

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390048

研究課題名(和文) オメガソーム細管構造の研究 - サブミクロンレベルの形態学と分子機能

研究課題名(英文) Morphological and functional analyses of isolation membrane-associated tubules

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー隔離膜の近傍に見出された新規細管構造としてisolation membrane-associated tubule (IMAT)を見出し、その詳細な解析を行った。電子線トモグラフィ法を用いた三次元立体構築によりIMATが小胞体と隔離膜に内腔を通じて連続していること、オメガソームの本体であること、小胞体における隔離膜生成の初期過程に関連することを明らかにした。また、電子顕微鏡でIMATを検出するためにオスmium酸を用いた新規固定法を開発した。小胞体で始まる隔離膜生成の最も初期の形態変化は未だ捉えられておらず、ここに関与する分子機構も含め、本研究がこれら疑問に答える糸口になる。

研究成果の概要(英文)：A cluster of thin tubules near the rim of autophagic isolation membrane was identified as a novel fine structure, and each element was named as the isolation membrane-associated tubule (IMAT). By electron tomography, IMAT was found to be continuous with the endoplasmic reticulum (ER) and isolation membrane (IM). Immunoelectron microscopy revealed that the cluster of IMATs corresponds to omegasome, a precursor structure of IM at light microscopic levels. Moreover, IMAT is suggested to be involved in the early events of isolation membrane formation on the ER. Also, we developed a new method using osmium tetroxide for detecting IMAT. This study would pave the way for clarifying mechanisms of the early events of IM formation on the ER membrane.

研究分野：細胞生物学、細胞組織学、電子顕微鏡学

キーワード：オートファジー オメガソーム 電子線トモグラフィ法 電子顕微鏡 固定法

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への適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を低分子(アミノ酸等)まで分解し、再利用する。近年、オートファジーに關与する Atg (autophagy-related) タンパク質群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。最近の解析技術の向上により、矢継ぎ早に「小胞体」「ゴルジ体」「ミトコンドリア」「細胞膜」が由来として報告された。しかし電子顕微鏡レベルで普遍性を持って証明されているのは「小胞体」のみである。光学顕微鏡を用いたライブセルイメージングでは小胞体からリング状の phosphatidylinositol-3 phosphate に富む領域として「オメガソーム」が出現し、そこから「たもあみ」の「あみ」の形状を取りながら隔離膜が形成される(Axe et al, J Cell Biol., 2008)。一方、電子線トモグラフィ解析では、小胞体と隔離膜をつなぐ小管の存在が証明され、小胞体由来説を支持した(Hayashi-Nishino et al., Nat. Cell Biol, 2009; Yla-Anttila et al., Autophagy, 2009)。しかし、オメガソームの微細構造が不明なために、光学顕微鏡と電子顕微鏡の観察結果は必ずしも一致しない。重要なことに、この現象は 1 μm 内の空間(サブミクロン)における膜動態変化を伴い、その 3 次元構造は通常の光学顕微鏡と電子顕微鏡解析の限界の狭間にあって、最も認識されにくい。

申請者らは先行する挑戦的萌芽研究において、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近傍に存在する多数の細管構造を見いだした。またその細管構造体に DFCEP1 (double FYVE domain-containing protein 1) が局在することから、これがオメガソームの本態である可能性を示唆した。そしてその構造を IMAT (Isolation membrane-associated tubule) と命名した。しかし、現時点での知見は 2 次元面での観察に限定されており、またどのような機能分子と関係するかも分かっていない。そのため、この新規細管構造の解析を多方面に展開する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では IMAT 構造について以下の解析を展開し、分子機能に基づく形態学的基盤を確立することを目指した。

(1) 電子顕微鏡法を用いて、小胞体、IMAT、オートファジー隔離膜の三次元的な位置関係や連続性について明確にする。また、IMAT

固定法として見出したオスミウム初期固定法の改良法を開発する。

(2) IMAT の形成初期、リング形成期、消失期における動態、および小胞体および隔離膜との位置関係をライブセルイメージングや CLEM 法(後述)で明らかにする。

