

酵母のオートファジーと電子顕微鏡

Autophagy in Yeast and Electron Microscopy

馬 場 美 鈴
Misuzu Baba

工学院大学総合研究所

要 旨 2016年10月3日、ノーベル生理学・医学賞が発表された。大隅先生の長年の研究である“オートファジーの仕組みの解明”に対してである。オートファジーとは、自己の細胞質構成成分の一部を液胞/ライソゾームへ取り込んで分解する経路のことである。大規模な分解系であることから、ミトコンドリアなどのオルガネラもこの系によって分解することができる。この解説では、オートファジー研究の初期において、電子顕微鏡がどのようにして関わるようになったのか、どのような方向性を導き出したのかについて紹介する。

キーワード：オートファジー、オートファゴソーム、酵母、液胞、電子顕微鏡

1. はじめに

2016年10月3日、3年続いたノーベル賞の快挙に日本中が興奮した。“オートファジーの仕組みの解明”に対する、生理学・医学賞の決定である(図1)。この解説記事の冒頭から不穏な発言であるが、ノーベル委員会から世界中に発信された発表が、実は、電顕の重要な知見を誤って解釈しているために、筆者はここで訂正して、正しく発信しておこうと思う。受賞発表のpress releaseの中に図2の画像が掲載された。図2aの説明は、酵母のcontrolの細胞となっている。しかし、この細胞は、飢餓におかれて3時間後の細胞である。1994年の論文¹⁾に掲載された画像をノーベル委員会は借用した。また、図2bの電子顕微鏡の画像の説明は、栄養飢餓においてオートファゴソームが液胞の中に蓄積すると説明されている。オートファゴソームとは、オートファジーが誘導された時に、細胞質に新たに形成される二重膜構造体であり、図2aの液胞の横に見られる。液胞の中の構造体は、オートファジックボディ(自食体)と呼んでおり、一重膜の構造体である。筆者としてはとても残念に思う。これらの画像は、今回、多くのメディアや法人、様々な場面で取り上げられた。撮影されたのは、1989年9月21日である。

2. 背景

1988年、大隅先生は、東京大学教養学部の駒場キャンパスに研究室を持たれた。一つの部屋を半分に仕切り、他の先生とお二人で、ともに居室兼実験室として使われていた。当初、その実験室はガランとしていて、唯一の装置が、今回の

先生のご講演の中で、何度も述べられている位相差顕微鏡である。先生はよくその顕微鏡で、細胞を観察しておられた。この研究のスタートはまさに先生お一人であり、電顕観察を筆者が引き受け、すぐ後に、ポスドクが一名加わっただけのとても小さな規模の研究体制であった。

1980年代当時、酵母細胞を栄養源の豊富な培地から窒素源のない孢子形成培地に移すと、細胞内の全タンパク質の大半が分解される大規模なタンパク質分解が誘導されることが報告されていた²⁾。液胞内のプロテアーゼ活性が急上昇すること、液胞内の主要なタンパク質分解酵素の欠損細胞では、その分解が抑制されることから、大規模なタンパク質分解反応に液胞が関与していることが示唆されていたが、どのようなメカニズムで分解が行われているのかについては全く解明さ

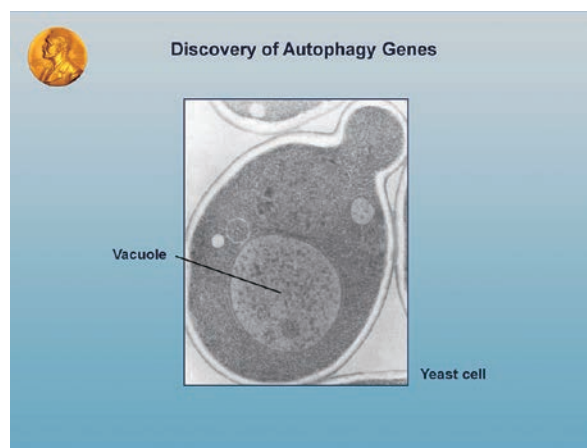


図1 2016年10月3日、ノーベル委員会によるノーベル賞受賞者発表記者会見において使用された像。J. Cell Biol. Baba et al. (1994)の論文に掲載された写真より使用された。炭素源の栄養飢餓において3時間後の像である。Copyright: The Nobel Committee for Physiology or Medicine. Illustrator: Mattias Karlén.

〒192-0015 東京都八王子市中野町 2665-1
TEL: 042-623-8831
E-mail: jq10001@ns.kogakuin.ac.jp
2017年9月5日受付, 2017年10月3日受理

