

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04670

研究課題名(和文)オートファジーの機能形態学的基盤 - 隔離膜生成機構の解明に向けて

研究課題名(英文) Morphofunctional analyses of autophagy for understanding the mechanism of the isolation membrane formation

研究代表者

和栗 聡 (Satoshi, Waguri)

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はオートファジー隔離膜の初期構造の同定を目的とした。アミノ酸飢餓誘導によるオートファジーの解析は他グループから発表されたため、対象をマイトファジーに絞った。その結果、鉄欠乏誘導性マイトファジーにおいて、ミトコンドリア表面における隔離膜伸長がミトコンドリアの部分隔離に重要であること、および近傍の小胞体が前駆体となる可能性を示すことができた。また、隔離膜の構造を走査型電子顕微鏡で観察することに成功し、次の研究に繋げることができた。さらに、創傷治癒過程の線維芽細胞および癌力ヘキシアで見られる萎縮筋線維において、オートファジー・リソソーム分解系が重要な働きを担うことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify precursor structures of the autophagic isolation membrane. Because another group demonstrated the ones induced by amino acid starvation using similar approaches, we focused on investigating on mitophagy. As a results, we found that the extension of the isolation membrane on the mitochondrial surface is involved in the iron-deficiency induced mitophagy. Also, we were able to establish a method for observing the isolation membrane by scanning electron microscopy, which will promote future research project. Finally, we suggested the importance of autophagy-lysosomal system in fibroblasts during wound-healing process and in muscle fibers in cancer induced cachexia.

研究分野：細胞生物学、人体組織学

キーワード：オートファジ 隔離膜 CLEM マイトファジー 鉄欠乏 創傷治癒 線維芽細胞 癌力ヘキシア 筋委縮

1. 研究開始当初の背景

オートファジー(自食作用; self-eating)は栄養飢餓、凝集体蓄積、微生物感染などに代表される細胞ストレスへの適応機構と捉えられている。同機構が発動されると細胞の一部が隔離膜で囲まれ(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、オートファジーに関与するAtg (autophagy-related) タンパク質群の機能解析が進む一方で、隔離膜の由来について様々な可能性が検証されてきた。特に電子顕微鏡レベルで証明されているのは「小胞体」である。申請者らは先行する基盤研究(B)の成果として、電子顕微鏡用の新たな試料固定処理法を開発し、小胞体付近に存在するとされてきた隔離膜前駆体構造「オメガソーム」が約30 nm径の細管構造から成る集合体であることを見出した。そして同構造体をIMAT (isolation membrane associated tubule)と命名した(Uemura et al., *MCB*, 2014)。

しかし、同構造はあくまで隔離膜が「閉鎖」する段階で見出されたものであり、隔離膜形成初期段階で小胞体近傍にどのような形態変化を来すかは不明である。一方で、分子細胞生物学的研究により、初期段階に関わる分子としてULK1 complex, PI3 kinase complex, PI(3)P binding proteins, Atg9 vesicles, p62 protein等が報告された。これらが小胞体構造の変化あるいは新規膜成分の合成、供給にどのように関わるのかは不明であり、これら分子群が働く現場を捉える必要がある。ここで重要なことは、この隔離膜形成現象は1 μm内の空間における膜動態変化を伴うことであり、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く、これまで見逃されてきた可能性が大きい。したがってこのレベルの形態学的解析を、最新の時空間解析により多面的に展開する必要があると考えた。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では隔離膜形成初期構造について以下の解析を展開し、分子機能と対比できる形態学的基盤を確立することを目指す。

(1) 電子顕微鏡法による隔離膜初期形成部位の探索: オメガソーム細管構造を指標にして、オートファジー誘導初期における小胞体の形態変化候補を捉える。

(2) 光学顕微鏡法による隔離膜初期形成部位の分子指標の開発: 蛍光タンパク質を付加したオートファジー関連分子を作製し、細胞に発現させ、内在性タンパク質と同じ挙動を示す実験系を確立する。

