

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23770226
研究課題名（和文） 光学顕微鏡と相関させた電子線トモグラフィーによるオートファゴソーム形成過程の解析
研究課題名（英文） Analysis of autophagosome formation using CLEM tomography
研究代表者 濱崎 万穂（HAMASAKI MAHO） 大阪大学・医学系研究科・助教 研究者番号：30455216

研究成果の概要（和文）：細胞内大規模分解系であるオートファジーは、飢餓時の生存維持や変性疾患などの疾患発症の抑制など多岐に亘る機能を有し注目を集めている。オートファジーが誘導されると、細胞質で膜オルガネラであるオートファゴソーム（AP）が新規に形成される。長年論争が続いていたAP膜の起源が、我々は小胞体-ミトコンドリアコンタクトサイトが形成の場であることを見つけた（Nature, 2013）。AP膜形成は複雑でダイナミックな過程であるが、最も重要な形成初期の実態がこれで明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：One of the cell survival mechanism called autophagy gets activated when cells face starved condition, accumulates abnormal proteins, bacterial invasion and so on. Autophagosome (AP) is formed newly within cytosol that gets fused with lysosomes for degradation. Where AP is formed within cells have been a long-standing question since that will leads to its membrane source. We identified such site to be ER-mitochondria contact site (Nature, 2013). AP formation is dynamic and this finding will help characterizing the most interesting part of formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜、オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

AP は細胞が必要時に初めて形成されるという他のオルガネラとは違う特徴を持っているため、形成サイト及び膜の起源は非常に興味深い点である。近年、我々を始めとし、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ・エンドソームからの膜輸送の関与が報告された。現所属ラボで、小胞体に局在を示す Atg14L たんぱく質が発見され(JCB, 190(4):511, 2009)、同年に電子顕微鏡トモグラフィー法により小

胞体の隔離膜形成への関与が示された(NCB, 11:385, 2009)。翌年、他のグループがミトコンドリア外膜が AP 膜形成に関与していると報告している(Cell, 141(4):656, 2010)。既存のオルガネラの関与はほぼ明らかに思えるが、乱立した状態である。AP 膜形成にかかる時間は約 10 分であり、段階的なオルガネラの関与があるのかもしれない。

オートファジーの業界は、電子顕微鏡観察抜きでは成り立たない。1963 年に

Christian de Duveによりオートファゴソーム膜構造が動物細胞で観察された。ブレイクスルーになったのが、去年京都賞を受賞された大隅良典先生が1990年にオートファジー関連因子を同定された酵母での研究である。この時に、オートファゴソーム膜の特徴で他のオルガネラで見られない、脂質2重膜を2層もっていると証明出来たのも電顕のおかげである。しかし、デメリットもあり、それは固定したサンプルしか観察ができない。

一方で、光顕は細胞を固定せずに観察を行える。最近の技術の向上により、かなり解像度よく観察が行えるようになったが、電顕には及ばない。そこで、本研究では、膜動態最大の謎である**AP膜起源に迫る**ために、細胞内既存オルガネラとの関係を光顕、電顕両者の利点を利用する手法を取り入れる。観察したい箇所を光顕で同定し、その場所を電顕で観察する。この相関法を用いた解析はこれまで行われておらず、新しい切り口でAP膜起源及び形成サイトを解明する。

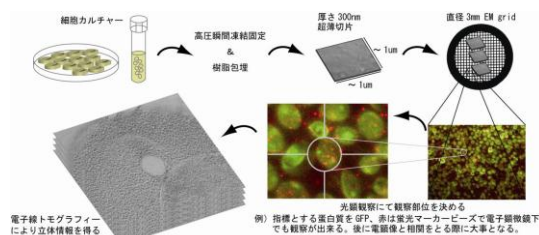
2. 研究の目的

オートファゴソーム膜形成機構の解明には、形成過程を追うために形態解析が不可欠である。これまで、蛍光たんぱく質の光顕観察によりAPの様々な画像や動画が数多くとられてきたが、解像度の限界から特に酵母では輝点以上の分解能を得るのが難しい。電顕での解析も早くから行われ、たんぱく質の局在等多くの情報は得られたものの、2次元での観察はダイナミックな膜動態の解明には一歩及ばない。申請者は、3次元解析が可能になる電子線トモグラフィー法をとりいれ、AP膜形成場周辺の膜構造体の立体情報を高い解像度で得ることで、AP膜形成を解析する。3次元構造をもつオルガネラは2次元より3じげんでの観察のほうがより確かな情報を得られやすい。