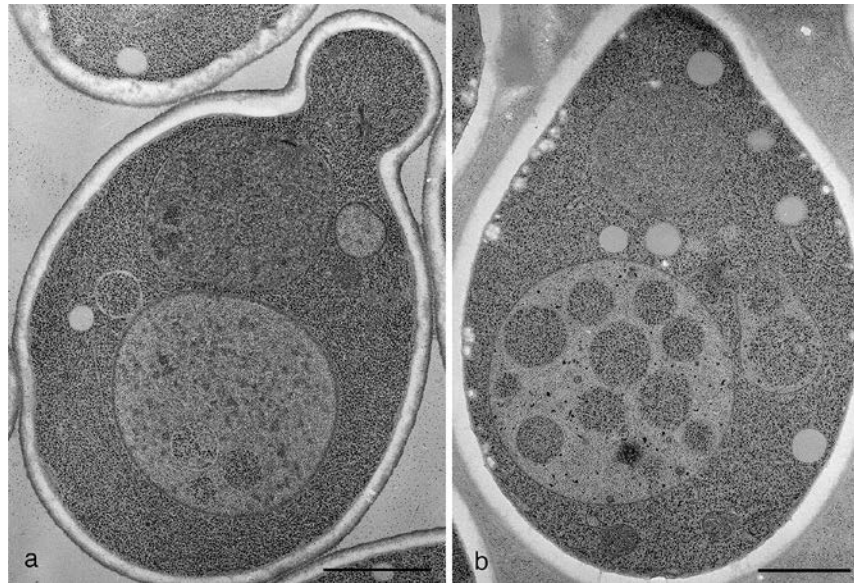


図2 ノーベル委員会による press release において、受賞理由の説明に使用された急速凍結置換固定電子顕微鏡像。(a) 炭素源飢餓において3時間後の像。液胞の横にオートファゴソームが存在している。(b) 窒素源飢餓において2時間後の像。液胞内にオートファジックボディが蓄積している。スケールは1 μ mを示す。

れていなかった。当時は遺伝学及び生化学的手法が主流であったが、大隅先生のアイデアは、Elizabeth Jones によって単離された液胞内タンパク質分解酵素欠損株³⁾を用いることで、液胞内の変化を光学顕微鏡で観測することができるのではないかというものであった。オートファジーに関する多くのコメント、解説記事の中に“光学顕微鏡で、液胞に丸い粒子が蓄積するのを発見した。オートファジーの発見である。”との記載がよくみられるが、この時点では、オートファジーという認識は持ち合わせていなかった。オートファジー、すなわち、自己の細胞質構成成分を液胞に取り込む現象を証明できたのは、電子顕微鏡観察からであった。

3. 光学顕微鏡から電子顕微鏡へ

窒素源飢餓下に置かれた液胞内の形態変化は、主要な液胞内タンパク質分解酵素欠損株を用いることで、光学顕微鏡によって図3のように観察される⁴⁾。1時間経過すると、ブラウン運動する球形の構造体が観察されるようになり、3時間も経つと液胞内はその構造体でいっぱいになる。当時、先生はこの現象を光顕で観察しており、分解に関与すると予測される未知の構造体が検出されたのではないかと大変興味を示していた。筆者は、先生からこの現象を光顕で見せていただいたが、実のところ、液胞内のこれらの構造体にさほど感激しなかった。どんなに眺めていても、球形の粒子という以上の情報を得ることは不可能だからである。実際に、先生ご自身も、液胞に何が起きているのか、この構造体は何であるのか知りたいという非常に強い思いがあった。先生から言われた“この構造体を電顕で見て欲しい”の一言が、その後、酵母のオートファジー研究へと進展していった。

長年の地道なオートファジーの解明の過程において、電子

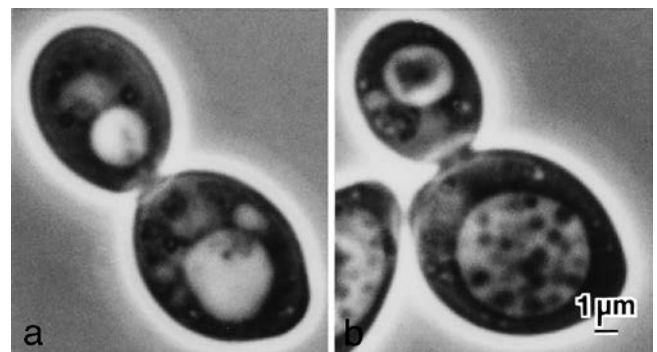


図3 窒素源の栄養飢餓においた液胞内タンパク質分解酵素欠損細胞の位相差顕微鏡像。(a) 1時間。(b) 3時間。撮影;竹重。

顕微鏡解析は、節々に重要な、決定的な画像をもたらすことにより、研究を新たな局面へと導いた。我々が、決定的なオートファジーの膜動態を示すことができたのは、酵母細胞を急速凍結置換固定法で観察していたことによる。何故なら、酵母細胞は、固定方法により全く異なる電顕画像になってしまう(図4)。厚い細胞壁によりオスミウム酸が浸透しないため、古くからリボソームや細胞骨格系などをすべて破壊する過マンガン酸カリウム固定法が用いられていた。Zymolyase が発見されてからは、細胞壁をその酵素で消化させてオスミウム酸固定をしていたが、浸透圧の影響を大きく受ける。収縮した場合には液胞内には固定液が入らないため、正しい構造体を観察することは難しい。生きた状態を最も良く保存する物理的固定法、すなわち、銅版に圧着させる急速凍結置換固定法は、当時、動物細胞の分野ではすでに盛んに行われていたが、酵母細胞はこの手法では成功せず、まだまだ一般化されていなかった。しかし、筆者は、サンドイッチ法という酵母

