

ナノレベル光・電子顕微鏡関連法による細胞機能の解明

大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝学教室
濱崎 万穂

1. はじめに 目的 背景

細胞内の大規模分解系として知られるオートファジーは、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近年非常に注目を集めている。真核細胞において保存されており、**栄養飢餓**により誘導される**細胞応答メカニズム**の一つで、細胞はオートファジーによって自身の細胞質構成成分を非選択的に取り囲み分解し、生存維持に必須の新たな糧を生み出すことで生き延びる。オートファジーが誘導されると、**隔離膜**という扁平な袋状の膜構造が細胞質に出現し、細胞質やオルガネラを囲みながら膜が伸長し、**オートファゴソーム(AP)**と呼ばれる2重膜構造体ができる。



90年代初頭にオートファジーに関与する一連のタンパク質群Atgが発見されたことで本格的開花したオートファジーの分野

は、我が国が世界をリードしており、現在様々な分野から注目を集めている。オートファジーを担うAP膜形成の仕組みは、Atgの作用機序を含め未だに謎が多い。特に、他のオルガネラと異なり必要に応じて初めて現れるAP膜がどこで形成され、また膜供給はどのように行われるのかは、細胞生物学の大きな謎のひとつである。私は、これまでに細胞内膜輸送系の関与に着目し、**小胞体からの輸送**がAP膜形成に必要なことを見いだしてきた(*MBC, 2001*)。現所属ラボで、小胞体に局在を示すAtg14L1タンパク質が発見され(*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*)。後者二つは、イメージング技術の向上により可能になった仕事で、解析の難しさからなかなか進んでこなかった形成サイトの解明は一気に進み始めた。今年、我々は、光学顕微鏡に3台のカメラを取り付けることで、3タンパク質の同時ライブ観察システムの立ち上げに成功し、**小胞体・ミトコンドリア接触サイト**がAP膜の形成場であることを見いだした(*Nature, 495:389-393, 2013*)。又、機能未知のSNAREタンパク質Stx17がAtg14Lと接触サイトに集まりAP膜形成に働くことも示した。役者と技術が揃ってきたことで、**AP膜形成初期過程の形態と分子両面からの解剖**が可能になった。

又、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みられない、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。この関連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。

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

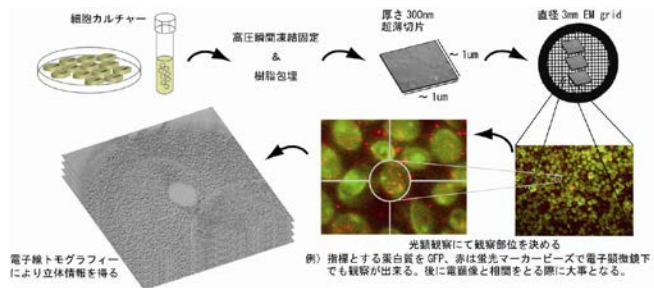
像度の限界から特に酵母では輝点以上の分解能を得るのが難しい。電顕での解析も早くから行われ、たんぱく質の局在等多くの情報は得られたものの、2次元での観察はダイナミックな膜動態の解明には一歩及ばない。3次元解析が可能になる電子線トモグラフィー法をとり入れ、AP膜形成場周辺の膜構造体の立体情報を高い解像度で得ることで、AP膜形成を解析する。3次元構造をもつオルガネラは2次元より3次元での観察のほうがより確かな情報を得られやすい。

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た。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。

2. 方法

主として、前々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で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を3次元観察を行うことが可能となる。

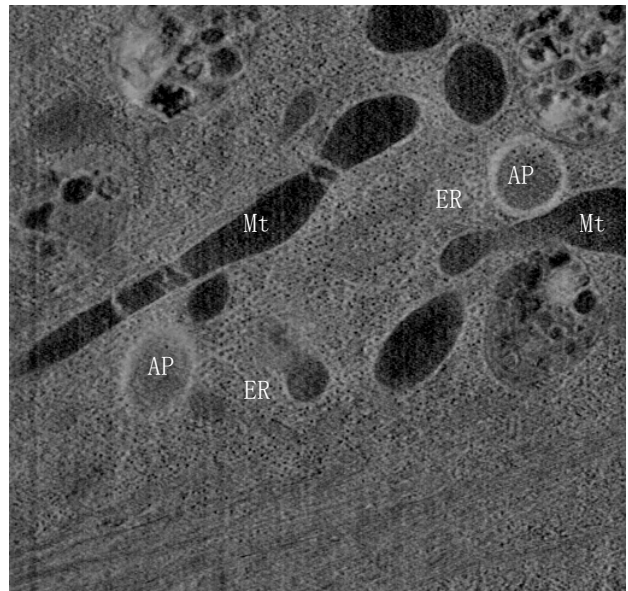


3. 結果 研究成果

最新手法である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 の構造がどのようなものか、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膜初期に働くたんぱく質を指標にし、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次元でないと見えてこなかった情報が取得され始めている。今後は、小胞体、ミトコンドリアとの位置関係、膜のつながり等を含め、より高倍にすることで形成サイトの詳細な解析を続けていく。

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課題なので、今後もこれまでの結果を踏まえ、観察を続ける。



4. 考察 まとめ

お陰様で、新しい技術の導入をこれまでの研究にアプライすることに成功し、まだ予備的ではあるもののこの技術の威力を感じられる結果ができており、今後の発展が楽しみである。

湿度に大きく左右されるため夏場のサンプル作りで散々失敗を繰り返し、機械のトラブルもありなかなか大変ではあった。ただでさえ時間のかかる方法であるから、この一年の経験を踏まえ、湿度の低い冬の間にどんどんサンプルを作り、今後もオートファゴソーム膜形成場の観察を続けていこうと思う。

一年間サポート下さりどうもありがとうございました。

5. 発表論文、参考文献

この技術を用いた結果を報告はできておりませんが、今年の発表論文は以下になります。

Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y and Yoshimori T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO*, published online 6 August 2013

Hamasaki M, Shibutani ST, Yoshimori T. Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25:1-6, 2013

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*, 495(7441), 389-93, 2013

Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y, Murakami Y, Maeda Y, Yoshimori T, Matsumoto S, Kobayashi K, Kinoshita T, Morita YS. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio*, 19:4(1), 2013