(3) 関連 Atg 分子、小胞輸送関連分子、膜脂質修飾分子群の局在と動態を解析し、これら分子の作用する場を特定する。また、これら関連分子の欠損細胞や発現低下細胞を用いて形態学的解析を行い、隔離膜形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株: 不死化した野生型あるいは Atg3 を始めとする各種 Atg 遺伝子欠損胎児由来線維芽細胞(MEF)を用い 10% ウン胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で 32.5 mm^2 、5% CO₂ の環境で培養した。飢餓誘導法は 10 mM HEPES を含むハクス平衡塩液(HBSS)に培地交換し 30-120 分間培養した。

(2) 免疫蛍光法: MEF を 4% パラホルムアルデヒドで室温 15 分間固定し、0.1% Triton x-100 で透過処理を行った後、各種一次抗体と反応させた。さらに適切な種類の蛍光色素標識された二次抗体と反応させ、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, オリンパス)で観察した。

(3) CLEM (correlative electron-light microscopy) 法: GFP-DFCEP1 を発現する MEF を 2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液で固定し、GFP シグナルを撮影後、還元オスミウム(OsO₄)法で後固定し、エポキシ樹脂に包埋した。目的シグナルを含む部位を探してトリミングし、連続超薄切片を作製した後、電子顕微鏡(JEM1200EX, JEOL)で観察した。

(4) 電子線トモグラフィ法: MEF を 2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒド、2% OsO₄ を含むカコジレート緩衝液で固定し、定法に従ってエポキシ包埋した。200 nm 厚切片を作製し、電子顕微鏡(JEM1400, JEOL)を用いて 120kV で観察した。グリッドを 1° ずつ傾斜しながら $\pm 60^\circ$ の範囲で撮影し、TEMography software (System In Frontier Inc.) で三次元立体構築を行った。

(5) 免疫電顕法: MEF を 4% パラホルムアルデヒド、0.1% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液で固定し、氷晶防止処理後に凍結した。凍結超薄切片を作製し、抗 GFP 抗体で反応させ、さらに 12 nm 径の金コロイドで標識された二次抗体を反応させた。

4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡を用いた IMAT の詳細形態解析

IMAT、小胞体、オートファジー隔離膜の位

置関係を3D トモグラフィ法により解析した。

閉鎖過程にある隔離膜、すなわちファゴフォアを同定し、その開口部を観察すると、IMAT と小胞体、あるいはオートファジー隔離膜との間に内腔を通じた連続性が認められた(図1)。連続性の程度を推測するために10個のファゴフォア構造について200 nm厚内で立体構築し、連続性を示す箇所を数えた所、IMAT-小胞体間は 1.3 ± 1.2 、IMAT-隔離膜間は 1.6 ± 1.2 、両者とも連続している箇所は 0.6 ± 0.7 であり、合計 3.5 ± 2.0 程度の連続性を認めた。以上の観察から、開口部の大きさによるものの、一つのファゴフォアあたり約10本のIMATが隔離膜と小胞体の間に存在していると推測した。

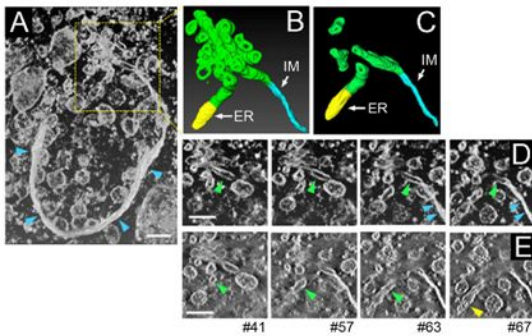


図1 IMAT構造の3次元立体構築

野生型MEFで観察されたオートファジー隔離膜(青矢頭)、小胞体(ER、黄矢頭)およびIMAT(緑矢頭)を示す。Aの黄枠を立体モデル化した図がBとC(Bの一部構造を削除したものの)、XY断面の連続画像をDとEに示す。

