

人工ビーズを用いてオートファジーを視る

Artificial Induction of Autophagy around Polystyrene Microbeads

小林昇平, 原口徳子

Shouhei Kobayashi and Tokuko Haraguchi

(独)情報通信研究機構神戸研究所未来ICT研究センター

要旨 オートファジーが起こる瞬間を顕微鏡で捉えるのはかなり難しい。それが細胞内のいつどこで起こるか分からないからである。我々は、その問題を解決する方法として、細胞内に入れたプラスチックビーズを用いて、その周辺にオートファジーを誘導する方法を確立した。生きた細胞に導入したビーズを、蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察することによって、オートファジーの開始から完了までのダイナミックな過程を追跡することが可能になった。蛍光観察した同じビーズを電子顕微鏡観察することで、オートファゴソーム形成に特徴的な膜構造を見分けることも可能である。本稿では、細胞内に導入した人工ビーズを用いてオートファジーを視る方法として、生細胞蛍光顕微鏡と電子顕微鏡法とを組み合わせた Live CLEM 法を紹介すると共に、この方法を使って新たに分かってきたオートファジーの過程について解説する。

キーワード：蛍光顕微鏡法、電子顕微鏡法、live CLEM 法、ポリスチレンビーズ、オートファジー

1. はじめに

オートファジー（マクロオートファジー）は、細胞質における隔離膜の出現と伸長、オートファゴソーム形成、リソソームとの融合によるオートリソソーム形成といった、複雑な一連の出来事によって特徴づけられる。この一連の出来事に伴って、膜構造はダイナミックに変化していく。しかも、このような反応は、細胞内の1箇所に限定されているわけではなく、様々な場所で独立に（同時ではない時間に）起こる（図1¹⁾。いつどこで起こるか分からない、このような現象を顕微鏡で捉えるためには、視るべき目標ポイントを人工的に設定できると都合がよい。また、ダイナミックな構造変化を生きた細胞で捉えておいて、「今だ」と思う瞬間の局所的な膜構造を調べることができたら、オートファジーの理解に有用な方法となると考えられる。このような考えに基づき、我々は、細胞内に人工的ビーズを導入することによって、その周辺でオートファジーを誘導できる方法を確立した。さらに、この方法で誘導したオートファジーを、live CLEM 法で観察することによって、オートファジーで起こる現象を可視化することに成功した。Live CLEM 法は、生きた細胞で目的の細胞の特定の分子を蛍光観察した後に、同じ細胞を電子顕微鏡観察する方法である。これらの方法を使ったオートファジー解析法を紹介し、そこから得られた結果を解説する。

2. Live CLEM 法

Correlative light and electron microscopy (CLEM) とは、蛍光顕微鏡で観察したのと同じ場所を電子顕微鏡で観察し、2つの方法から得られた観察画像を比較し相関をとることで分子特異的な局在を解析する方法である。蛍光観察法と電子顕微鏡法の組み合わせ方や、用いるプローブの種類などによって、様々な CLEM が開発されている²⁾。このうち、生細胞蛍光観察と組み合わせた CLEM を、筆者らは Correlative light and electron microscopy after live cell imaging (live CLEM 法) と呼んでいる³⁾。Live CLEM 法では、特定の目的分子に対して生細胞蛍光観察を行った後、望みのタイミングで細胞を化学固定し、細胞内の微細構造を電子顕微鏡で観察する（図2a, (1)~(3)）。その後、一揃いの光学切片像と電子顕微鏡像とを比較して、蛍光像と電子顕微鏡像の対応付けを行う（図2a, (4)）。この対応付けを実現するための手段として、筆者らは番地付きガラスボトムディッシュを用いている（図2b）。サンプル固定後、樹脂の入ったカップを倒立させて置き、そのまま樹脂を重合させる（図2c；矢印）。重合後、樹脂をカップごとガラスボトムディッシュから剥がすことで、細胞と共に、番地情報を芋版の要領で樹脂側へ写し取ることができる（図2d；矢印）。

Live CLEM の利点は、1) 静的な情報である電子顕微鏡像を解釈する際に、そこに至るまでの時間経過という動的な情報を付与できること、2) 膜透過処理を行わないため、蛍光標識した特定分子の局在と細胞構造との関係をより正確に把握することができることである。次節では、live CLEM 法の

