

## 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 5月20日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659045

研究課題名（和文）オートファジー現象における隔離膜形成・伸張機構の微細構造解析

研究課題名（英文）Morphological analyses on the biogenesis and extension mechanisms of autophagic isolation membrane

研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

研究成果の概要（和文）：マウス線維芽細胞におけるオートファジー隔離膜の形成過程について、電子顕微鏡用の新たな固定法を用いて詳細に解析した。アミノ酸飢餓によりオートファジーを誘導した結果、粗面小胞体膜と隔離膜の間に存在する、極細管からなるクラスター構造を見出し、それが光学顕微鏡レベルで同定されているオメガソームに相当することを明らかにした。この知見により、隔離膜形成に伴う新たな膜動態およびその基盤となる分子機構の研究を促進することができる。

研究成果の概要（英文）：Fine structures of autophagic isolation membrane induced by amino acid deprivation in mouse embryonic fibroblasts were investigated. By using newly developed fixation protocol, we found a cluster of narrow tubular structures between the endoplasmic reticulum and isolation membranes. Moreover, they corresponded to “omegasome” that has been identified only at light microscopic levels. These findings could promote research of membrane dynamics and associated molecular mechanisms in the biogenesis of autophagic isolation membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	0	900,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞微細形態学、オートファジー、Atg 遺伝子、線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジー（自食作用；self-eating）は古くから栄養飢餓の危機対応機構と捉えられていた。すなわち、アミノ酸等が枯渇すると細胞質の一部が隔離膜で非選択的に囲まれ（オートファゴソーム）、これがリソソームと融合することにより内容物を低分子（ア

ミノ酸等）まで分解し、再利用する。近年、Atg (autophagy-related) タンパク質の機能解析が進んだことでこの分野の進展は著しい。しかし40年来「オートファジーの謎」として色褪せない疑問がある。それが「隔離膜の由来はどこか？」である。

ごく最近、Axeら (*J. Cell Biol.*, 2008) は粗面小胞体近傍に phosphatidylinositol

3-phosphate (PI3P) が集積するリング状領域が形成され、ここからオートファゴソーム隔離膜が形成されると報告した。そして、このリング構造を「オメガソーム」と命名した。しかし、その電子顕微鏡レベルの構造基盤は明らかとなっていない。

本研究代表者は様々な組織・細胞におけるオートファジー現象を電子顕微鏡により観察してきた (Komatsu and Waguri et al., *J Cell Biol*, 2005; *Nature*, 2006; *Cell*, 2007; Sou and Waguri et al., *Mol Biol Cell*, 2008)。そこで常に悩んできた問題が、固定によるアーティファクトの存在とそれによる隔離膜追跡の困難さである。しかし最近、脂質膜固定に優れるオスミウム酸を初期の固定液に混合することにより、極めて明瞭なオートファゴソーム隔離膜およびその周囲に存在する多数の小管小胞構造を見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究では通常の初期固定液としてはほとんど使用されていないオスミウム酸混合固定液を応用し、電子顕微鏡レベルにおける隔離膜の由来構造物を同定し、同分野でのブレイクスルーを目指す。そのため、目的を以下の項目に細分化して進める。

- (1) 野生型および *Atg3* 欠損マウス線維芽細胞 (MEF) における、隔離膜、小胞体、隔離膜近傍の小管小胞構造の位置関係、および蓄積の程度を光学顕微鏡により明らかにする。
- (2) GFP-DFCP1 を用いて野生型および *Atg3* 欠損 MEF におけるオメガソームの動態を明らかにする。
- (3) *Atg3* 欠損 MEF で誘導されたオメガソームの微細構造を免疫電子顕微鏡解析により明らかにする。
- (4) オスミウム初期固定液による固定法を確立し、野生型および *Atg3* 欠損 MEF で観察される隔離膜構造の微細構造を明らかにする。
- (5) 同様に、電子線トモグラフィーを用いて立体的な位置関係を明確にする。
- (6) *Atg3* 欠損 MEF だけでなく、*Atg5*、*Atg7*、*Atg16L*、*FIP200* 欠損 MEF において隔離膜近傍の小管小胞構造が誘導されるかどうかを明らかにする。
- (7) MEF だけでなく、他の培養細胞系でも隔離膜近傍の小管小胞構造が観察されるかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 各種 *Atg* 関連遺伝子を欠損した MEF におけるオメガソームの解析  
野生型および *Atg3*、*Atg5*、*Atg7*、*Atg16L* 欠損