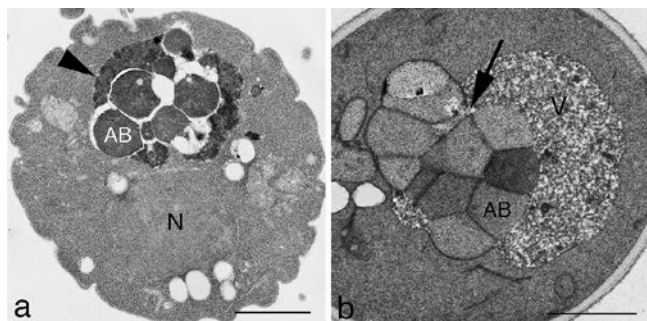


図4 オートファジーを起こした細胞を化学固定法により作製した電顕像。(a) Zymolyaseで細胞壁を溶かした後に、グルタールアルデヒド・オスmium酸固定をした像。細胞壁の消化は、大隅先生自ら行ったものである。高浸透圧のため、液胞内は固定されていない(矢頭)。(b) グルタールアルデヒド・過マンガン酸カリウム固定の像。オートファジックボディは、凝集して球形ではない(矢印)。細胞質のマーカとなるリボソームが消失している。AB:オートファジックボディ。N:核。スケールは1 μ mを示す。

のための急速凍結置換固定法を開発し、すでに常套手段としていた^{5,6)}。当時、酵母の凍結固定ができる人は、世界でも数人しかいなかったため、この手法で観察した酵母の膜動態の形態解析は有効且つ明解であり、過マンガン酸カリウム固定で観察していたヨーロッパのオートファジー研究者には追従を許さないものであった。しかし、スタートしたばかりの駒場の研究室には、電顕に関連する周辺機器は皆無であった。この状況下で電顕解析をしたいという思いを実現するために、当時、筆者の力のできることはすべてしようと考えていた。従って、急速凍結装置を手作りするべく図面を引くことから始めた。本郷にあった小さな町工場で小さな装置を完成させた。その装置を用いて急速凍結置換固定法で観察した結果が図2である。光顕と電顕の威力の差は歴然である。ゼロからのスタートであったので、工学院大学の地下に設置されていた電子顕微鏡で、この凍結固定が成功した酵母の像を見たときには、“やったあ”という気持ちで、“あ、この細胞きれい。この細胞もきれい”と、たった一人で夢中になって撮影していた。

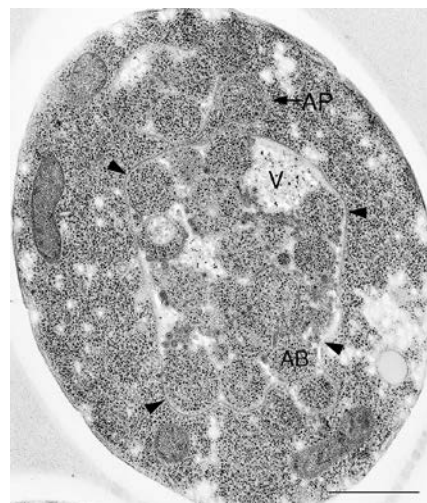


図5 窒素源の栄養飢餓においた液胞内タンパク質分解酵素欠損細胞(BJ926)の急速凍結置換固定電顕像。二倍体の細胞。液胞内には、多数のオートファジックボディが蓄積している。矢頭は液胞膜を示す。AB:オートファジックボディ。AP:オートファゴソーム。V:液胞。スケールは1 μ mを示す。

4. 酵母のオートファジーの発見

オートファジーの解明の初期に、電顕解析でしか果たせなかった重要な証明が3つある。その一つが、前述したように液胞に蓄積した構造体を急速凍結置換固定法によって観察したことである。液胞内タンパク質分解酵素欠損細胞の液胞内の球形構造体には、リボソームが存在しており、その密度が細胞質と同じであったことから、この形態が、自己の細胞質そのままの形態を示していることを電顕観察から読み解くことができた(図2b, 図5)。構造体のサイズも計測でき、ほぼ一定の大きさの範囲内にあった(400~800nm)。一重膜で囲まれていることが明らかとなり(図6a)、また、細胞質に存在している小胞体⁴⁾やミトコンドリア(図6b)などのオルガネラも形態を保持したままの状態に取り込んでいることが判った。ミトコンドリアが液胞内に取り込まれていることは、予想外であったので、当然ミトコンドリアDNAの有無が問題となった。DAPI染色した結果、液胞内に動く輝点を見つけた(図6b, 挿入)。すなわち、DNAを含む状態で液胞

