

## 電子線トモグラフィーによるオートファジーの解析 Electron Tomographic Analysis of Autophagosome Formation

西野一林 美都子  
Mitsuko Hayashi-Nishino  
大阪大学産業科学研究所

**要旨** オートファジーは、真核生物に普遍的に備わっている細胞内消化機構であり、様々な生理機構や病気の発症に関与している。オートファジーを担うオートファゴソームの膜の起源については、長年謎のままであった。筆者等は、オートファジーに重要な遺伝子を変異させた細胞では、膜が途中で成長を止め、その近くには常に小胞体が存在することを明らかにした。さらに、電子線トモグラフィーを用いて解析した結果、小胞体の一部から膜が延びてオートファゴソーム膜になっていることが明らかとなった。小胞体が抱かれてオートファゴソーム膜が成長していることから、小胞体が成長する膜の“ゆりかご”の役割も果たしていると考えられる。

**キーワード**：オートファジー、隔離膜、小胞体、電子線トモグラフィー

### 1. はじめに

オートファジーは、真核生物に普遍的に備わっている細胞内消化機構であり、様々な生理機構や病気の発症に関与している。オートファジーを担うオートファゴソームの膜の起源については、長年謎のままであった。筆者等は、電子線トモグラフィーを用いて、小胞体がオートファゴソーム膜の起源となっていることを明らかにした<sup>1)</sup>。本稿では、オートファゴソーム膜の起源に関する研究の背景を解説した後、筆者等が電子線トモグラフィーを用いて得た最近の研究成果を紹介する。

### 2. オートファゴソーム膜はどこから来るのか？

オートファジーは、真核生物に普遍的に備わっている細胞内消化機構であり、特に細胞が栄養飢餓の状態になった時に誘導され、自らの組織を分解して栄養源にする。オートファジー研究の歴史は古く、およそ半世紀前には電子顕微鏡下で観察されていた<sup>2)</sup>。さらに、1990年代に大隅良典博士（現・東京工業大学）らにより出芽酵母のオートファジー不能変異株群・ATGが同定されたのをきっかけに、分子レベルでの解析が飛躍的に進展した<sup>3)</sup>。多数のATG遺伝子群が酵母や動物細胞で同定されるとともにその分子機構が解明され、オートファジーは、栄養飢餓に対処するだけでなく、異常タンパク質や傷害を受けたオルガネラ、感染菌などを分解し、心不全、糖尿病、癌、アルツハイマー病など、生命の維持や

病気の発症に関与していることが明らかにされた<sup>4,5)</sup>。

しかしながら、分子生物学の進展にもかかわらず、オートファジーを担う膜の起源については、長年謎のままであった。オートファジーが起ると、まず、細胞質に隔離膜 (isolation membrane; IM) と呼ばれる2重膜構造をした膜区画が現れる。そして、隔離膜は細胞質やオルガネラを取り込みつつ進展し、最後にその先端が融合して直径約1  $\mu\text{m}$  のオートファゴソームが形成される。隔離膜の起源については、様々な説が提出されていた。第1は、既存の膜が変形して形成されるとする説で、小胞体説が有力であった<sup>6~8)</sup>。しかし、隔離膜にP-450などの小胞体膜タンパク質が検出されないことから、小胞体からそのまま隔離膜が形成される説は否定され<sup>9)</sup>、結果、第2の説として、膜成分が供給され新たに隔離膜が形成されるとする新生説が提唱されていた<sup>6,10)</sup>。

### 3. 隔離膜と小胞体の関係

筆者等は、培養細胞を栄養飢餓にし、電子顕微鏡下で隔離膜を観察した。その結果、隔離膜は粗面小胞体の近傍で形成されており、しばしば粗面小胞体に挟まれるようにして伸展していることを見いだした (図1A)<sup>1)</sup>。筆者等はこの構造を小胞体・隔離膜複合体 (ER-IM complex) と名づけた。NIH3T3細胞など線維芽細胞由来の細胞では、このER-IM complexがとくによく観察された。免疫電子顕微鏡法により、隔離膜のマーカーであるAtg16L1がER-IM complexの隔離膜に局在していることが確認された (図1B)<sup>1)</sup>。また、小胞体内腔酵素であるPDIは隔離膜を包む小胞体に局在する一方で、隔離膜には局在しなかった (図1B)。この結果は、これまでの報告と同様に、小胞体と隔離膜が同一の膜構造体でないことを示唆する<sup>9)</sup>。Atg4Bは、酵母Atg8ホモログであ