MEF に GFP-DFCP1 (double FYVE domain-containing protein 1) を安定に遺伝子導入し、その発現をドキシサイクリンにより誘導可能な系を作製した。飢餓誘導を行い、4%パラホルムアルデヒド/PBS にて固定後、抗 *Atg16L* で免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いてオメガソームを示す GFP シグナルと隔離膜を示す *Atg16L* シグナルの数と共局在の程度を定量した。

### (2) 免疫電顕による GFP-DFCP1 の分布解析

GFP-DFCP1 を発現させた *Atg16L* 欠損 MEF を飢餓誘導し、4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒド/PB 固定液で固定した。1.84 M ショ糖-20% polyvinylpyrrolidone 溶液に浸漬し氷晶防止した後、凍結し、凍結超薄切片を作製した。抗 GFP 抗体を反応させ、これを 12 nm 金コロイド標識した抗ウサギ抗体で検出した。透過型電子顕微鏡 JEM1200EX (JEOL) で観察した。陽性所見を示す隔離膜を 30 個程度探索、画像取得し、シグナルの分布状態を定量した。

### (3) 透過型電子顕微鏡解析

野生型および *Atg3*、*Atg5*、*Atg7*、*Atg16L* を欠損したマウス胎児由来の MEF、および ARPE 細胞、HeLa 細胞、Huh1 細胞、NRK 細胞を Hanks 液にて 2 時間培養し、アミノ酸飢餓によるオートファジー誘導実験を行った。オスミウムを含む初期固定液で固定後、エポキシ樹脂に包埋し、マイクロトームにて連続超薄切片を作製した。隔離膜構造を探索し、その前後切片の同一部位を撮影し、粗面小胞体、小胞、小管構造の位置関係を詳細に解析した。

電子線トモグラフィーは 200nm の切片を JEM1400 電子顕微鏡 (JEOL) でマイナス 60 度からプラス 60 度まで 1 度ずつ傾斜させながら 120 枚の連続画像情報を取得し、専用ソフトウェア (TEMography, システムインフロンティア社) を用いて 3 次元立体構築、及び解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *Atg3* 欠損 MEF における DFCP1 の動態解析

GFP-DFCP1 を安定に発現した野生型および *Atg3* 欠損 MEF を作製した。この細胞を飢餓誘導すると、野生型 MEF では細胞質に DFCP1 陽性顆粒が増加したが、*Atg3* 欠損 MEF では栄養条件下において既に多くの DFCP1 陽性顆粒が蓄積した (図 1)。また、*Atg16L* に対する抗体で免疫染色したところ、DFCP1 陽性シグナルは点状あるいはリング状を呈し、それら多くは *Atg16L* 陽性シグナルと部分的に一致していた (図 2)。

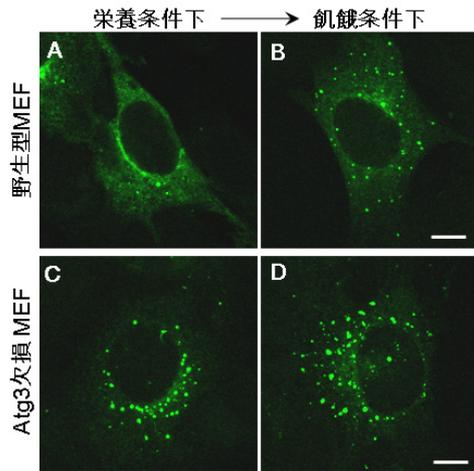


図1 GFP-DFCP1を発現する野生型 (A, B) およびAtg3欠損 (C, D) MEFを栄養条件下 (A, C) あるいはハンクス液 (飢餓条件下; B, D) で2時間培養した。固定後、共焦点レーザー顕微鏡でGFPシグナルを検出した。Bar, 10  $\mu$ m