TEL: 078-969-2241; FAX: 078-969-2249

E-mail: tokuko@nict.go.jp

2010年3月2日受付

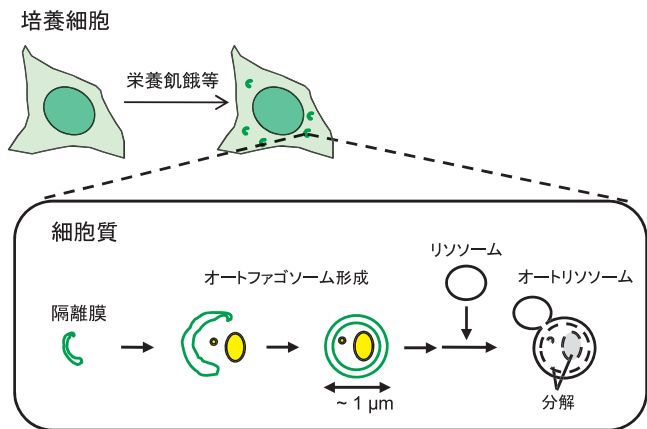


図1 マクロオートファジーの概要。詳細は本文参照。

このような利点を活かして、非貪食細胞である HeLa 細胞にプラスチックビーズ（以下、ビーズ）を取り込ませた際にビーズ周囲で起こる現象を解析した結果を示す。

3. 非貪食細胞へのビーズ導入とオートファジー誘導

哺乳類細胞におけるオートファゴソーム形成の解析は、栄養飢餓誘導時における LC3（オートファゴソームマーカー）⁴⁾ の蓄積（※英語でいう「puncta」の増加）を指標に行われてきた（図 3a, (1)）。しかし、オートファゴソーム形成が細胞質のどこで始まるかを予測することは難しく、また、形成されたオートファゴソームは細胞内を移動して最終的にリソソームと融合してしまうため、単一のオートファゴソームの

誕生から終焉までの運命を経時観察することは困難であった。これらの問題を解決する手段として、筆者らは、GFP-LC3 を安定発現する HeLa 細胞に非分解性のビーズを導入し、その周囲に人為的にオートファゴソーム形成を誘導する方法を開発した（図 3a, (2)）⁵⁾。その方法を述べると、まず、カチオン性脂質を含む市販のトランスフェクション試薬（Effectene など）をビーズ表面にまぶし（単に両者を混ぜる）、次に、それを細胞に振りかけて 1～3 時間程度培養する。この方法を使うと、直径 1 μm 以上の大きさのビーズでも、エンドサイトーシスによって HeLa 細胞内に入れることができる。また、ビーズを振りかけてから 3 時間後には、細胞内に入ったビーズのうち約 50% が GFP-LC3 陽性となった。この LC3 陽性ビーズでは、10 分間程度で GFP-LC3 がビーズ全体を包み込むのが観察された。この時間は、これまでに報告されているオートファゴソーム形成時間⁶⁾と一致している。このことから、ビーズ周囲で起こった GFP-LC3 の集積は、オートファゴソーム形成を視ているものと考えられた（図 3b）。そのことを確かめるために、GFP-LC3 陽性ビーズに対して、live CLEM 法を用いて膜構造を検討したところ、GFP-LC3 の蛍光と対応する位置に、オートファジーに典型的な膜構造が観察された（図 3c）。これらの解析によって、ビーズ周囲への GFP-LC3 の集積は、単に GFP-LC3 自身がビーズ周囲で凝集しているのではなく、オートファゴソーム形成を反映していることを明らかにすることができた。この方法では、観察対象領域をビーズ周囲に限定することができるため、蛍光観察であっても電子顕微鏡観察であっても、そこだけを見る