(2) CLEM および免疫電子顕微鏡を用いた GFP-DFCP1 の局在解析

オメガソームマーカーである GFP-DFCP1 の局在を解析するために、まず免疫蛍光法で検出したシグナルと電子顕微鏡写真を対比させる CLEM 法を行った。その結果、GFP-DFCP1 の点状シグナルはファゴフォアの開口部位に一致していた(図2A)。同様の結果は Atg3 欠損 MEF でも認められた(データは割愛)。

さらに、Atg3 欠損 MEF について凍結超薄切片-免疫金コロイド法を施行した。その結果、GFP-DFCP1 は主にファゴフォア開口部の小管小胞構造、すなわち IMAT に集積した(図2B)。また、濃度は薄いが一歩は隔離膜そのものにも局在することが判明した(図2C)。

以上の結果より、ファゴフォアの開口部付近に存在するオメガソームの本体は IMAT であることが分かった。

(3) IMAT 検出のための新規固定法の開発

我々が開発した方法、すなわち 2% パラホルムアルデヒド-2% グルタルアルデヒド-2% OsO₄ の3者混合液(PA/GA/Os 混合液)を初期固定

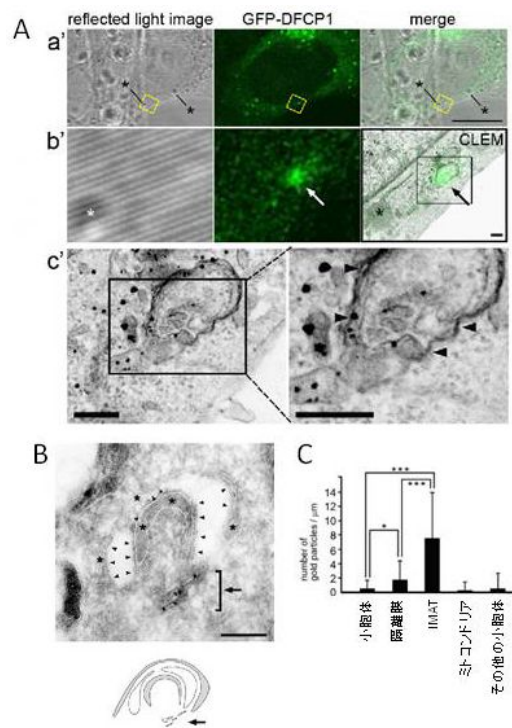


図2 GFP-DFCP1の局在解析

GFP-DFCP1 を発現する野生型MEF を CLEM(A)、GFP-DFCP1 を発現するAtg3欠損MEF を凍結超薄切片金コロイド免疫法(BとC)で解析した。(A) GFP-DFCP1 蛍光シグナルと電子顕微鏡との重なりをb'右端(CLEM)に、b'の四角枠部分をcに拡大して示す。(B) GFP-DFCP1 を示す金コロイドは隔離膜(矢頭)辺縁近傍のIMAT構造に局在する。(c)膜オルガネラ上の金コロイド数を定量し、グラフで示す。

液とする手法は、新たな膜ドメイン検出法として有用である可能性があるものの、その至適処理条件については検討の余地がある。そのため、同固定法における固定温度の影響について検討した。

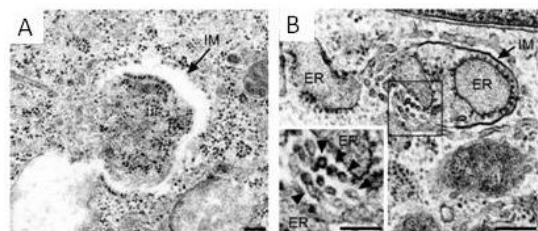


図3 PA/GA/OsO₄混合液固定法における固定温度がオートファジー隔離膜およびIMAT形態へ与える影響

MEF を PA/GA/OsO₄ 混合液により、4°C (A)、あるいは30°C (B) で固定処理し、電子顕微鏡観察を行った。黒枠部位を拡大してinsetに示す。矢頭: IMAT, Bars: 200 nm, inset 100 nm.

MEF を 4°C で固定した場合、ミトコンドリアなどオルガネラ膜の断裂像と内部構造の変性が観察され、オートファゴソーム隔離膜の存在は2重膜の空隙として認識可能であったが隔離膜自体

は認められなかった(図 3A)。一方、15 °C で固定した場合は、各種膜オルガネラは同定可能であり、隔離膜および IMAT も認められた。30 °C で固定した場合は、全体的な形態保存性は 15 °C で固定した場合と同様であったが、隔離膜と IMAT の膜の電子密度が高く、より明瞭であった(30 °C のみ図 3B に示す)。

以上より、IMAT の電子顕微鏡解析において、安定した試料作製法の開発に成功した。

(4) MEF 以外の細胞における IMAT の観察

IMAT 構造の出現が普遍的かどうかを調査するため、MEF 以外の細胞株として ARPE-19 (ヒト網膜細胞由来)、Huh-1 (ヒト肝細胞癌由来)、HeLa (ヒト子宮頸癌由来)、NRK 細胞(ラット腎臓由来)について、電子顕微鏡解析を行った。その結果、4 種類の細胞において閉鎖過程にある隔離膜近傍に明瞭な IMAT 構造が認められた(図 4; HeLa 細胞と NRK 細胞については割愛)。このことは同構造がアミノ酸飢餓により普遍的に出現することを強く示唆する。

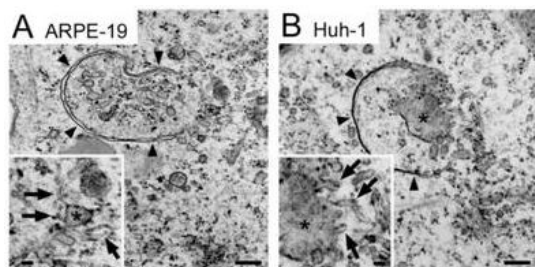


図4 MEF以外の細胞におけるIMAT構造
ARPE-19 (A) および Huh-1 (B) 細胞をハンクス液で2時間培養し、PA/GA/OsO4混合液にて固定した。矢印: IMAT、矢頭: 隔離膜、Bars: 200 nm, inset 50 nm.

(5) IMAT 構造と関連遺伝子機能との関係

様々なオートファジー関連遺伝子の欠損 MEF において IMAT 構造の有無および形態変化を解析した。最初に、アミノ酸飢餓によるオートファゴソーム隔離膜の誘導について電子顕微鏡で調べた。Atg 結合反応に関与する Atg3, Atg5, Atg7, Atg16L をそれぞれ欠損する MEF では、野生型 MEF と同程度にアミノ酸飢餓による隔離膜の増加が認められた。中でも Atg3 欠損 MEF では顕著に増加した。一方、Ulk1 複合体のサブユニットである FIP200 欠損 MEF では隔離膜はほとんど認められなかった。

次に Atg5, Atg7, Atg16L のそれぞれを欠損する MEF について IMAT の存在を調べたところ、どの MEF においても IMAT 構造が認められた。この事は IMAT の生成は Atg 結合反応に依存せず、より初期の隔離膜生成機構に関与することを示唆する。

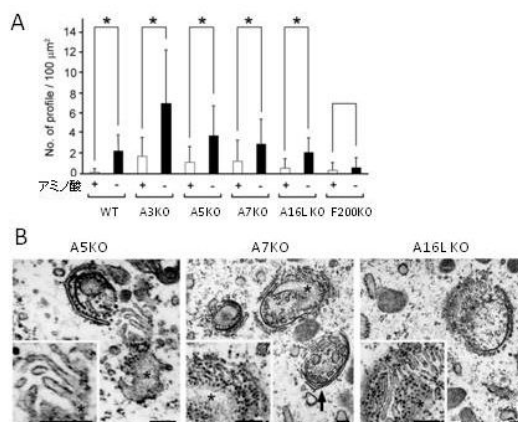


図5 オートファジー関連遺伝子欠損MEFにおける隔離膜とIMAT構造

(A) 野生型 MEF (WT)、Atg3 欠損 MEF (A3KO)、Atg5 欠損 MEF (A5KO)、Atg7 欠損 MEF (A7KO)、Atg16L 欠損 MEF (A16LKO)、FIP200 欠損 MEF (F200KO) を完全培養 (+) およびアミノ酸欠乏培地 (-) で 2 時間培養し、固定後、電子顕微鏡解析を行った。隔離膜の数をグラフに示す。(B) Atg5 欠損 MEF (A5KO)、Atg7 欠損 MEF (A7KO)、Atg16L 欠損 MEF (A16LKO) で観察された IMAT 構造。矢印: 多重隔離膜、アスタリクス: 小胞体、Bars: 200 nm

(6) IMAT 構造とミトコンドリアあるいは Atg9 小胞との関係

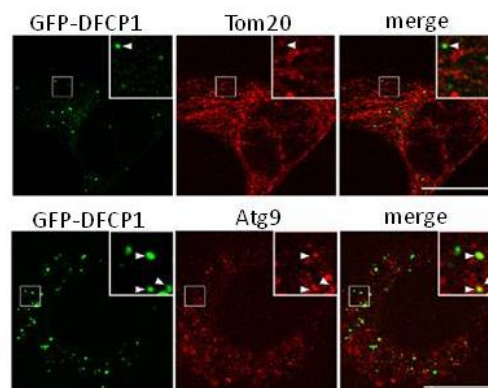


図6 IMAT構造とミトコンドリア、Atg9小胞との関係

GFP-DFCP1 を発現する野生型 MEF をアミノ酸欠乏培地 (-) で 2 時間培養し、固定後、抗 Tom20 抗体および抗 Atg9 抗体で免疫染色を行った。四角枠部分を拡大し inset に示す。矢頭は GFP-DFCP1 陽性顆粒のうち、それぞれのマーカーと共局在あるいは近接しているものを示す。Bars: 20 μm

隔離膜の由来候補としてミトコンドリアと Atg9 小胞が報告されているため、IMAT 構造とこれら構造との関係を調べた。GFP-DFCP1 を発現する MEF 細胞でオメガソームを誘導し、ミトコンドリアマーカーである Tom20 との共局在を調べたところ、63.5% ± 12.8% (n=10) の GFP-DFCP1 陽性顆粒は Tom20 と共局在あるいは近接していた。次に Atg9 小胞に関しては、40.7% ± 6.9% (n=10) の GFP-DFCP1 陽性顆粒が Atg9 と共局在あるいは近接していた。さらに電子顕微鏡で

IMAT あるいは隔離膜とミトコンドリアの関係を調べたところ、約 60%の IMAT / 隔離膜では、構造の縁から 400 nm の範囲内にミトコンドリアが観察された。しかし直接接する像は認められなかった(データは割愛)。以上の結果は、ミトコンドリアや Atg9 小胞が IMAT 生成に何らかの機構により関連する可能性を示唆する。

(7) 結語

本研究により、オートファジー関連オルガネラとして IMAT 構造を発見した。IMAT は飢餓シグナルにより小胞体から生成されるオメガソームに相当すること、隔離膜生成の初期過程に関与することを明らかにした。また、電子顕微鏡で IMAT を検出する新たな固定法を開発した。隔離膜生成に関しては、小胞体で始まる最も初期の形態変化は未だ捉えられておらず、ここに関与する分子機構も含め、本研究がこの疑問に答える糸口になると考えている。

<引用文献>

- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N. T., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182, 685-701.
- Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., Eskelinen, E. L., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 5, 1180-5.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., Yamamoto, A., 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 11, 1433-7.