(3) 分子機能と局在解析: 上記(1)と(2)の結果を直接比較、あるいは免疫電顕法を用いることで、隔離膜初期形成部位におけるオートファジー関連分子群の局在を明らかにすると共に、これら分子の発現低下、欠損細胞を作製して形態解析を行い、隔離膜形成における機能的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株: 隔離膜初期形成部位の分子マーカーとしてUlk1, Atg14L, WIPI1を選択し、これら分子のN末端側にGFPを付加したcDNAを構築した。レンチウイルスベクターを用いてマウス胎仔線維芽細胞(MEF)に遺伝子導入を行い、ゲノムに組み込まれた安定発現株を作製した。mito-mCh/EGFP-LC3Bを安定に発現するHeLa細胞は、新潟大学の神吉博士より入手した(Yamashita et al., *J Cell Biol*, 2016)。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MEFについては過去に報告したものをを用いた(Uemura et al., *MCB*, 2014)。これら細胞は10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で32.5℃, 5%CO₂の環境で培養した。飢餓誘導法は、アミノ酸不含DMEMに交換し30-120分間培養した。マイトファジーを誘導するために、1 mM deferiproneを約20時間投与した。

(2) 免疫蛍光法: オートファジーを誘導した上記細胞を、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で室温15分間固定し、0.1% Triton x-100/PBS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: 各種蛍光タンパク質標識マーカータンパク質を発現する細胞を2%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液(PB)で固定し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光シグナル(例えばGFPシグナル)を撮影した。その後、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特定してトリミングし、連続超薄切片を作製した後、電子顕微鏡(JEM1400EX, JEOL)で観察した。パソコン上で蛍光シグナルと電子顕微鏡像を重ね合わせながら目的構造を特定した。

(4) オスミウム浸軟法: アミノ酸飢餓培地で1時間培養したMEFを0.5%グルタルアルデヒドと0.5%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液で固定し、さらに1%オスミウム酸で1時間、後固定した。ゼラチンに包埋後、液体窒素を用いて凍結割断を行い、0.1% OsO₄中で3日間静置した。臨界点乾燥

と白金パラジウムコートをした後に走査型電子顕微鏡 (Hitachi, SU8200) で観察した。

(5) ラット創傷治癒モデル：7週齢ウイスターラットの背側皮膚に1 cm 径の皮膚全層欠損を作成し、6時間、2、5、7、9、14日後にラットを灌流固定し、創部を含む皮膚組織からパラフィン切片と凍結切片を作成した。これらについて、ウサギ抗 LC3 抗体 (EP1983Y, Epitomics) を用いた免疫組織蛍光法を行った。

(6) 患者腫瘍組織移植マウスモデル：重度の複合型免疫不全動物として NOG マウスを用い、大腸癌患者より採取した癌組織を腋窩に移植した。約3か月後に癌組織が生着したマウスと生着しなかったマウスの2群に分け、それらの腓腹筋を摘出し、固定後、凍結切片を作成した。それらについてウサギ抗 LC3 抗体 (EP1983Y, Epitomics) を用いて免疫組織蛍光法を行った。

4. 研究成果

(1) 隔離膜初期形成部位の探索について

GFP-Ulk1 を安定に発現する MEF においてアミノ酸飢餓によりオートファジーを誘導したところ、小胞体近傍に点状あるいはカップ状の形態を認め、これらは隔離膜マーカーである Atg16L と共局在していた。また、超解像顕微鏡解析では、これら構造が、さらに細かな輝点から構成されることが分かった。次に、CLEM を行った結果、隔離膜初期構造体と推測できる特殊形態を観察した。

しかし、2016年8月に他の研究グループにより類似成果が発表されたため (Karanasios et al., Nat Commun)、本研究の対象を変更し、まだ報告されていないマイトファジーで見られる初期隔離膜構造とした。mito-mCherry /GFP-LC3B を安定に発現する HeLa 細胞において、deferiprone 投与による鉄欠乏誘導性マイトファジーの誘導実験を行い、CLEM 解析を行った。その結果、ミトコンドリアの一部が隆起する部分に対応して隔離膜が近接する様子を捉えることに成功した(図1)。また、近傍の小胞体がこれら膜近傍に伸びている所見も得た。これら結果は、鉄欠乏誘導性マイトファジーにおいて、ミトコンドリア表面における隔離膜伸長がその部分的な分離に重要であること、小胞体が隔離膜の由来であることを示唆する。本成果は国内学会で報告した(学会発表、)。

一方、オスミウム浸軟法を走査型電子顕微鏡に応用し、野生型 MEF および Atg3 欠損 MEF を用いて飢餓誘導による隔離膜の観察を行った。その結果、典型的な隔離膜構造を同定することに成功した(図2)。しかも、隔離膜開口部の縁と小胞体が連続することを示唆する像を捉えることができた。しかし、構造の決定的な同定を行うには、分子マーカーの検出が不可欠であることも分かり、現在、免

疫ラベル法を組み合わせた新たな手法開発に取り組んでいる。

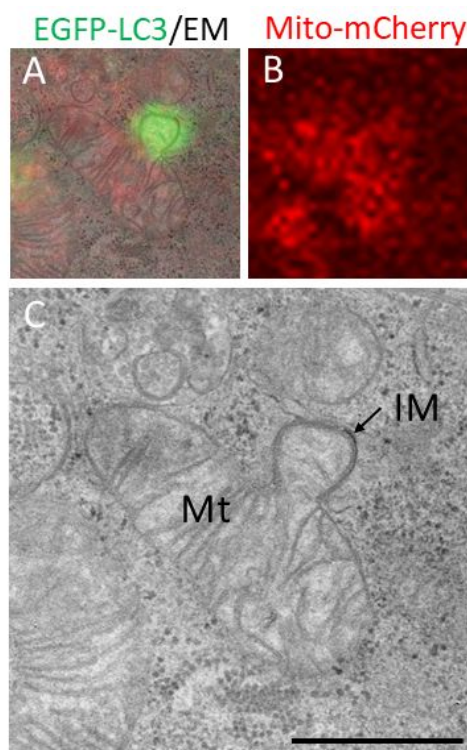


図1. マイトファジーにおける LC3 の CLEM 解析 Mito-mCherry /GFP-LC3B を安定に発現する HeLa 細胞において、deferiprone 投与後21時間で固定し、CLEM 解析を行った。電顕像と EGFP-LC3 の重ね合わせ像 (A)、Mito-mcherry によるミトコンドリア像 (B)、対応する電顕像 (C) を示す。バー：1 μm

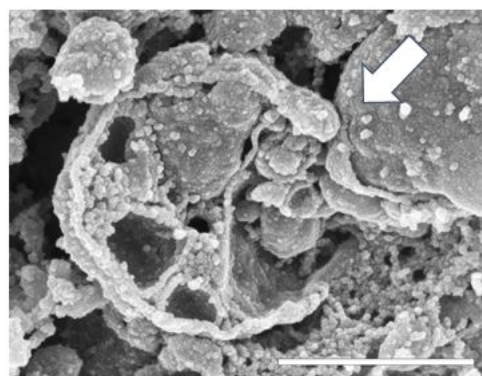


図2. 走査型電顕によるオートファジー隔離膜 野生型 MEF をアミノ酸飢餓培地で1時間培養し、固定後、オスミウム浸軟法により処理した。細胞質の一部を包み込もうとしているオートファジ 隔離膜 (矢印) が観察できる。バー：500 nm

(2) 他の実験系への応用

本研究では、免疫組織蛍光法で使用可能な隔離膜マーカーの開発とその応用に関する研究を行った。特にオートファジー誘導時に増加する LC3 顆粒に注目し、以下の成果を得た。

ラット創傷治癒モデルを用いた研究
創傷後の治癒過程において、線維芽細胞は増殖、分化、細胞外マトリックス産生、細胞死などに関連してダイナミックに変化する。この現象とオートファジーマーカーである LC3 との関係性を解析した。その結果、治癒過程で形成される肉芽組織中の線維芽細胞は、対照細胞より LC3 陽性顆粒数が増加していた (図 3)。

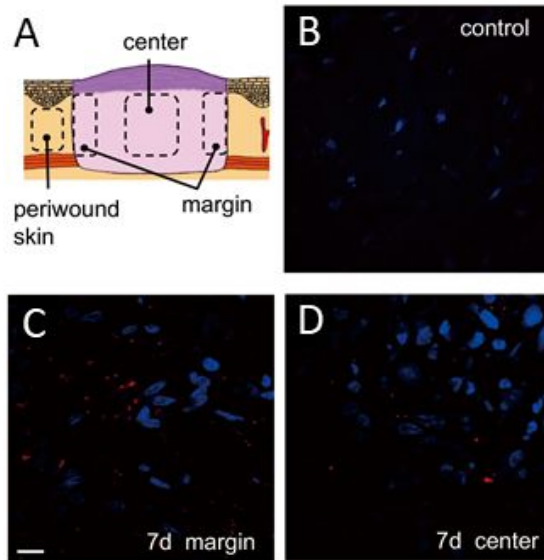


図 3 .創傷治癒組織における LC3 の免疫染色 control (B) に比して創傷治癒組織 (C, D) における LC3 陽性顆粒 (赤色) 数が多いことが分かる。青色は核染色。パー : 10 μm

また、その陽性顆粒数を数えたところ、創傷後 7-9 日をピークとする一過性の増加を示すこと、創中央よりも創縁の方が有意に多いこと、創外の真皮でも顕著な増加を示すことが示された (図 4)。

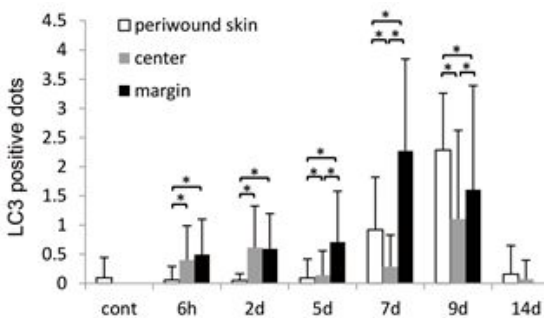


図 4 .創傷治癒過程における LC3 陽性顆粒の経時変化 創中央部 (center)、創縁部 (margin)、創外部 (periwound skin) における線維芽細胞当たりの LC3 陽性顆粒数を数えた。* : $p < 0.05$, ANOVA, Tukey-Kramer test.

この結果は、オートファジー リソソーム分解系が線維芽細胞の増殖分化に関連して変動することを示唆する (雑誌論文)。

患者腫瘍組織移植マウスの筋萎縮モデル
抗癌剤の開発過程では、*in vivo* の癌細胞増殖評価のために患者腫瘍組織移植マウス (PDX) が用いられる。癌力ヘキシアで見られる筋萎縮とオートファジーの関連を調べるために、PDX マウス腓腹筋における LC3 を免疫組織蛍光法により陽性顆粒の増減を解析したところ、正常な筋より増加していた (図 5)。

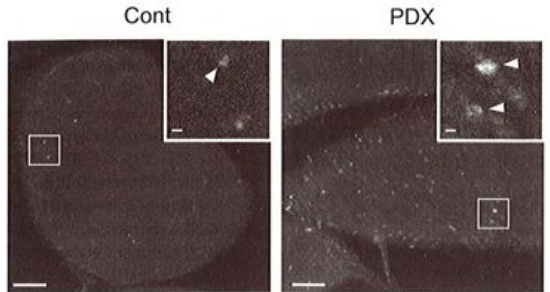


図 5 . 正常 (cont) および患者組織移植マウス (PDX) の腓腹筋における LC3 の免疫組織蛍光法 PDX マウスの腓腹筋では、リング状の LC3 陽性構造が多数認められた。しばしばリング状を呈するものも見られた。パー : 10 μm