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1  
TEL: 06-6879-8546; FAX: 06-6879-8549  
E-mail: mnishino@sanken.osaka-u.ac.jp  
2010年2月12日受付

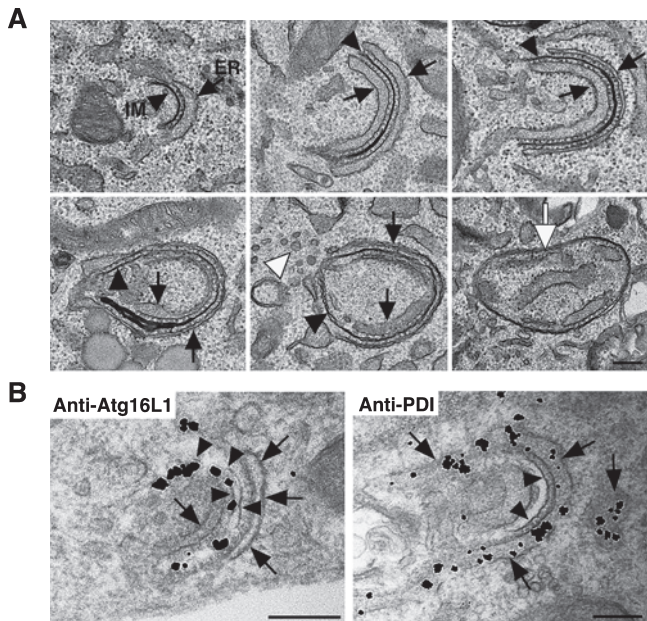


図1 ER-IM complex の電子顕微鏡像。(A) Atg4B<sup>C74A</sup> 発現 NIH3T3 細胞に蓄積した ER-IM complex. 矢頭は隔離膜 (IM), 矢印は粗面小胞体 (ER) を示す。隔離膜が粗面小胞体に挟まれて伸展している様子がわかる。白矢印は完成したオートファゴソーム, 白矢頭は VTC を示す。(B) ER-IM complex の免疫電子顕微鏡。ATG16L1 は隔離膜 (矢頭) に局在し, 小胞体 (矢印) には見られない。一方 PDI は小胞体内腔に検出されるが, 隔離膜には見られない。Bars = 200 nm. 文献 1 より転載。

る LC3 の C 末端アミノ酸残基を切断するシステインプロテアーゼであり, その結果生じた LC3-I の一部がさらに修飾を受け LC3-II となり, オートファゴソーム膜に結合する<sup>11)</sup>。Atg4B の変異体 (Atg4B<sup>C74A</sup>) を過剰発現させると, LC3 のプロセッシングが阻害される結果, 隔離膜の先端が融合してオートファゴソームが形成される過程が阻害され, 隔離膜 (口のあいたオートファゴソーム) が蓄積する (図 1A)<sup>11)</sup>。Atg4B<sup>C74A</sup> 発現 NIH3T3 細胞では, ER-IM complex の割合が顕著に増加したことから, ER-IM complex 形成は, オートファゴソーム形成の初期過程に重要な意味を持つと考えられた<sup>1)</sup>。オートファゴソームが完成すると ER-IM complex は分離した (図 1A, 白矢印)。

#### 4. 電子線トモグラフィーによる 3 次元的解析

ER-IM complex が小胞体サブドメインから生じているのか, それとも独立した構造体であるのか, 隔離膜は小胞体から生じているのかが重要な問題となった。通常の電子顕微鏡観察では, 深さ方向 (Z 軸) において高い解像度が得られず, これらについて明確な結論は見いだせなかった。そこで, 筆者等は, 電子線トモグラフィーを用いて解析することにした。電子線トモグラフィーは電子顕微鏡像について CT (コンピュータトモグラフィー) を行う技術であり, 数 nm の高い解像度で細胞内膜構造の 3 次元像を得ることができる<sup>12)</sup>。これまでに, ゴルジ体や小胞体, シナプス小胞など, 様々な

オルガネラの 3 次元的解析がされ, これらの空間的關係やダイナミズムが明らかにされた<sup>13,14)</sup>。

筆者等は, 栄養飢餓にした NIH3T3 細胞から 200 nm または 1 μm 厚さの切片を作成し, 試料傾斜装置を装着した電子顕微鏡 (加速電圧 120 kV, 200 kV, 2000 kV のいずれか) を用い, 切片を ±60 度の範囲で傾斜させ連続傾斜像を取得した<sup>1)</sup>。その後, 像欠落を補うため, 垂直方向に試料を回転させ, 同様の作業を行い, 2 軸方向での連続傾斜像を取得した<sup>15)</sup>。コンピュータ演算により断層像を構築し, 最後に, 小胞体や隔離膜など, 解析対象のオルガネラの輪郭抽出を行い, 3 次元像を再構築した<sup>16)</sup>。