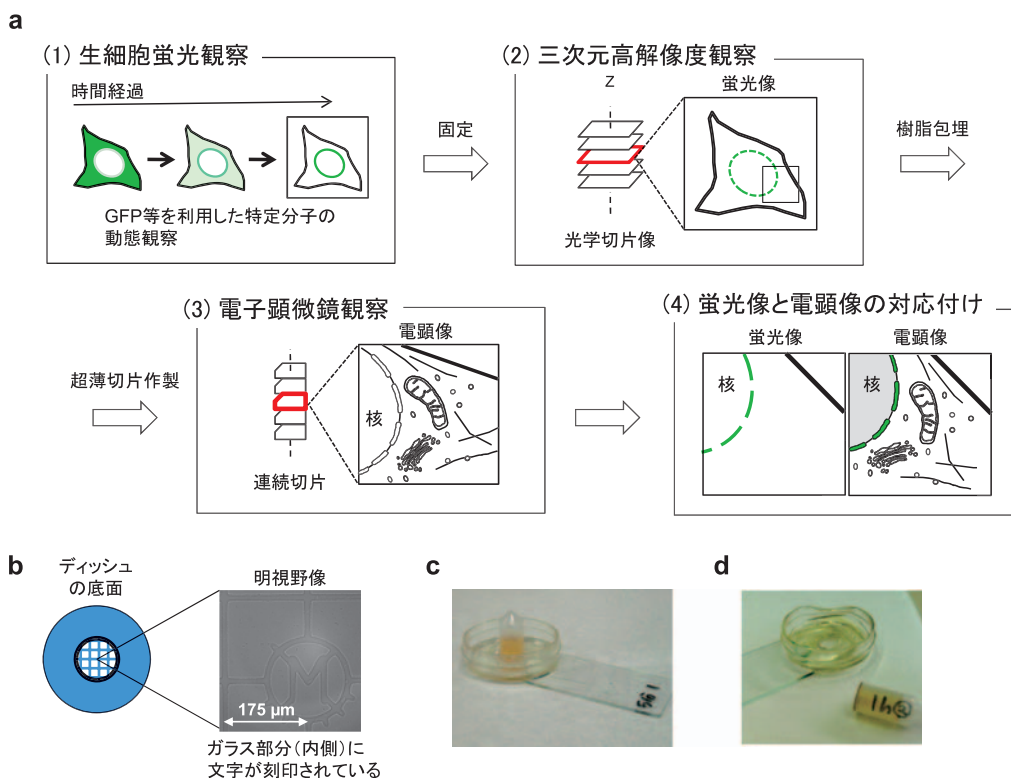


図2 Correlative light and electron microscopy after live cell imaging (live CLEM) の概要。詳細は本文参照。

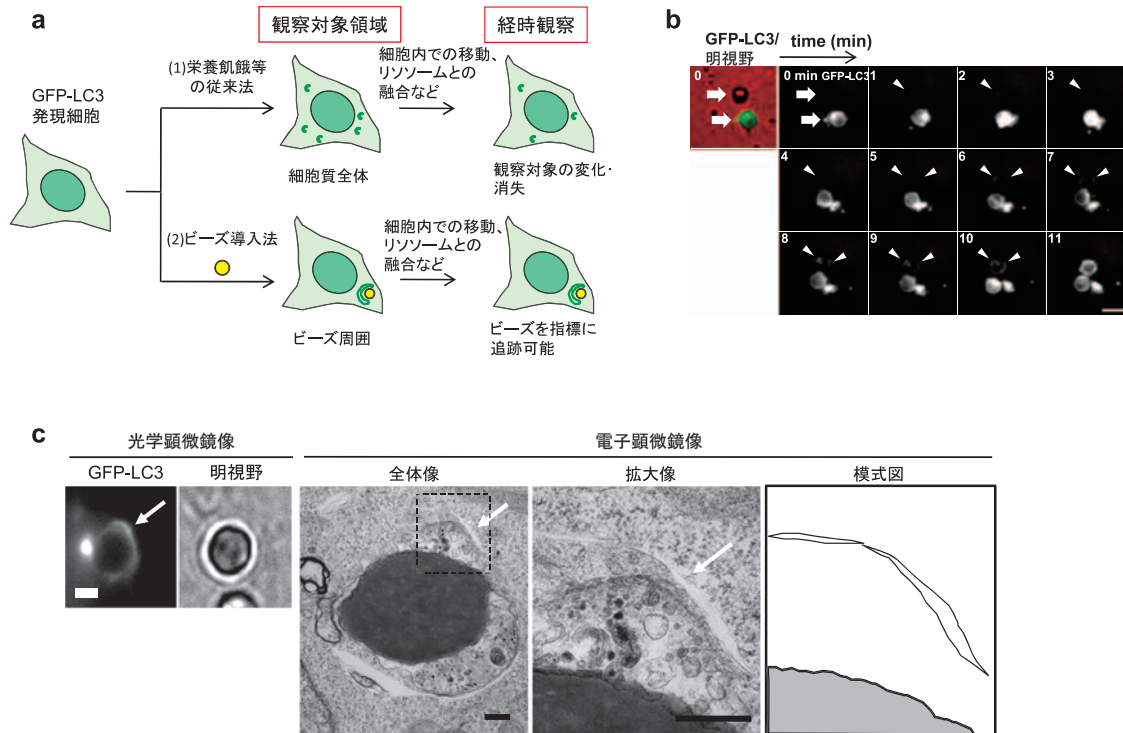


図3 人工ビーズを用いたオートファジー誘導法.