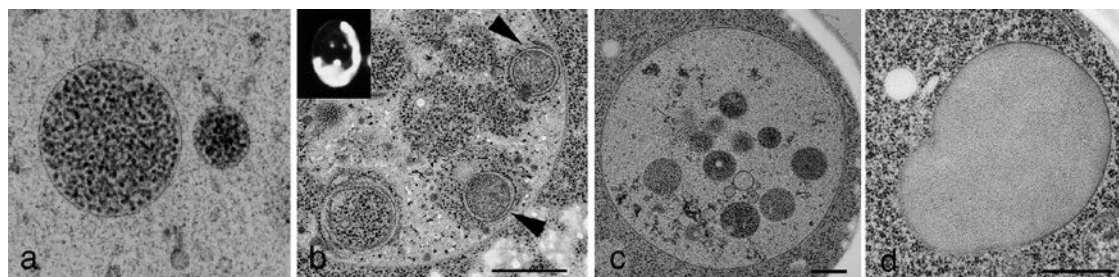


図6 液胞内に取り込まれたオートファジックボディの電顕像。(a) 一重膜で囲まれている。(b) 矢頭はミトコンドリアを取り込んでいるオートファジックボディを示す。(挿入) DAPI染色した細胞。中央の二つの輝点が液胞内のミトコンドリアDNAである。(c) 液胞内で分解を起こしているオートファジックボディの像。(d) 野生型細胞の液胞の像。スケールは500nmを示す。

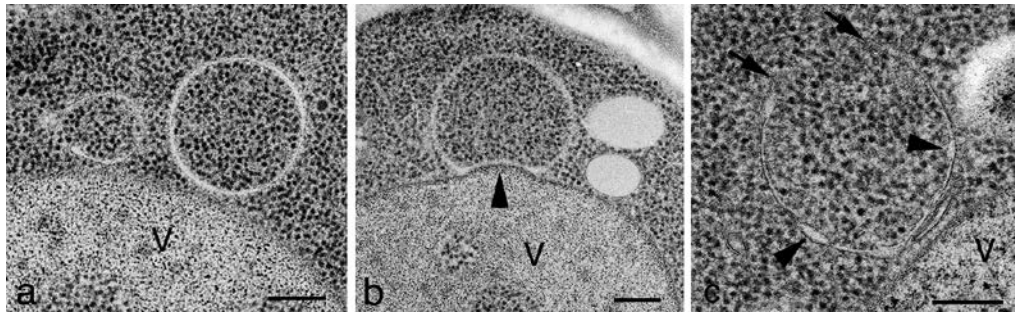


図7 オートファゴソーム (a, b) とファゴフォア (c) の電顕像. (a) 細胞質の一部分が二重膜で囲まれている. (b) 矢頭は液胞膜とオートファゴソームの外側の膜が密着した状態の像を示す. (c) 細胞質の一部を取り囲んでおり、形成過程にある. 矢印は膜囊の両端を示し、矢頭は膜囊の膨潤した部分を示す. V: 液胞. スケールは200 nmを示す.

へ取り込まれていたのである。これらの事実から、栄養飢餓条件下で誘導された酵母の液胞は、細胞質の非常に大きな領域を取り込む大規模な分解に関与することが明らかにされた。この球形の構造体をオートファジックボディと名付けた⁴⁾。

野生型細胞においては、オートファジックボディは、液胞内のプロテアーゼ B を阻害することで可視化されることがポストドクの地道な実験により判った⁴⁾。阻害剤の添加で蓄積したオートファジックボディは、阻害剤の除去により液胞内で分解され、次第に見えなくなっていくことを電顕は捕えた(図 6c)。野生型細胞は、栄養飢餓によって、自己の細胞質構成成分を膜に囲まれた構造体として液胞内に取り込んでいるが、加水分解酵素によって常に速やかに分解されているため、液胞は、通常は均一無構造にしか見えない(図 6d)。従って、オートファジックボディというのは、分解反応過程の最終段階の膜構造体であることが示された。同時に、酵母の液胞が、分解コンパートメントとしての役割を果たしていることが電顕観察から直接的に証明された。これらの結果を、遺伝学、生理学と電顕解析の二つの内容に分けて 2 報の論文として意気揚々と投稿した。しかし、1 報にまとめるようにというレフェリーのコメントがつき、不本意であったが、電顕の多くのデータを 1 報目の論文に移した。さらにそのデータを裏付けるための生化学的解析が研究室に新たに加わった大学院生により行われ、酵母にオートファジーが存在することを証明した論文が発表されたのは 1992 年である⁴⁾。

5. 酵母のオートファゴソームの発見

液胞内のオートファジックボディは、どうやって液胞へ取り込まれるのかという疑問に対する答えは、やはり電顕解析がもたらした。凍結固定が成功して、非常に沢山の切片を観察していた時、液胞の横に、細胞質を取り囲んでいる、球形の二重膜の構造体を見つけた(図 2a)。酵母のオートファゴソームの発見である¹⁾。しかし、実際にはこの時点でまだオートファジーという概念は持っていなかったため、この丸い構造体はなんだろうと思いつけるたびに撮影をしていた。オートファゴソームは、二重膜で形成され、それが丸いという情報は光顕では検出不可能であり、また、細胞を破

壊してしまう生化学的手法でも決して得られない(図 7a)。あまり取り上げられていないが、電顕が果たした重要な役割の二つ目であった。このオートファゴソームの発見こそが、動物細胞で長年述べられていたオートファジー現象が、酵母に存在することの証しであった。実際には、撮影した写真を並べて見ているうちに、オートファゴソームが液胞へどの様に取り込まれるかの膜動態が理解された。オートファゴソームの外側の膜がぴったりと液胞膜に密着した像(図 7b)、液胞膜とオートファゴソームの外側の膜が融合した像が捉えられていた^{1,7)}。新たに電顕のデータを捕捉して、オートファゴソームの発見の論文として世にでたのは 1994 年になった¹⁾。