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)

矢橋あつ子, 植村武文, 和栗聡: オートファジー隔離膜近傍細管集合体の観察に用いるアルデヒド-オスミウム混合固定液の最適温度について, *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌* (2014) 28:9-11. 査読有

和栗聡, 植村武文, 山本雅哉, 矢橋あつ子: 哺乳類オートファジー関連オルガネラの電子顕微鏡観察, *顕微鏡* (2014) 49:118-123. 査読無

Kageyama S, Sou YS, Uemura T, Kametaka S, Saito T, Ishimura R, Kouno T, Bedford L,

Mayer RJ, Lee MS, Yamamoto M, Waguri S, Tanaka K, Komatsu M: Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem* (2014) 289:24944-24955. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M114.580357

Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou YS, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M, Waguri S: A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Mol Cell Biol.* (2014) 34:1695-1706. 査読
doi: 10.1128/MCB.01327-13

Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M: Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell.* (2013) 51:618-631. 査読有
doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.

Ishibashi K, Uemura T, Waguri S, Fukuda M: Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, participates in hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity. *Mol Biol Cell* (2012) 23:3193-202 査読有
doi: 10.1091/mbc.E12-01-0010.

[学会発表](計14件)

Waguri S: Ultrastructural analyses of the formation of autophagic isolation membrane in mammalian cells. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会: 2015年3月21-23日: 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Waguri S, Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou Y, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M: A cluster of isolation membrane-associated tubules represents a part of omegasome during final steps of autophagosome formation. ASCB meeting, 2014/12/6-10, Philadelphia (USA)

Waguri S: A cluster of isolation membrane-associated tubules represents a part of omegasome during autophagosome formation. Northeastern Asian Symposium on Autophagy, 2014/12/18-21, 釜山(韓国)

植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 安納弘道, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与す

る。第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25-27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(神奈川県・横浜市)

植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 安納弘道, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する。第66回日本細胞生物学会大会, 2014年6月11-13日, 奈良県新公会堂/東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)

和栗聡: オートファジー研究が切り拓く電顕ワールド。医学生物学電子顕微鏡技術学会第30回学術講演会および総会, 2014年5月23-25日, 大阪大学銀杏会館(大阪府・吹田市)

植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月27-29日, 自治医科大学(栃木県・下野市)

Waguri S.: Autophagosome precursor structures and p62-aggregates associated with autophagy deficiency. XXIII International Symposium on morphological Science, 2013年9月10-13, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

Waguri S.: Morphological aspects of the biogenesis of ER-derived autophagic isolation membranes. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013 (ASahct 2013): 2013年8月27-28日, 東北大学良陵会館(宮城県・仙台市)

和栗聡, 植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 亀高諭, 曾友深, 小松雅明: オメガソームの微細構造解析。日本顕微鏡学会第69回学術講演会, 2013年5月20-22日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

和栗聡, 植村武文, 山本雅哉, 亀高諭, 曾友深, 小松雅明: オメガソームの微細構造解析および隔離膜・小胞体との関係。第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013年3月28-30日: サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県・高松市)

Waguri S.: Fine structure of omegasome and its relationship to the ER and isolation membrane. The 6th International Symposium on Autophagy, 2012/10/28-11/1, 万国津梁館(沖縄県・名護市)

山本雅哉, 和栗聡: 電子線トモグラフィー法を用いたオートファゴソーム最終形成過

程の微細構造解析。日本解剖学会第58回東北・北海道連合支部学術集会, 2012年9月22-23, 山形大学医学部(山形県・山形市)

Wagui S.: Morphological aspects of the biogenesis of ER-derived autophagic isolation membranes. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012/8/26-29, 京都国際会議場(京都府・京都市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/achie.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

亀高諭 (KAMETAKA SATOSHI)

福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10303950
(H23/24年度のみ、転出のため)

山本雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)

福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20446115

植村武文 (UEMURA TAKEFUMI)

福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80548925

(3) 連携研究者

小松雅明 (KOMATSU MASAOKI)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科
・教授
研究者番号: 90356254