GFP-DFCP1およびAtg16L陽性シグナル数を定量したところ (図3)、野生型MEFにおいてGFP-DFCP1陽性シグナルは飢餓誘導により有意に増加し、栄養条件下においてAtg3欠損MEFよりも多かった。また、Atg3欠損MEFにおいても飢餓誘導により増加した。興味深いことにGFP-DFCP1陽性シグナル中Atg16L共陽性となるもの (図3グラフ中の黄色バー) は野生型MEFの飢餓誘導時が約40%であるのに対し、Atg3欠損MEFでは約80%と増加していた。

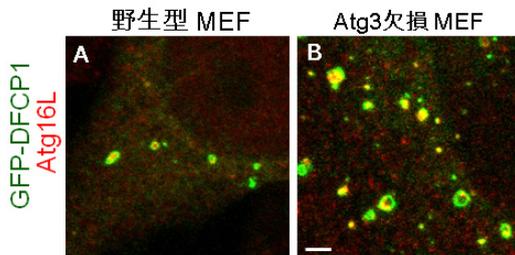


図2 GFP-DFCP1 (緑) を発現する野生型 (A) およびAtg3欠損 (B) MEFをハンクス液 (飢餓条件下; B, D) で2時間培養した。固定後、抗Atg16L抗体 (赤) を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。Bar, 2  $\mu$ m

以上の結果から、①Atg3欠損MEFではオートファジー隔離膜がのみならず、オメガソーム構造も蓄積すること、②それら多くは隔離膜とハイブリッド構造を形成していること、が示された。おそらくAtg3欠損によりオメガソームから隔離膜への移行過程が遅延していることを示唆していると考えられる。

一方、DFCP1の動態を調べるためにGFP-DFCP1を高発現するAtg3欠損線維芽細胞を用いてライブセルイメージング解析を行った。その結果、過去の報告にあるようなリング構造から隔離膜が形成される過程だけでなく、GFP-DFCP1の輝点から小管状構造が伸び縮み

するなど極めて動的な動きをしつつ隔離膜形成に関与していることを見出した。

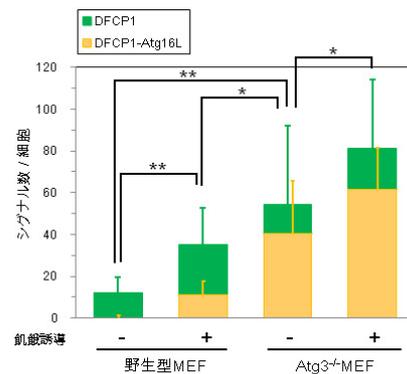


図3 細胞当たりのGFP-DFCP1陽性顆粒数 (緑) およびGFP-DFCP1 / Atg16L共陽性顆粒数 (黄)。GFP-DFCP1を発現する野生型 およびAtg3欠損 MEFをハンクス液 (飢餓誘導) で2時間培養した。固定後、抗Atg16L抗体 (赤) を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察し陽性シグナルを数えた。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

## (2) DFCP1の微細局在解析

上述のようにAtg3欠損MEFではオメガソーム/隔離膜ハイブリッド構造が蓄積しているため、電顕切片における同構造の検出頻度が増し、免疫電顕法に適していると考えた。そこでGFP-DFCP1陽性シグナルを電子顕微鏡レベルで解析した。抗GFP抗体を用いて免疫電顕法を行ったところ、隔離膜近傍の小管小胞状構造にシグナルの集積が認められた (図4)。