オートファゴソームを液胞内へ取り込む過程の、さらなる決定的な瞬間の像は、急速凍結した酵母のフリーズ・エッチング像から得られた(図 8a)。この像は、オートファゴソーム膜と液胞膜が融合している瞬間を捕えている。オートファゴソームの外側の膜が液胞膜と連続し(矢印)、内側のオートファジックボディが一部露出している(矢頭)。すなわち、二重膜構造体であるオートファゴソームの内側の一重膜で細胞質を取り囲んだ構造体が、オートファジックボディであり、オートファゴソームは、オートファジックボディの前駆体であることが証明された。酵母細胞は、栄養飢餓において、細胞質成分の一部をこのような動態で次々と液胞へ取り込んでいることが明らかになった⁸⁾。

加えて、フリーズ・エッチングの像は、栄養飢餓で新たに形成されたオートファジックボディやオートファゴソームの膜が、形態学的に非常に特徴的な性質を持つことを示した⁸⁾。細胞膜、液胞膜、タンパク質合成や呼吸などの役割を果たしている他のオルガネラの膜は、膜の切断面に非常に沢山の膜内タンパク質粒子が存在する。しかし、オートファゴソームの膜、およびオートファジックボディの膜には、膜内タンパク質粒子がほとんど存在しないことがわかった(図 8b)。電顕を観察しながら、“粒子がない。ツルツルの膜だ。”と一種の驚きをもって撮影をしていた。しかし、この事実が、最終的には、液胞内で分解されるために新たに創り出された構造体の膜の性質であった。オートファゴソームの役割が、細胞質成分の一部を隔離し、液胞内で分解するために運ぶとい

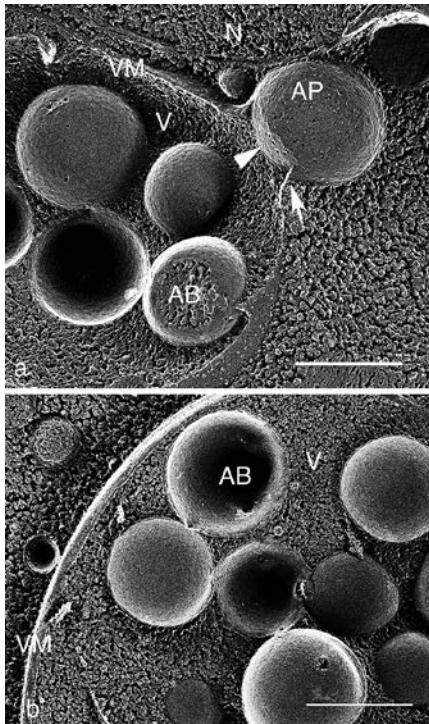


図8 フリーズ・エッチングの電顕像。(a) オートファゴソムの外側の膜と液胞膜が融合した瞬間の像。矢印は、二つの膜の結合部分を示す。矢頭はオートファゴソムの内側の膜で囲まれた構造体、すなわちオートファジックボディを示す。(b) 液胞内のオートファジックボディの膜形態を示す。膜内タンパク質粒子が存在しない。AB: オートファジックボディ。AP: オートファゴソム。N: 核。V: 液胞。VM: 液胞膜。スケールは500 nmを示す。

うことだけが、もし、生物学的な機能であると仮定すれば、膜タンパク質が極めて少ないことは理にかなっている。また、オートファジックボディという液胞内で壊されるための細胞質を包んだ膜にはほとんど膜内タンパク質粒子が存在しないという結果も理由づけられる。また、形態的性質の大きく異なる二つの膜が融合することから、液胞膜は栄養飢餓において、このような平滑な膜をどんどん取り込んでいる唯一のオルガネラである。フリーズ・レプリカの解析は、それらのことを顕著に物語った。

このような特徴をもったオートファゴソムはどのようにして形成されるのか、膜の起源の問題は長年の議論になっており、なお未解決の問題である。非常に低頻度でカップ型の構造体が検出される(図7c)。膜嚢の両端は、まだ閉じていない。部分的に内腔が膨潤しており、まだ均一な厚みではない。このような形態をオートファゴソムの前駆体、ファゴフォア(phagophore)と呼ぶ。このファゴフォアのさらに前駆体の構造体は、電顕による形態学的な同定にはまだ至っていない。しかし、現在では、オートファゴソム形成に関与する膜として、小胞体の重要性が多数報告されている⁹⁾。

図9は、電顕解析から描き出された酵母のオートファジーの膜動態を示す。動物細胞との大きな違いは、ライソゾーム

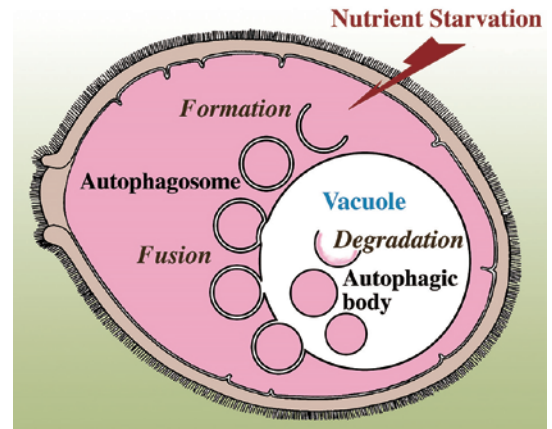


図9 酵母のオートファジーの膜動態を示したモデル図。

と比較して液胞が大きく、さらに細胞内膜系が単純なことである。現時点では、ファゴフォアは忽然と現れ、細胞質において、新たな二重膜構造体であるオートファゴソムが形成された後、液胞と融合することにより、自己の細胞質成分を液胞内へ移行する。栄養飢餓で誘導された酵母のオートファジーが、動物細胞におけるオートファジーと類似した機構であったことは、オートファジーが真核生物に共通の現象であることを結論づけた。このタンパク質分解において、液胞が必須の役割を担っていることが明らかにされた。オートファジーは、細胞質の一部を大規模に取り込むことができる分解系であることから、オルガネラなどの大きな構造体を除去することが可能となる。

6. 酵母のオートファゴソムマーカーの検出

膜動態が明らかになったことから、オートファジーを制御する因子を同定することが始まった。オートファジーは、細胞自身にとってとても危険な作業であるため、厳密に制御されなければならない。オートファジー不能変異株が単離され¹⁰⁾、ATG (autophagy) 遺伝子が同定された。しかし、他の遺伝子との類似性がなかったために、何の機能を果たしているのかわからない時期が長く続いた。その後の解析から、現在では、オートファジー関連タンパク質は約40個同定されている。そのうちの18個が、オートファゴソム形成において中心的役割を果たしていると考えられており、ここでは詳しく述べないが、主に4つの機能グループに分けられている¹¹⁾。その中に、ユビキチン様の修飾系が存在することが見出された^{12,13)}。オートファジー関連タンパク質であるAtg8は、ユビキチン様修飾系によって、タンパク質ではなく、膜のリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)に結合することがわかった^{7,14)}。この事実は、当時研究室の中で非常に話題となった。Atg8は、膜脂質結合型Atg8と膜から解離した遊離型Atg8をサイクルするタンパク質であった。

このことからAtg8の局在を免疫電顕で調べることが必須となった。オートファゴソムは、二枚の膜から成っている

が、その内外両方の膜に Atg8 の局在が認められた^{7,14}。しかも、Atg8 は形成過程中的ファゴソームにより多くの反応が存在し、完全に形成されたオートファゴソームからは、むしろ離脱して局在が少なかった。すなわちオートファゴソームの膜形成に関与するタンパク質であった。役割を終えた Atg8 の一部は、オートファジックボディの中に見られ、液胞内で分解される^{7,11}。動物細胞においては、オートファゴソームのマーカーが得られなかったために、長い間研究の進展が阻まれていた¹⁵。酵母細胞の免疫電顕解析で得られた知見から、Atg8 がオートファゴソームを検出することのできるタンパク質であることがブレークスルーとなり、その後、動物細胞におけるホモログとして LC3 が同定された。現在では、オートファゴソームの最も信頼できるマーカータンパク質としてパワフルに使用され、特に、イメージングの領域では、爆発的といっているほどに広がることとなった。オートファジーの解明の初期において、酵母の電顕解析が新たな展開を導いた3つ目の貢献である。

7. 選択的オートファジーの発見

Atg8 タンパク質は、その後、積荷の選択的認識機構において重要な役割をもっていることが判った。酵母にオートファジー現象を見出した初期の頃、オートファジーは、栄養飢餓で誘導される非選択的な大規模な分解反応と考えていた。現在では、恒常的オートファジーが基底レベルの分解を担っていると考えられている。また、大規模な分解反応は、大きな領域を液胞へ取り込めるからこそ、オルガネラなどの分解が可能であり、積荷の選択的認識機構の解明が盛んに行われるようになった¹⁶。例えば、ミトコンドリアの分解は、mitophagy¹⁷、ER は ERphagy¹⁸、peroxisome は pexophagy¹⁹ など、一時は、新たな phagy の続出であった。

栄養飢餓で誘導されるオートファジーにおいて、その経路に選択的認識機構が存在することが最初に判ったのが、液胞内加水分解酵素アミノペプチダーゼ 1 (Ape1) の輸送である²⁰。この研究は、全く別の方向から始まった。当時カリフォルニア大学の Klionsky らは、他の多くの液胞内酵素が小胞体、ゴルジ体を介した分泌経路を経由して輸送されるのに対して、この酵素は N 末端にシグナルペプチドを持たないことか

ら、細胞質からどのようにして液胞へ輸送されるのかを調べていた。彼らは、前駆体型 Ape1 が細胞質に蓄積するという成熟不能変異株 (cvt; cytoplasm-to-vacuole targeting) を単離していた。液胞輸送に関わるという観点から、cvt 変異株が送られてきて atg 変異株との遺伝的相補性が調べられた。その結果、これらの変異株の多くが重複していることが判り、少なからぬ驚きであった。何故なら、Ape1 輸送は富栄養条件下で働いている生合成経路であり、オートファジーは栄養飢餓により誘導される分解経路であったからである。さらに、すべての atg 変異株は、Ape1 が成熟型とならなかった。すなわち、Ape1 が液胞へ輸送されないことを意味していた。何故、この二つの輸送経路に関わる因子が共通であるのか。その答えは、やはり電顕解析から得られた^{20,21}。オートファジーを可視化したと同様の方法、液胞内加水分解酵素の欠損株を用いて Ape1 の局在の観察を行った。前駆体型 Ape1 は、細胞質において合成されるとすぐに 12 量体となる。Klionsky らが作製した抗 Ape1 抗体は、非常に特異性が高く、細胞質に存在するとてもユニークな構造体を染め出した (図 10)。中央に電子密度の高い領域があり、その周囲は小さな粒子で囲まれていた。APE1 遺伝子を増幅させると中央の領域が増大し、そこに Ape1 が存在することが証明された (図 10a, 矢印)。この構造体を Cvt complex と名付けた²⁰。前駆体型 Ape1 は、電顕で認識可能なくらいの凝集体になっていることが重要な意味を持っていた。栄養増殖過程における Ape1 輸送では、Cvt complex にファゴソームの膜、すなわち、積荷を隔離するための隔離膜が密着して、凝集体に沿って選択的に取り囲む (図 10b)。Atg8 の反応は、Cvt complex を隔離する膜に局在する (図 10b, 矢頭)。細胞質を完全に排除して、オートファゴソームと同じ二重膜構造の小胞 (Cvt vesicle²⁰、140 ~ 160 nm の大きさ) が形成される (図 10c)。その内部には、前駆体 Ape1 と役割を終えた Atg8 が認識された (図 10d, 矢印)。液胞内へ Cvt vesicle を取り込む膜動態はオートファジーと同じであった²²。液胞内に取り込まれた一重膜で囲まれた小胞を Cvt body と名付けた (図 10d)²⁰。Cvt vesicle とオートファゴソームの大きな違いは、そのサイズとともに、前駆体型 Ape1 が Cvt vesicle の積荷であるため、細胞質を完全に排除していることである。しかし、重複した

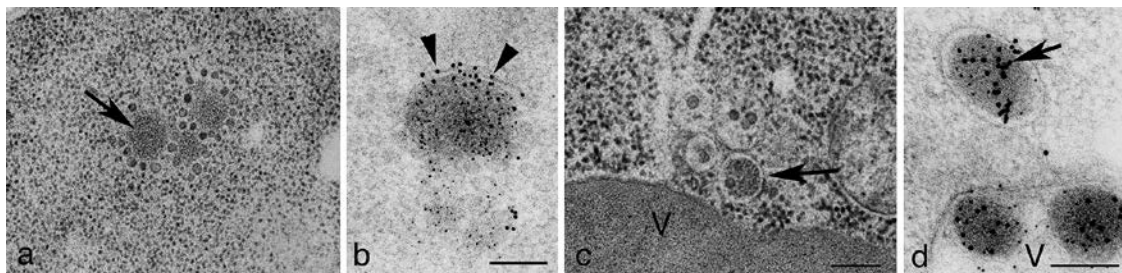


図 10 栄養増殖過程の Cvt 経路に観察される構造体の免疫電顕像。(a) Cvt complex (b) Cvt complex が隔離膜 (矢頭) で囲まれる過程。隔離膜には、Atg8 (10 nm の金コロイド) が標識され、前駆体 Ape1 は 5 nm の金コロイドで染色されている。(c) Cvt vesicle (矢印)。(d) Cvt vesicle と Cvt body。Atg8 (10 nm 金コロイド) の反応は、形成された膜と前駆体 Ape1 領域 (5 nm の金コロイド) の上に存在する (矢印)。V: 液胞。スケールは 200 nm を示す。

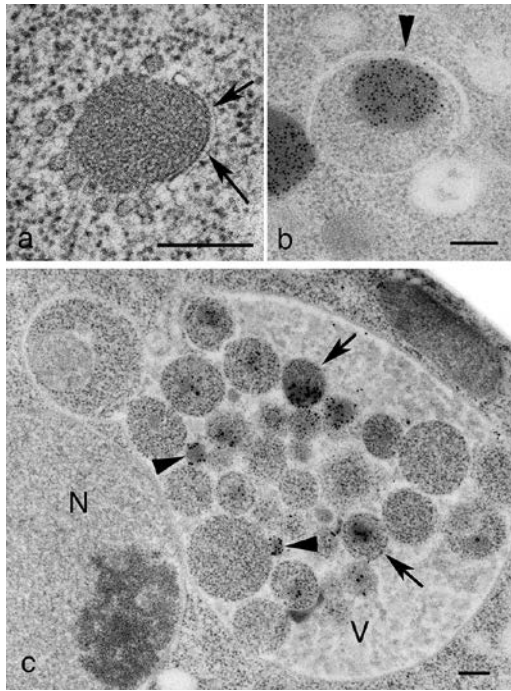


図 11 栄養飢餓でオートファジーが誘導されたタンパク質分解酵素欠損細胞の前駆体 Ape1 の選択的取り込み。(a) 隔離膜は Cvt complex の中央の領域に密着して形成される(矢印)。(b) Cvt complex が取り込まれたオートファゴソーム。矢印は隔離膜と密着している部位を示す。抗 Ape1 抗体は、Cvt complex の中央領域を染色した。(c) 抗 Ape1 抗体で染色された Cvt complex は、オートファジックボディの内部に存在する(矢印)。矢印は、栄養増殖過程ですでに取り込んでいた Cvt body を示す。Ape1 を標識した金コロイドの反応が見られる。N: 核。V: 液胞。スケールは 200 nm を示す。