本研究では、AP膜起源に迫るために、細胞内既存オルガネラとの関係を光学顕微鏡・電子顕微鏡を駆使した形態学的手法を用い、3次元に解析を行う。小胞体やミトコンドリアは電子顕微鏡下で簡単に検出できる。オルガネラは細胞内で複雑なネットワークを構築しており、AP膜形成サイトを立体的に観察することで、既存オルガネラとの関係性を解明する。

3. 研究の方法

(1)主として、前年度ドイツで修得した最新手法である光顕・電顕相関法を導入する。作製しておいた試料の解析から始め、AP膜形成



過程における既存オルガネラの関与の解明にどの時期の形成過程が適しているかを探り、電子線トモグラフィーを用いた局所的・経時的・立体的な解析を行う。

蛍光プローブを観察対象の蛋白質自身のプロモーター下に安定発現させた酵母細胞を、高圧凍結装置を用いて**瞬時に固定**する。樹脂に包埋後、電子線トモグラフィー用に厚手(300 µm)に作成された切片を電子顕微鏡観察時に用いるグリッド(直径 3mm)上に置き、**グリッドの状態**で光顕観察を行う。光顕観察後、グリッドを**そのまま**電子顕微鏡に挿入し、光顕により特定した興味対象箇所の3次元観察を行うことが可能となる。

(2) Atg 因子組み合わせを駆使した AP 膜形成過程の経時的解析 (酵母細胞を用いる)

2種類の蛋白質を可視化することでより形成過程を細かく追うことが出来るため、様々なペアの安定発現株を作成する。例えば、Atg5はAP膜形成途中にAP膜上に局在するが、AP形成が完了すると外れる。一方、Atg8はAP膜形成初期から形成後も膜上に局在することが知られている。このペアを用いることで、ねらうのが困難な形成途中にあるAP膜を確実に狙うことが可能となる。飢餓に置く時間を変え**経時的**な観察を試みる。形成サイトの周りに特に小胞体がよく観察されているが、2次元の解析では部分的な結合があったとしても観察するのはとても困難である。よって、既存オルガネラとの関係を3次元解析により試みる。

データ解析はまだ開発が必要な部分があるため、申請者が技術を習得したヨーロッパ分子生物学研究所(EMBL)(ドイツ)の共同研究者との話し合いが重要となる。又、EMBLは常に新しい技術を開発しており、情報交換を心がける。

(3) DFCP1 を指標にしたほ乳類動物細胞の AP 膜形成初期過程の解析

ほ乳類動物細胞では**小胞体**との密接な関係を示唆する論文が多々でてきている。DFCP1はER蛋白質でAP膜形成**初期**の指

標となるのが既に報告されているので、Atg 蛋白質と組み合わせ、3次元解析を行う。例えば、酵母とは異なり Atg14 は小胞体と AP 膜両者に局在することが報告されている。DFCP1 と Atg14 を安定発現させた細胞を、栄養富状態から飢餓をかける間を経時的に固定し、観察することで、AP 膜形成を詳細に観察する。

酵母よりも AP は大きいことから、300 マイクロという切片の厚みではカバーできない。そこで、**連続切片**をつくり、モニターをつくることで**各々の切片の同じ箇所**を観察し、**立体構築**する方法をとる。又、細胞をプレートから剥がすのではなく、サファイアディスク（直径 3 mm）上に細胞を増殖させ、高圧瞬間凍結装置により**生きている状態に限りなく近い状態で固定**する。細胞全体を切片にし、順番に集め、細胞全体を立体構築する。AP 膜形成場の同定、非常に密に存在する小胞体のネットワークが AP 膜形成にどのように関わるかを**3次元**に観察する。

又、小胞体とミトコンドリアのジャンクションが AP の形成に重要である可能性があり、それをこの方法を用いることで試みる。小胞体もミトコンドリアも電子顕微鏡観察による形態で容易に同定できる。