a. ビーズを用いたオートファジー誘導法の利点. 従来法 (上段) の場合, 細胞質のどこにいつ隔離膜が形成されはじめるかわからず (観察対象領域が不特定), 時間と共に観察対象が変化 (場合によっては消失) してしまうため経時間観察が困難である. 一方, 非分解性のビーズを用いる方法 (下段) では, 観察対象領域をビーズ周囲に限定し, 単一のオートファゴソームの運命を経時観察できる. b. HeLa/GFP-LC3 細胞に導入した NH_2 -ビーズ (直径 $3 \mu\text{m}$) の周囲における GFP-LC3 のタイムラプス観察像. 細胞にビーズを振りかけてから 1 時間 25 分が経過した時点 (時間ゼロ (0 min)) とし, そこからの観察像を示す. 2 つあるビーズ (白矢印) のうち, 下側のビーズは観察開始時点ですでに GFP-LC3 陽性である. 一方, 上側のビーズは時間経過とともに周囲に GFP-LC3 のシグナルが集積していくことがわかる (矢尻). スケールバーは $5 \mu\text{m}$. c. HeLa/GFP-LC3 細胞に導入した NH_2 -ビーズ (直径 $3 \mu\text{m}$) の live CLEM 像. 生きた細胞で GFP-LC3 の蛍光を経時観察し, ビーズが GFP-LC3 陽性となったことを確認してから細胞を化学固定し, そのビーズを光学顕微鏡 (蛍光像と明視野像) および電子顕微鏡の両方で順次観察した結果を示した. 矢印は, GFP-LC3 の蛍光像と電子顕微鏡像が一致する細胞構造を示している. スケールバーは $2 \mu\text{m}$ (光学顕微鏡像) および 500nm (電子顕微鏡像).

ことによって, オートファジーの時間変化と細胞構造を明らかにすることができる.

4. 蛍光発色性 pH センサーを用いたビーズ表面の pH 測定 ~ビーズのエンドソーム脱出とリソソームへの輸送の観察~

次に筆者らは, オートファジーによる個々のビーズの捕捉が, いつ, 何をきっかけにして始まるかを live CLEM 法で検討した. ビーズは, 先に述べたように, エンドサイトーシスによって細胞内に入る. 一般に, エンドサイトーシスによる物質取り込み過程では, エンドソーム内の pH は, 時間と共に徐々に酸性化するとされている. そこで, ビーズ周囲の pH 環境を調べることににより, ビーズが酸性エンドソーム内に存在するかどうかを知ることができる. その目的のために, pH 応答性の蛍光色素 “pHrodo” を用いた. この色素は, 中性環境下ではほぼ無蛍光であるが, 酸性環境下では, その酸性度につれて強い赤色蛍光を発するようになる⁷⁾. この色素を結合させたビーズ (pHrodo ビーズ) を, GFP-LC3 を安

定発現する HeLa 細胞に取り込ませることで, オートファジーが起こる前後のビーズ周囲の pH 環境が酸性か否かを測定した (図 4). pHrodo および GFP-LC3 の蛍光タイムラプス観察の結果, まずビーズ周囲に pHrodo の蛍光シグナルが検出され始め, その強度は時間の経過と共に増加した (図 4a, ~9 min). これは, ビーズが存在するエンドソーム内の pH が徐々に酸性化していること, すなわち酸性エンドソーム内に存在することを意味する. 同一ビーズの電子顕微鏡観察でも, 酸性ビーズは膜に覆われており, エンドソーム内に存在することが明らかである (図 4b, ビーズ 1). 酸性ビーズの蛍光観察を続けると, pHrodo の蛍光は短時間で急激に減少 (消失) した (図 4a, 9 ~ 12 min). このビーズを電子顕微鏡観察すると, 取り囲んでいる膜の一部が破れていることが観察できた (図 4b, ビーズ 2). この結果は, エンドソーム膜が破れてビーズが細胞質に露出し pH が急速に中性化したことを示している. 一方, GFP-LC3 の蛍光シグナルは, pHrodo のシグナルが消失した後に, ビーズ周囲に集積し始めることがわかった (図 4a, 12 min ~). pHrodo の蛍光の

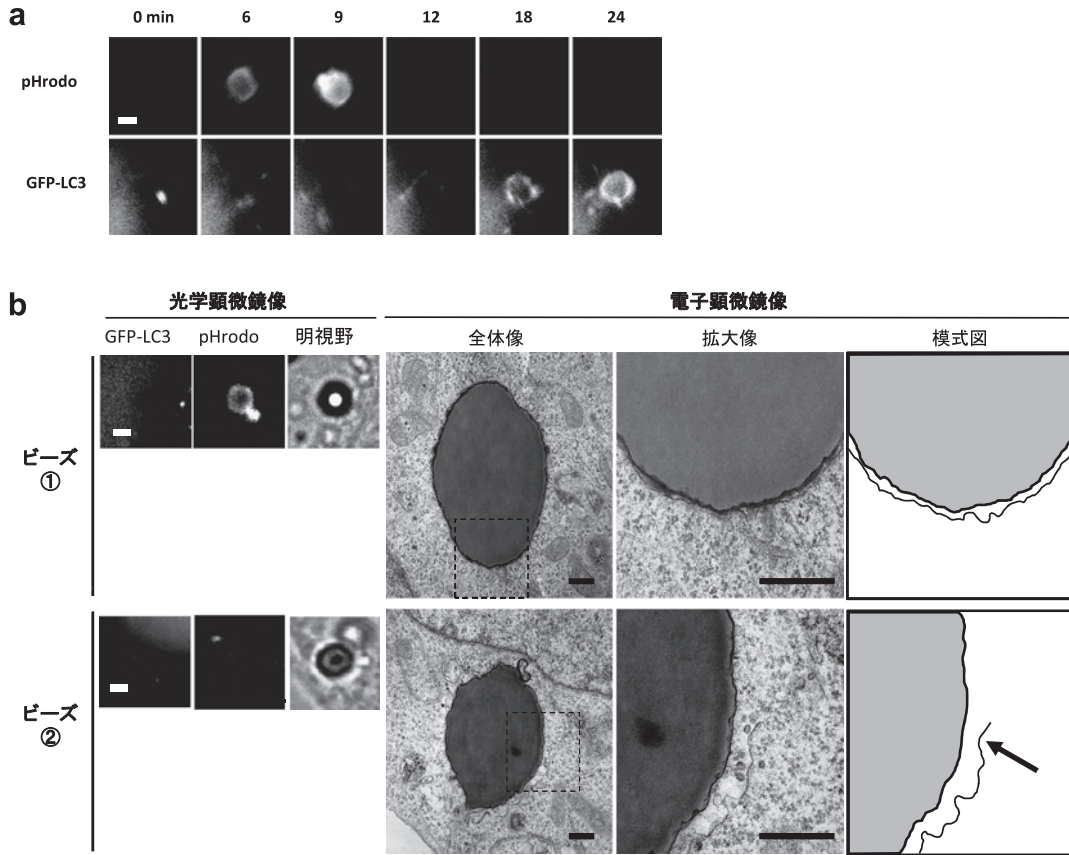


図4 Live CLEM法によるpHビーズのエンドソーム脱出過程の可視化。

a. HeLa/GFP-LC3に導入したpHrodoビーズの周囲におけるpHrodoおよびGFP-LC3のタイムラプス観察像。細胞にビーズを振りかけてから1時間25分が経過した時点(0 min)とし、そこから観察像を示す。スケールバーは2 μm 。b. Live CLEM像。pHrodoの蛍光が観察されている状態で固定液を添加したサンプル(ビーズ①)、pHrodoの蛍光が消失した直後に固定液を添加したサンプル(ビーズ②)の観察像を示す。スケールバーは2 μm (光学顕微鏡像)および500 nm(電子顕微鏡像)。(文献ref. 3の図4を一部改変して掲載。)

消失からGFP-LC3の蛍光の集積開始までのタイムラグは、 $5.0 \pm 2.6 \text{ min}$ ($n = 19$)であった。GFP-LC3陽性に転じたビーズを電子顕微鏡観察したところ、オートファジー膜が近接しているのが観察された。これらの結果は、ビーズが酸性エンドソームを脱出した後に、オートファジーによって認識され、捕捉されていることを明確に示すものである。

オートファジーに捕捉されたビーズが、その後、リソソームへと運ばれるかどうかについても同様の方法で解析した。その結果、pHrodoの蛍光の消失およびGFP-LC3シグナルの集積を経たビーズの周囲に、再びpHrodoの蛍光シグナルが回復する様子が観察された(図5a)。そのビーズを電子顕微鏡観察したところ、ビーズは細胞内成分の分解産物と思われる物質と共に、一重膜で覆われた小胞内に存在していた(図5b)。この結果は、オートファジーに捕捉されたビーズが、その後、リソソームへと運ばれたことを示している。従来まで、膜のトポロジーを調べる方法として、細胞膜は壊すが小胞体などの内部膜系は壊さないような界面活性剤(ジギトニンなど)を利用した方法が使われてきたが、今回筆者らが開発した手法では、生細胞内で時間変化を伴ってダイナミックに起こる現象をより直接的に可視化することが可能である。

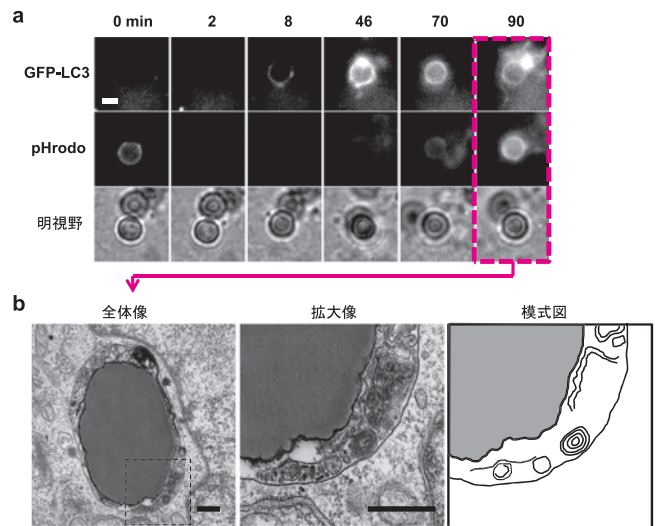


図5 pHビーズを用いた単一オートファゴソームの経時観察。a. HeLa/GFP-LC3に導入したpHrodoビーズの周囲におけるpHrodoおよびGFP-LC3のタイムラプス観察像。図3aと同様の方法で、より長時間観察を行った結果を示す。スケールバーは2 μm 。b. aの90 minの時点で細胞を固定し、ビーズ周囲を電子顕微鏡下で観察した結果。スケールバーはいずれも500 nm。(文献ref. 3の図5を一部改変して掲載。)

5. おわりに

細胞内に入れた人工ビーズがオートファジーを誘導することを、live CLEM法を使うことによって明らかにした。人工ビーズとlive CLEM法を併用することにより、目的の膜構造を高い分解能で観察するだけでなく、時間変化を伴って起こる細胞内の出来事を秒～分程度の時間分解能で解析できる。ビーズの大きさや表面修飾は自在に変更できるので、ある大きさのバクテリアや異物が細胞内へ侵入・感染する時の細胞応答を調べる目的にも有用と思われる。また、pH環境変化に耐性を持つ新しい蛍光プローブの開発や、蛍光像と電子顕微鏡像とをより正確に対応させる手法の開発などが進むことにより、光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡単独では観察が難しかった新たなオートファジー像が見えてくると思われる。

- 1) Mizushima, N.: *Genes Dev.*, **21**, 2861–2873 (2007)
- 2) Sosinsky, G.E., Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Gaietta, G.M. and Ellisman, M.H.: *Methods Cell Biol.*, **79**, 575–591 (2007)
- 3) Haraguchi, T., Kojidani, T., Koujin, T., Shimi, T., Osakada, H., Mori, C., Yamamoto, A. and Hiraoka, Y.: *J. Cell Sci.*, **121**, 2540–2554 (2008)
- 4) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.: *EMBO J.*, **19**, 5720–5728 (2000)
- 5) Kobayashi, S., Kojidani, T., Osakada, H., Yamamoto, A., Yoshimori, T., Hiraoka, Y. and Haraguchi, T.: *Autophagy*, **6**, 36–45 (2010)
- 6) Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., *et al.*: Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, **152**, 657–668 (2001)
- 7) Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K.G. and Wang, P.: A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J. Immunol. Methods*, **342**, 71–77 (2009)