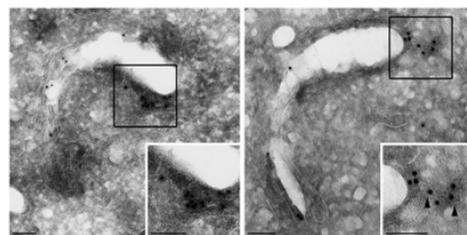


図4 GFP-DFCP1を発現するAtg3欠損MEFをハンクス液にて2時間培養した。細胞を固定、凍結超薄切片を製作し、抗GFP抗体と金コロイド (12 nm) 標識 2次抗体を用いて免疫染色した。矢頭は隔離膜近傍の小管小胞構造を示す。Bar, 100 nm

総金コロイド数のうち、約2/3が同小管小胞状構造にあり、残りは隔離膜と小胞体存在していた。この結果は、隔離膜近傍の小管小胞構造が光学顕微鏡で観察されるGFP-DFCP1陽性のオメガソームであることを強く示唆する。

## (3) 小管小胞構造の純形態学的解析

これまで、このような小管小胞構造は電子顕微鏡レベルで観察されことはないため、本研究により新たに開発したオスミウムを含む初期固定液で細胞を固定した。その結果、野

野生型およびAtg3欠損MEFにおいて、隔離膜近傍に多数の小管小胞からなる構造が認められた(図5)。



図5 Atg3欠損MEFをハンクス液にて2時間培養した。細胞をオスミウム含有初期固定液で固定し、電子顕微鏡で観察した。Bar, 500 nm

野生型とAtg3欠損MEFを比較したところ、Atg3欠損MEFでは、同一部位に2つ以上の隔離膜構造が存在する機会が多いことが特徴であったが、小管小胞構造のプロファイル数に有意な差は認められなかった。

さらに、全体像を把握するために連続切片を作製したところ、それら構造の一部は粗面小胞体、あるいは隔離膜と連続していた(図6)。

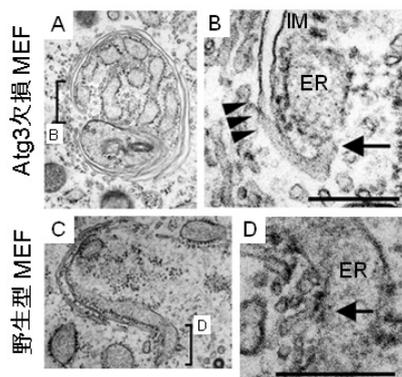


図6 Atg3欠損(A, B)および野生型(C, D) MEFをハンクス液にて2時間培養した。細胞をオスミウム含有初期固定液で固定、包埋し、電子顕微鏡で観察した。連続切片標本の一部を示す。BとDは、それぞれAとCの一部を拡大したものである。矢印は小胞体(ER)から延びる小管構造、矢頭は隔離膜(IM)との連続部分を示す。Bar, 200 nm

また、これら小管小管構造の存在について、Atg5, Atg7, Atg16L, FIP200欠損線維芽細胞についても解析を行った。その結果、Atg5, 7, 16L欠損細胞では隔離膜構造の誘導と同小管小管構造が認められたが、FIP200欠損線維芽細胞では認められなかった。このことは隔離膜および小管小管構造の形成はAtg結合反応に依存せず、より上流のシグナル因子群に依存することを示唆する。

さらに、これら小管小管状構造は、ヒト網膜色素上皮由来のARPE細胞、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト肝細胞癌由来Huh1細胞およ

びラット腎臓由来NRK細胞においても存在が確認された。よってマウス線維芽細胞のみの現象ではなく、多くの細胞株で普遍的に起きている現象であることが示唆された。

#### (4) 電子線トモグラフィー解析

小管小胞構造に関して、3次元空間における構造を理解するために電子線トモグラフィー解析を行った。その結果、小胞構造の多くは実際は小管の断面であることが示唆された(図7)。さらに同方法によっても、隔離膜近傍の小管構造が隔離膜および小胞体に連続していることが分かった。