多くの遺伝子は、この同じ動態の膜形成に関与するものであった。すなわち、富栄養条件下に *atg* 変異株には、Cvt vesicle が形成されていなかったために、前駆体型 Ape1 が成熟型にならなかったのである。おもしろいことに栄養飢餓に直面した細胞の生存戦略は見事であった。この液胞内可溶性酵素である Ape1 は、栄養飢餓でこそ生産量が増加し、分解反応のために必要とされるが、その輸送ではオートファゴソームの中へ隔離することにより、確実に多くの前駆体型 Ape1 タンパク質を液胞へ送り込むのである。オートファゴソーム形成の過程において、前駆体型 Ape1 は隔離膜形成の早い段階に捕獲される(図 11a, 矢印)。積荷の選択性は、隔離膜に局在する Atg8 と Ape1 の受容体である Atg19 の反応により進むと考えられている。しかし、細胞が飢餓を感知しているときは、この隔離膜は前駆体型 Ape1 を捕捉してしまうと、その後は凝集体から離れて、同時に細胞質の一部を大きく取り囲んでオートファゴソームを形成するのである(図 11b)。細胞は、オートファジーという液胞への分解経路に、液胞内で働く可溶性酵素を運ぶための極めて精巧なシステムを組み込んで、栄養源の有無により制御しているのである(図 11c)。液胞内には、栄養増殖過程で取り込んだ Cvt

body (矢印) と栄養飢餓で取り込んだ Cvt complex を含むオートファジックボディが混在している(矢印)。

電顕観察は、観察眼をもってしっかり見ていると、細胞内の驚くべき精巧なダイナミックな動きを、目の当たりに我々に明かしてくれるのである。電顕解析とは、興味のつきない手法であると筆者は思う。液胞の関与した大規模な分解反応の過程が解らなかった時代に、電子顕微鏡がオートファジーという膜現象の過程を微細構造レベルで非常に明快に明らかにすることによって、オートファジーの解明への扉を開けたといっても過言ではないと思っている。オートファジー研究で果たした電子顕微鏡の役割は大きいものであった。

8. 謝辞

電顕解析をスタートするにあたって、電子顕微鏡に関するすべての装置を貸してくださり、研究費の補助をしてくれた工学院大学の金谷光一研究室には、特に感謝の意を述べさせていただきます。

文 献

- 1) Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Biol.*, 124, 903–913 (1994)
- 2) Zubenko, G.S. and Jones, E.W.: *Genetics*, 97, 45–64 (1981)
- 3) Jones, E.W.: *Genetics*, 85, 23–33 (1977)
- 4) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Biol.*, 119, 301–311 (1992)
- 5) Baba, M. and Osumi, M.: *J. Electron Microsc. Tech.*, 5, 249–261 (1987)
- 6) Baba, M.: *Methods in Enzymol.*, 451, 133–149 (2008)
- 7) 馬場美鈴, 大隅良典: 顕微鏡, 41, 73–76 (2006)
- 8) Baba, M., Osumi, M. and Ohsumi, Y.: *Cell Struct. Func.*, 20, 465–471 (1995)
- 9) Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M. and Nunnari, J.: *Mol. Biol. Cell*, 24, 2918–2931 (2013)
- 10) Tsukada, M. and Ohsumi, Y.: *FEBS Lett.*, 333, 169–174 (1993)
- 11) Reggiori, F. and Klionsky, D.J.: *Genetics*, 194, 341–361 (2013)
- 12) Mizushima, M., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y.: *Nature*, 395, 395–398 (1998)
- 13) Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y.: *Nature*, 408, 488–492 (2000)
- 14) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Biol.*, 147, 435–446 (1999)
- 15) Eskelinen, E.L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A.L. and Seglen, P.O.: *Autophagy*, 7, 935–956 (2011)
- 16) Zaffagnini, G. and Martens, S.: *J. Mol. Biol.*, 428, 1714–1724 (2016)
- 17) Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. and Klionsky, D.J.: *Dev. Cell*, 17, 98–109 (2009)
- 18) Bernales, S., Schuck, S. and Walter, P.: *Autophagy*, 3, 285–287 (2007)
- 19) Oku, M. and Sakai, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1863, 992–998 (2016)
- 20) Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Biol.*, 29, 1687–1695 (1997)
- 21) 馬場美鈴, 大隅良典: 電子顕微鏡, 33, 129–131 (1998)
- 22) 馬場美鈴: 細胞工学別冊, 電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ, 秀潤社, 38–43 (2008)