図 2 で 3 つの異なる ER-IM complex の 3 次元構築像を示した (A-C)。3 枚の 200 nm 厚さの連続切片から 3 次元構築した結果, 小胞体 (青色) サブドメインが ER-IM complex を形成していることが明らかとなった (図 2A)<sup>1)</sup>。小胞体サブドメインが湾曲してゆりかご状の構造を作り, 隔離膜 (黄色) はその “ゆりかご” に抱かれるようにして伸展していた (図 2A)。また, ER-IM complex の近傍にはしばしば小胞体から生じる VTC (vesicular tubular clusters; 白色) が観察された。さらに, 1 μm 厚さの切片から構築した 3 次元像より, 隔離膜が 2 枚の小胞体 (青色, 赤色) に挟まれて伸展していることが示唆された (図 2B)。

#### 5. 隔離膜と小胞体は繋がっている

次に, 筆者等は ER-IM complex の隔離膜と小胞体が連続しているか否かについて検討した。その結果, 図 2C-E で示す ER-IM complex の 3 次元像において, 隔離膜と小胞体が細い管状の膜 (赤矢頭) を介してつながっていることが明らかになった。8 個の ER-IM complex を解析した結果, 5 個で小胞体と隔離膜の連結がみられた<sup>1)</sup>。興味深いことに, 小胞体と隔離膜の連結が 2 個以上のものは見られなかった。隔離膜と小胞体の連続性については, 筆者等の報告とほぼ同時に Eskelinen らのグループによってもされている<sup>17)</sup>。

#### 6. おわりに

本研究により, 筆者等はオートファゴソーム形成初期の構造 (ER-IM complex) について, その形態学的詳細を明らかにした。今回得られた結果はオートファゴソーム膜が小胞体以外のオルガネラにも起源する可能性を完全に排除するものではないが, 筆者等はオートファゴソーム形成について第 3 のモデルを提示した (図 2F)<sup>1)</sup>。すなわち, 隔離膜は, 第 1 の説のように小胞体からそのまま作られるのではなく, 第 2 の説のように小胞体から全く独立して作られるのではなく, 小胞体からリン脂質等の膜材料が連続した膜として供給され, そこに小胞体とは異なるタンパク質が付加されて新しい膜として形成されると考えられる (step 1)。そして, 隔離膜は小胞体に包まれ, または挟まれて伸展し (step 2), 最後に, その先端が融合しオートファゴソームが完成すると考えられる (step 3)。



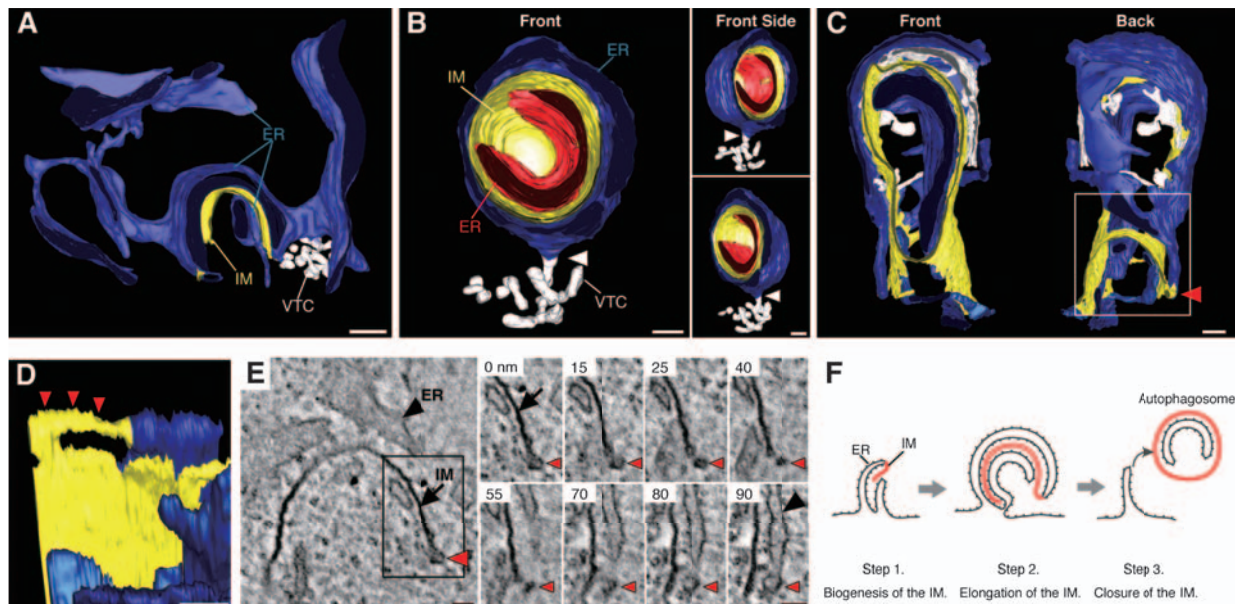


図2 電子線トモグラフィーにより再構築したER-IM complexの3次元像。(A) 120 kV加速電圧の透過型電子顕微鏡(H-7600, 日立)を用い, 3枚の200 nm厚の連続切片から3次元構築したER-IM complex. 小胞体(青色)のサブドメインが隔離膜(黄色)のゆりかごとなっている。隔離膜の近傍にVTC(白色)が観察される。(B) 1 μm厚の切片を, 超高压電子顕微鏡(H-3000, 日立)を用い加速電圧2000 kVで撮影した。隔離膜をはさんで, 小胞体が外側(青色)と内側(赤色)に存在する。(C-E) 小胞体と隔離膜のコネクション。200 kV加速電圧の透過型電子顕微鏡(JEM-2100, 日本電子)を用い, 2枚の200 nm厚の連続切片から再構築した。細管状の膜(赤矢頭)で小胞体膜(青色)と隔離膜(黄色)がつながっている。DはCの白棒部分を拡大し, 異なるオリエンテーションで示した。EはCの白棒部分の断層像。数字は断層像の深さを示す。(F) オートファゴソーム形成モデル。Bars = 200 nm (A), 100 nm (B) and (C), 50 nm (D) and (E)。文献1より転載。

## 謝 辞

長浜バイオ大学の山本章嗣教授, 大阪大学の吉森保教授をはじめとする共同研究者の皆様と, 電子線トモグラフィーの撮影でお世話になった大阪大学・超高压電子顕微鏡センターの梶村直子氏, 日本電子株式会社の西岡秀夫氏に深くお礼申し上げます。

## 文 献

- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. and Yamamoto, A.: *Nat. Cell Biol.*, 11, 1433–1437 (2009)
- De Duve, C. and Wattiaux, R.: *Annu. Rev. Physiol.*, 28, 435–492 (1966)
- Suzuki, K. and Ohsumi, Y.: *FEBS Lett.*, 581, 2156–2161 (2007)
- Yoshimori, T. and Noda, T.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 401–407 (2008)
- Mizushima, N.: *Genes Dev.*, 21, 2861–2873 (2007)
- Juhasz, G. and Neufeld, T.P.: *PLoS Biol.*, 4, e36 (2006)
- Dunn, W.A., Jr.: *Trends Cell Biol.*, 4, 139–143 (1994)
- Furuno, K., Ishikawa, T., Akasaki, K., Lee, S., Nishimura, Y., Tsuji, H., Himeno, M. and Kato, K.: *Exp. Cell Res.*, 189, 261–268 (1990)
- Yamamoto, A., Masaki, R., Fukui, Y. and Tashiro, Y.: *J. Histochem. Cytochem.*, 38, 1571–1581 (1990)
- Kovacs, A.L., Palfia, Z., Rez, G., Vellai, T. and Kovacs, J.: *Autophagy*, 3, 655–662 (2007)
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T. and Yoshimori T.: *Mol. Biol. Cell*, 19, 4651–4659 (2008)
- McIntosh, R., Nicastro, D. and Mastronarde, D.: *Trends Cell Biol.*, 15, 43–51 (2005)
- Marsh, B.J., Mastronarde, D.N., Buttle, K.F., Howell, K.E. and McIntosh, J.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2399–2406 (2001)
- Hayashi, M., Raimondi, A., O’Toole, E., Paradise, S., Collesi, C., Cremona, O., Ferguson, S.M. and De Camilli, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2175–2180 (2008)
- Mastronarde, D.N.: *J. Struct. Biol.*, 120, 343–352 (1997)
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71–76 (1996)
- Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Eskelinen, E.L.: *Autophagy*, 5, 1180–1185 (2009)