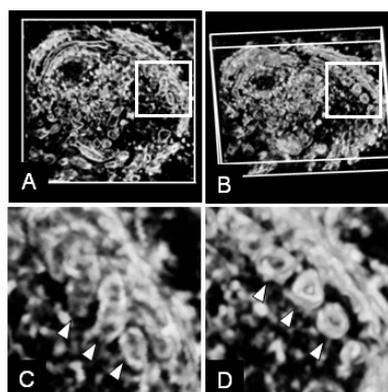


図7 Atg3欠損MEFをハンクス液にて2時間培養した後、固定、包埋し、200nmの切片を作製した。隔離膜構造の一つについて、電子線トモグラフィー法を用いた3D立体構築像を示す。AとBは同一構造を異なる方向から見た像であり、それぞれの四角領域をCおよびDに示す。Dで見られる小胞構造(矢頭)は、Cの方向から見ると小管構造(矢頭)であることが分かる。

#### (5) 結論と今後の取り組み

本研究では野生型およびAtg3欠損MEFを用い、隔離膜近傍に存在する小管小胞状構造に関して形態学的解析を展開した。この小管小胞構造は光学顕微鏡で観察されるGFP-DFCPI陽性のオメガソームに相当すること、実際は小管から形成されること、その一部は隔離膜および小胞体と連続していることが明らかとなった。このことは、アミノ酸飢餓によるオートファジー誘導現象では、小管構造が隔離膜形成の前駆体となることを強く示唆する。同知見は隔離膜形成のより初期段階における膜動態を解析する上で有用である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Andoh J, Iwadate M, Yamamoto M, Myung-Shik Lee MS, Tanaka K, Komatsu M. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular

carcinoma cells. *J Cell Biol.* 193: 275-284(2011) 査読有

②Takamura T, Komatsu M, Hara H, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25: 795-800 (2011) 査読有

③Itoh, T, Kanno, E, Uemura, T, Waguri, S, Fukuda, M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol.* 192: 839-853(2011) 査読有

④Tanaka S, Sakamoto K, Yamamoto M, Mizuno A, Ono T, Waguri S, Kimura J. Mechanism of statin-induced contractile dysfunction in rat cultured skeletal myofibers. *J Pharmacol Sci* 114: 454-463(2010) 査読有

⑤Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 12: 213-223 (2010) 査読有

[学会発表] (計5件)

①山田茜、亀高愛、山本雅哉、曾友深、小松雅明、和栗聡。Atg3欠損マウス線維芽細胞株で見られたオートファゴソーム様構造の形態学的解析、第115回日本解剖学会全国学術集会。2010年3月30日：盛岡

②浅井笑子、山本雅哉、上田和毅、和栗聡。ラット皮膚創傷治癒過程におけるMAP1LC3の免疫組織学的動態解析。第115回日本解剖学会全国学術集会。2010年3月30日：盛岡

③亀高愛、山田茜、澤田直樹、山本雅哉、曾友深、小松雅明、和栗聡。Atg3欠損マウス線維芽細胞株におけるオメガソームマーカーDFCP1の局在解析。第56回東北・北海道連合支部学術集会。2010年9月25日：旭川

④伊藤敬、菅野栄子、植村武文、和栗聡、福田光則。オートファジーに関するRab-GAPの探索。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会。2011年3月28日：神戸

⑤和栗聡。Atg欠損マウス線維芽細胞株におけるオートファジー関連構造の形態学的相互関係。第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会。2011年3月28日：横浜（東日本大震災のため誌上開催）

[図書] (計2件)

①谷田以誠、上野隆、和栗聡。「タンパク質分解系による生体制御：オートファジーの評価方法」実験医学 29(12): 2054-2062 (2011)

② Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol* 648: 193-214 (2010)

[その他]

ホームページ等

[http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/anatomy2\\_index.html](http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/anatomy2_index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30244908

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし