検出されるタンパク質で、膜脂質 (ホスファチジルエターノールアミン) 結合型になる。このことによりオートファゴソーム形成時のマーカーとして、動物細胞 (*Atg8* のホモログは *LC3*) においても、酵母細胞においても広く使用されている。オートファジー不能変異株の中から、生化学的解析において、オートファゴソーム膜のマーカーとなる *Atg8* が膜脂質結合型になる変異株を複数個選択し、細胞内構造の詳細な解析を行った。

(3) オートファゴソーム膜形成部位のマーカーとして、免疫染色なしで局在を同定で

きるミノペプチダーゼ I を利用した。この酵素は液胞内加水分解酵素であるが、細胞質において前駆体として合成され、特異的な小胞構造に含まれた後に、液胞へ輸送される。栄養飢餓が誘導されたときには、細胞質からオートファゴソームに選択的に取り込まれ、最終的に液胞内へ輸送されて活性型となる。電子顕微鏡レベルにおいて、形態学的に非常に検出しやすい特異的な形態をしている。

(4) オートファゴソーム膜形成の初期過程に重要な役割を果たす *Atg9* の細胞内の形態解析を行った。

(5) 形態解析は電子顕微鏡を用いて行い、試料作製方法には、急速凍結置換固定法、加圧凍結置換固定法、免疫電子顕微鏡法、3次元再構成法および3次元トモグラフィ法を用いた。

(6) 窒素源の栄養飢餓によって、オートファジーを誘導した。

(7) *Atg8* 蛋白質の検出には、*Atg8-PE* 型 (膜脂質結合型) を認識する抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) オートファゴソーム膜のマーカーとなる *Atg8* が生化学的に膜脂質型として検出される変異株は、オートファゴソーム膜形成部位のマーカーであるアミノペプチダーゼ I の周囲に、小さな膜様構造体が検出される変異株と膜構造体が顕著に認識されない株の二つのグループに形態学的に分けられた。

(2) 膜構造体が顕著に認識されない変異株においても、オートファゴソーム形成部位であるアミノペプチダーゼ I の周囲に検出された *Atg8* は膜脂質結合型として形態的に同定された。生化学的解析においても *Atg8* は膜脂質結合型を示唆しているにもかかわらず、膜として認識される構造体は確認されなかった。膜蛋白として同定された *ATG9* はコピー数を適度に増加させることで初めて形態学的に検出可能となる。そこで、この変異株に膜蛋白質である *ATG9* のコピー数を適度に増幅させて観察した結果、オートファゴソーム形成部位であるアミノペプチダーゼ I の周囲に膜様構造体が出現し、*Atg9* はその膜上に検出された。しかし、まだ断定的ではないが *Atg8* の反応は膜上には検出されなかった。*Atg9* が検出される構造体は、小さなチューブルのような膜断片で、アミノペプチダーゼ I を取り囲むように存在していた。結果として、この変異株では、膜の伸長に関与する *Atg8* と膜蛋白である *Atg9* の反応は共存し

て検出されなかった。

(3) 上記の変異株を除いて、生化学的に Atg8 が膜脂質結合型となる変異株は数個存在する。これらの変異株について形態観察した結果、いずれもアミノペプチダーゼ I 周辺に、非常に興味深い、小さな膜構造体を見つけた。これらの構造体は、すべて Atg8 の抗体で認識された。すなわち、膜脂質結合型である。その詳細な形態を把握するために、電子顕微鏡において連続傾斜画像を取得し、3次元再構成法を用いて、立体構造解析を行った。3次元トモグラフィによる画像解析では、これらの膜構造体は閉じた袋状の形態を示すことが証明された。

これらの変異株の蛋白質はいずれも、膜の形成初期過程で機能していることが、生化学的および分子レベルでの解析により示されている。従って、その変異株に見出された小さな膜構造体は、蛋白質の欠損により伸長することができない、すなわちオートファゴソーム形成初期に位置する中間体構造であると解釈している。

(4) これらの解析の過程において、Atg9 が膜形成の最初の過程に必須であり、リザーバーと呼ばれる部位に存在し、そこからオートファゴソーム形成部位に運ばれるということが示唆されているが、その初期に SNARE 複合体の一つである、Sso1 が関与することを証明することに寄与した。

(5) 酵母細胞のオートファジー不能変異株において、この様な膜構造体は報告されておらず、膜形成の初期過程を示唆する初めて形態的に示された構造体である。

(6) この構造体に関して、生化学的分野や脂質解析分野などに解析方法を広げていくことで、膜の問題に関わる理解が進むと予測される。

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6件)

- ① Nair U, Jotwani A, Geng J, Gammoh N, Richerson D, Yen WL, Griffith J, Nag S, Wang K, Moss T, Baba M, McNew JA, Jiang X, Reggiori F, Melia J, Klionsky DJ, SNARE proteins are required for macroautophagy, *Cell* 査読有 Vol. 146, 2011, pp.290-302, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.022>

- ② Esklinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovacs AL, Seglen PO, The impact of electron microscopy on autophagy research *Autophagy*, 査読有 Vol.7, pp2011, 1-22, <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.9.15760>
- ③ Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, BaBa M, Klionsky DJ, The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *Journal of Cell Biology* 査読有 Vol. 11, 2010, pp.101~114, doi: [10.1083/jcb.200904075](https://doi.org/10.1083/jcb.200904075)
- ④ He C, Baba M, Klionsky DJ, Double duty of Atg9 self-association in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 査読有 Vol. 5, 2009, pp385-387, <http://dx.doi.org/10.4161/auto.5.3.7699>
- ⑤ Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ, Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental Cell* 査読有 Vol. 17, 2009, pp.98~109, doi: [10.1016/j.devcel.2009.06.014](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.014)
- ⑥ Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ, A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Molecular Biological of the Cell* 査読有 Vol. 20, 2009, pp.4730~4738, doi: [10.1091/mbc.E09-03-0225](https://doi.org/10.1091/mbc.E09-03-0225)

[学会発表] (計4件)

- ① 馬場美鈴 選択的オートファジーの基質認識機構の形態学的解析, 第65回日本顕微鏡学会、2009年5月28日、仙台国際センター
- ② 馬場美鈴, Jiefei J., Usha N. 馬場則男 Klionsky, D.J. 液胞輸送に関与するレセプター蛋白質の挙動の免疫電顕による解析, 第65回日本顕微鏡学会、2009年5月29日、仙台国際センター
- ③ 唐崎 斎, 馬場美鈴, 馬場則男 構成画像成分分析に基づく目的像露出法, 第65回日本顕微鏡学会、2009年5月29日、仙台国際センター
- ④ 笹島洋輔, 小林博之, 馬場美鈴, 馬場則男 3D 電子線トモグラフィにおける濃度分布特徴に基づく細胞内構造体の抽出法 第67回日本顕微鏡学会学術講演会, 2011年5月16日, 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 美鈴 (BABA MISUZU)
工学院大学・総合研究所・研究員
研究者番号：80435528

(3) 連携研究者

馬場 則男 (BABA NORIO)
工学院大学・情報工学部・教授
研究者番号：80164896