(4)ライブセルイメージングによる AP 膜形成と既存のオルガネラとの関係性の解明

AP 膜形成関連因子と主に関与すると言われている小胞体、乱立の原因となったミトコンドリアの 3 因子を同時に可視下することで、AP 膜形成時の 2 つのオルガネラの関与をタイムリーに観察する。現状、市販の顕微鏡で 3 因子を同時に観察できるものがないので、顕微鏡の組み立てから行う。3 因子を同時に観察する意義は、一台のカメラでフィルターを替えながら撮影することでロスする時間によるずれを防ぐことにある。

光顕はライブイメージングが可能だが、分解能に限度がある、電顕は、分解能はあるが細胞を固定しないと観察ができない。よってお互いの利点を生かすことで、研究を進める。

4. 研究成果

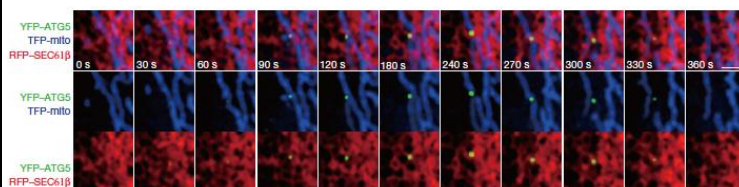
予定をしていた最新手法の導入は無事に終わり、光顕で観察した部位を電顕で観察するという画期的な方法により、酵母細胞及び動物細胞を用いて、AP 膜の初期過程の観察ができつつある。特に、酵母細胞では AP 膜初期構造といわれるオートファジー関連因子がドットとして見える PAS の構造がどうい

ものか、10年以上たつが全く分かっていない。画期的な最新技術を導入することで謎の多かった PAS 構造体が見え始めている。今はまだ、変異株を用いて見やすくすることで観察をしているが、今後、野生株で PAS の構造体を 3D 観察し構造を決めたいと思っている。

また、動物細胞では、AP 膜初期に働いたタンパク質を指標にし、相関を撮った場所を 3次元電顕解析することで、小胞体やミトコンドリアとの密接な関係もみえてきている。3次元でないとも見えてこなかった情報が取得され始めている。

また、同時進行で世界初の多色ライブ蛍光観察の系も立ち上げることに成功した。ユニークな点は多色（3色）を同時に観察するためにカメラを 3 台つけたところにある。これまでは多色で撮る際、フィルターを切り替えながらとっていたがそうするとタンパク質の動向を同時に観察することはできない。小胞体とミトコンドリアというメジャーに存在するオルガネラと AP 膜形成との関係を調べるには、同時であることが大事であった。この装置により、長年の懸案であった AP 膜初期形成サイトが、小胞体-ミトコンドリアコンタクトサイトであることを突き止めることに成功した。図 1、オートファゴソームは小胞体-ミトコンドリアコンタクトサイトで形成される。ATG5 (AP マーカー)、mito (ミトコンドリアマーカー)、SEC61β (小胞体マーカー)。

ライブセルイメージングにより明らかに



なった小胞体-ミトコンドリアコンタクトサイトがどういう役割を果たし、また AP 膜とどのようにつながるのか、それこそ光顕・電顕相関法が威力を発揮するトピックなので、今後もこれまでの結果を踏まえ、観察を続ける。

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 2 件)

Hamasaki M, Shibutani ST, Yoshimori T, Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation, *Current Opinion in Cell Biology*, 査読有, S0955-0674(13), (2013), 25:1-6.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites, Nature, 査読有, 495(7441), (2013), 389-393.

〔学会発表〕(計 5件)

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites, EMBO autophagy, May 5-9 (2013), Norway

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites
Quantitative Bioimaging, March 17-19 (2013), Okazaki

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites
ASCB (American society for Cell Biology), December 15-19 (2012), San Francisco

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites
ISA (International Symposium on Autophagy), Oct 28-Nov 1 (2012), Okinawa

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites
The 4th EMBO meeting, September 22-25 (2012), Nice

〔図書〕(計 1件)

濱崎万穂、吉森保、羊土社、オートファゴソーム膜の起源の謎、(2013)、1334-1466

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshi>

mori/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱崎 万穂 (HAMASAKI MAHO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 30455216