さらにこれら構造を定量したところ、筋線維横断面面積および単位面積当たりの数は対照群と比較して有意に高値であった (図 6)。

これら結果は、オートファジー リソソーム分解系が癌力ヘキシア病態に密接に関わ

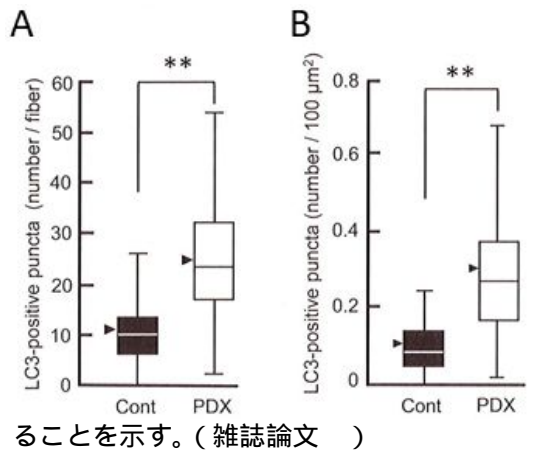


図 6 .筋線維断面面積 (A) および単位面積 (B) 当たりの LC3 陽性顆粒数 対照群に比して PDX マウスの腓腹筋では、LC3 陽性顆粒数が有意に高値を示す。

(3) 結語

本研究により、オートファジー初期構造の研究を加速するための CLEM 法を確立することができ、さらにマイトファジー研究への足掛かりを得た。また、創傷治癒や癌力ヘキシア病態といった臨床医学分野への応用を見据えることができた。今後、オートファジー研究における新発見や他分野との融合研究に繋がる成果と位置付けられる。

<引用文献>

- 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* 34: 1695-1706 (2014) 10.1128/MCB
- Yamashita SI, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, Yoshimori T, Sakai Y, Mihara K, Kanki T. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol* 215: 649-665 (2016) 10.1083/jcb.201605093
- Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci* 126: 5224-5238 (2013) 10.1242/jcs.132415

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9件)

Khambu B, Huda N, Chen X, Antoine DJ, Li Y, Dai G, Köhler UA, Zong WX, Waguri S, Werner S, Oury TD, Dong Z, Yin XM. HMGB1 promotes ductular reaction and tumorigenesis in autophagy-deficient livers. *J Clin Invest* (2018) 査読有 doi: 10.1172/JCI91814

Uemura T, Kametaka S, Waguri S. GGA2 interacts with EGFR cytoplasmic domain to stabilize the receptor expression and promote cell growth. *Sci Rep* (2018) 8:1368. 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-19542-4.

Asai E, Yamamoto M, Ueda K, Waguri S. Spatiotemporal alterations of autophagy marker LC3 in rat skin fibroblasts during wound healing process. *Fukushima J Med Sci* (2018) 64:15-22. 査読有 doi: 10.5387/fms.2016-13.

Annoh H, Dobashi Y, Tamura N, Uemura T, Waguri S. LC3-positive puncta increase in skeletal muscle of patient-derived xenograft mice. *J Phys Fit Sports Med* 67:99-105 (2018) 査読有 <https://doi.org/10.7600/jspfsm>

和栗聡「オートファジー微細形態学 メゾスケールレベルの克服」*実験医学* 35:2483-2490 (2017) 査読無

Dragich JM, Kuwajima T, Hirose-Ikeda M, Yoon MS, Eenjes E, Bosco JR, Fox LM, Lystad AH, Oo TF, Yarygina O, Mita T, Waguri S,

Ichimura Y, Komatsu M, Simonsen A, Burke RE, Mason CA, Yamamoto A. Autophagy linked FYVE (Alfy/WDFY3) is required for establishing neuronal connectivity in the mammalian brain. *Elife* (2016) 査読有 doi: 10.7554/eLife.14810.

Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, Komatsu M: p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun* (2016) 7, 査読有 doi 10.1038/ncomms 12030

Hirano S, Uemura T, Annoh H, Fujita N, Waguri S, Itoh T, Fukuda M : Differing susceptibility to autophagic degradation of two LC3-binding proteins: SQSTM1/p62 and TBC1D25/OATL1. *Autophagy* (2016) 12:312-326. 査読有 doi 10.108

Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Saito T, Narita I, Waguri S, Komatsu M : Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *J Cell Sci* (2015) 128:4453-4461. 査読有 doi 10.1242

[学会発表](計15件)

田村直輝、和栗聡 : 高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの分子メカニズムの解析 : 第123回日本解剖学会学術集会 : 2018年3月29日 武蔵野

荒井律子、和栗聡 : 鉄キレート剤 deferiprone 誘導マイトファジーにおける隔離膜形成過程の微細形態解析 : 第123回日本解剖学会総会全国学術集会 : 2018年3月28日 武蔵野

和栗聡、坂井俊介、田村直輝、小松雅明 : オートファジー関連遺伝子 Atg2 の生理機能解析 : 第123回日本解剖学会学術集会 2018年3月30日 武蔵野

和栗聡 : オートファジーの形態学 : 電顕と免疫組織 : 第33回 Wako ワークショップ : 2017年11月16日 東京 (招待講演)

和栗聡 : オートファジー研究の現状と皮膚科学における可能性 : 第81回日本皮膚科

学会東部支部学術大会：2017年9月23日：福島（招待講演）

荒井律子、和栗聡：哺乳類細胞オートファゴソーム形成過程における膜構造変化の解析：第63回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会：2017年9月9日 弘前

Satoshi Waguri: Ultrastructure of Autophagy by Electron Microscopy: The 25th International Symposia on Morphological Sciences: 2017年7月28日 Xi'an (招待講演)

和栗聡：オートファジー研究から小児成長を考える：第18回東北小児成長フォーラム：2017年7月14日 福島（招待講演）

Sakai S, Tamura N, Komatsu M, Waguri S: Phenotypic analysis of mice defective in Atg2A/B: 第69回日本細胞生物学会大会：2017年6月14日 仙台（招待講演）

田村直輝、和栗聡：浸透圧ストレス誘導性オートファジーの分子機構の解明：第69回日本細胞生物学会大会：2017年6月 仙台

田村直輝、和栗聡：オートファジー関連分子 WIPI-1、WIPI-2 の浸透圧ストレスへの関与：第62回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会：2016年9月3-4日 帯広

和栗聡：構造化照明法によるオートファジー隔離膜の超解像顕微鏡解析：2016年9月3-4日 三鷹（招待講演）

田村直輝、和栗聡：オートファジー関連分子 WIPI-1、WIPI-2 の浸透圧ストレスへの関与：第68回日本細胞生物学会大会 2016年6月15-17日 京都

植村武文、山本雅哉、安納弘道、小松雅明、和栗聡：オートファジー隔離膜の形成過程に関する新規細管集合体 第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2015年10月3-4日 枚方市

Eino A, Kageyama S, Uemura T, Anno H, Saito T, Narita I, Waguri S, Komatsu M: Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic action of Sqstm1 / p62 during autophagy and stress-conditions in living cells 第121回日本解剖学会総会全国学術集会 2016年3月27-30日 郡山市

〔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)
名古屋大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：10303950

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

田村 直輝 (TAMURA NAOKI)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70745992

安納 弘道 (ANNOH HIROMICHI)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80258392

荒井 律子 (ARAI RITSUKO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：10342742 (H28, 29年度のみ)

甲賀 大輔 (KOGA DAISUKE)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：1010760127 (H29年度のみ)

(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

牛木 辰雄 (USHIKI TATSUO)
新潟大学・医歯(薬)学総合研究科
・教授
研究者番号：40184999