

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840075

研究課題名(和文)オートファジーにおける膜創成の先端イメージング技術による解析

研究課題名(英文)Analysis on the autophagic membrane biogenesis using imaging tools

研究代表者

濱崎 万穂 (Hamasaki, Maho)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30455216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内大規模分解系で、飢餓時の生存維持や、細胞内浄化による発がん、神経変性疾患、生活習慣病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。その際に形成される膜オルガネラ、オートファゴソームの形成は小胞体・ミトコンドリア接触場で行われることを解明した。オートファゴソーム形成に関わる因子は多数同定されているが、更なる詳細を解析するために、光学顕微鏡、電子顕微鏡等のイメージング技術を駆使することで小胞体・ミトコンドリア接触場でも小胞体側でオートファゴソームの形成が起こる事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an one of the major degradation system in the cell, triggered under starved condition to survive and also involved in many different type of diseases such as cancer, neurodegenerative disease, life style disease and so on. When autophagy is induced, membrane structure called autophagosomes are formed and their formation takes place at ER-mitochondria contact sites. Many autophagy related genes are identified, however, still detail mechanism on how the membrane formation takes place is unknown. By using up-to-date imaging tools including light and electron microscopy, further characterization was performed.

研究分野：細胞生物

キーワード：オートファジー 分解 膜輸送 小胞体

1. 研究開始当初の背景

細胞内には大きく分けて二つの分解システムが存在する。その一つがオートファジーで、直径約1マイクロメートルの膜構造であるオートファゴソームを必要な時に形成する。その際に、オルガネラを含む細胞質を包み込み、アミノ酸や脂質をリサイクルする。オートファジーは飢餓に誘導されることが有名であるが、最近では様々な疾患(癌、神経変性疾患、バクテリア感染等)に関わっている事が報告され注目を集めている。オートファゴソーム形成は、既存のオルガネラと違い必要時に形成されるため、その膜形成機構に関心が高い。これまでに、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。現所属ラボでは、小胞体に局在を示す Atg14L たんぱく質のオートファゴソーム形成への関与が発見され(*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、乱立した状態であった。我々は更にあらたな3色同時動画撮影可能な顕微鏡を駆逐することでオートファゴソーム形成サイトが小胞体・ミトコンドリア接触場であることを突き止めた。二つのオルガネラが新たなオルガネラの作製に関与するというのは細胞生物学上非常に面白い発見となった。

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態解析が不可欠であるが、光学顕微鏡は多色ライブ等で動態を追えるメリットがある一方解像度の限界から解像能を得るのが難しい。電子顕微鏡では、高解像度は得られるが静止画像のみで立体情報にも乏しく、ダイナミックな膜動態の解明には不十分である。そこでそれぞれの利点を併せた解析を行うために、蛍光顕微鏡・電子顕微鏡相関法(CLEM)に3次元解析が可能な電子線トモグラフィー法を組み合わせ、AP膜形成場周辺の膜構造体の時間毎の変化の立体情報を高い解像度で得ることで、AP膜形成を詳細に解析する。CLEMについては申請者が2010年の渡独で取得した最新手法を用い、観察したい場所をナノスケールで特定し、そこを電子顕微鏡で高解像度3次元観察をする。それによってAP膜形成の初期過程において小胞体とミトコンドリアがどう関わっているのかを解明する。小胞体の形態がAP膜形成に重要なのかも調べ、Atgの変異体や酵母を用いて隔離膜前駆体の解析も行う。

また、Atgタンパク質は幾つかの相互作用グループに分けられ相互の関係性の解析

は盛んに行われているが、各々の機能の詳細等の膜動態にどのように関わるのかはあまりよく判っていない。そこでまず上記の3次元CLEM法を用いて、形成初期過程に関わるAtgが局在する場所をナノスケールで特定し、機能解明の手がかりを得る。またAtg中唯一の膜タンパク質でAP膜形成の初期に働くと思われるAtg9とStx17と結合してAP膜の形成の場に集まるAtg14L1に焦点を絞り、それらがAP膜形成初期過程で果たす役割の解析を行う。解析は分子生物学とイメージングを組み合わせるというが、AP膜形成場を構成する小胞体とミトコンドリアは極めてダイナミックに動くので申請者が開発した3色同時ライブイメージングが強力な武器となる。ちなみにそのようなイメージングは世界でもまだ珍しい。

最後に、形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位で、生化学的に分離することが可能なので、単離した分画をプロテオミクス解析を行い新たな形成に必要な因子を同定する。

3. 研究の方法

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(250 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、グリッドの状態を光顕観察を行う。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を3次元観察を行うことが可能となる。

オートファゴソームの形成場の解析は酵母細胞を用いても行う。酵母細胞では、プレオートファゴソームストラクチャー(PAS)と呼ばれる全てのオートファジー関連因子が集積する場所が液胞近傍に粒として存在することが知られているが、その構造体は解明されていない。そこで、CLEMを用い、PASを同定する。同定されたら、ヒエラルキーの上流に存在するオートファジー関連因子がPASのどこに存在するかなど詳細な解析を行う。

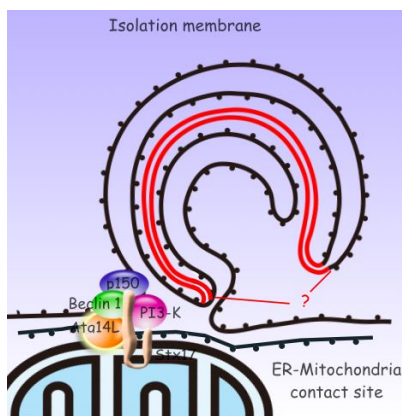
引き続き、去年立ち上げた3色同時動画観察も行う。オートファゴソーム膜形成関連因子と主に関与すると言われている小胞体、乱立の原因となったミトコンドリアの3因子を同時に可視下することで、AP膜形成時の2つのオルガネラの関与をタイムリーに観察する。3因子を同時に観察する意義は、一台

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。

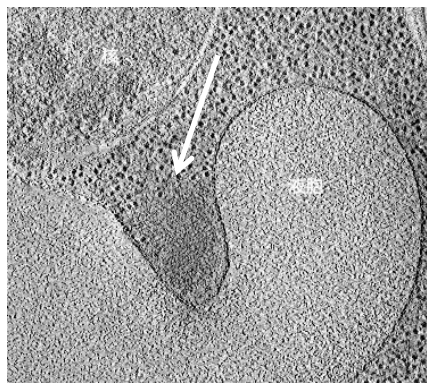
4. 研究成果

光学顕微鏡・電子顕微鏡両者の利点を組み合わせた CLEM 法を用いる事でオートファゴソーム形成場の解析を行った。オートファゴソーム形成初期に必要な因子、Atg14, Syn17 とオートファゴソーム形成中存在する因子、Atg5 を stable に発現させた細胞を用い、解析を行った。その結果、オートファゴソームは、小胞体・ミトコンドリア接触部位でも小



胞体側での観察がみられた。つまり、オートファゴソームの形成には小胞体が寄り添っていることが分かった。

酵母細胞を用いたオートファゴソーム初期構造である PAS の同定も CLEM 法を駆使すること



でみえてきた。液胞近傍にリボソームが排除されたグレーの構造体が見つかった。その近傍にはオートファゴソームの特徴の一つである 2 重膜が液胞側から伸びているのが観察できる時もある。現在、ヒエラルキーの中でも初期に形成しているといわれるオートファゴソーム形成因子がこの構造体のどこに存在しているか解析している。

3 色同時ライブセルイメージングをオートファゴソーム形成中存在する Atg5 と初期に必要なものとを組み合わせることで解析を行っている。中でも、オートファジー形成因子 30 以上ある中で唯一の膜たんぱく質である Atg9 と組み合わせる事でオートファゴソーム形成過程で割と初期から Atg9 の存在が明らかになってきた。また、形

成場でどのような挙動を示すのか、数値化する事も含めて解析中である。

小胞体・ミトコンドリア接触部位の生化学的単離の質をあげるために細胞破碎の方法や遠心の強度等を工夫することで改善してきた。完全ではないが、以前よりはより purity の高いものが単離できるようになってきたので、プロテオミクス解析に進める予定にしている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Sino-Japan Autophagy Symposium (口頭), 2013.10.15

蛋白質科学会 (口頭) 2014.6.25

電顕サマースクール (口頭), 2014.7.26

Andor Academy (口頭), 2014.8.1

生化学会 (口頭) 2014.10.16

分子生物学会 (口頭) 2014.11.25

Progress 100 Symposium:Kyushu-U and StanfordOU joint Research Program (口頭), 2015.3.17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱崎 万穂 (HAMASAKI MAHO)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30455216