

哺乳類オートファジー関連オルガネラの電子顕微鏡観察

Electron Microscopic Analyses of Autophagy-Related Organelles in Mammalian Cells

和栗 聡, 植村 武文, 山本 雅哉, 矢橋あつ子

Satoshi Waguri, Takefumi Uemura, Masaya Yamamoto and Atsuko Yabashi

福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座

要 旨 オートファジーは細胞内リソソーム分解系の一端を担うとともに、生体の恒常性維持や細胞のストレス対応機構として重要視され、その研究進捗が目覚ましい。オートファジーが発動されると新規膜構造物として隔離膜（あるいはファゴフォア）が出現し、細胞質の一部を取り囲む。これが閉じてオートファゴソームとなり、ここにリソソームが融合して内容物が分解される。極めて動的な膜変化と膜オルガネラ間融合を伴う現象であることから、その形態解析には電子顕微鏡観察が欠かせない。しかし、その際には若干の注意が必要である。特に隔離膜は2重膜構造を成すことが特徴的であり、その形態保持には固定法を含むサンプル処理法が大きく影響する。本稿では、まずオートファジー関連オルガネラについて、その形態学的観察ポイントを交えながら解説する。また、オートファジー研究の長年の挑戦課題である隔離膜の由来について、関連構造を含めた最近の話題を紹介する。

キーワード：オートファジー、隔離膜、ファゴフォア、電子顕微鏡観察、固定法

1. はじめに

オートファジー（自食作用 autophagy, 以下オートファジーと表記）ーリソソーム分解系は、ユビキチンープロテアソーム分解系と並ぶ細胞の大規模分解系として位置づけられ、細胞内タンパク質やオルガネラの恒常的なターンオーバー、あるいは飢餓や各種ストレスの対応機構として極めて重要な役割を演じる。最近のオートファジー研究の広がりには目を見張るものがあるが、その理由は30以上のAtg関連遺伝子群 (Atg; autophagy-related genes) とその結合分子が発見されたこと、そして様々な病態における重要性や他の細胞内シグナル伝達系とのクロストークが明らかになってきたことによる。10年程前までは、オートファジーは非選択的分解系に属し飢餓時のアミノ酸供給を目的とした現象、と説明されていたが、最近の研究では選択的オートファジーの存在とその重要性が指摘され、分解対象となる構造やオルガネラにより以下のような名称が使われるまでになってきた：Aggrephagy (凝集体の分解), Mitophagy (ミトコンドリアの分解), Pexophagy (ペルオキシソームの分解), Xenophagy (病原体の分解), Reticulophagy (小胞体の分解) など¹⁾。

オートファジー現象は極めて動的な膜動態を伴う。隔離膜の生成と伸張、隔離膜閉鎖によるオートファゴソーム形成、そしてオートファゴソームとリソソームの融合による酵素の獲得と内容物の分解、と進む (図1)。ここで強調すべきは、

同現象が新たな細胞内膜系の生成・変化を伴う点であり、既存の膜系が動的に変化する現象、例えばメンブレントラフィック等とは大きく異なる。最近は光学顕微鏡法の進化と相まってライブセルイメージングによりその動きを目で見て理解できるようになってきた。しかしオートファゴソーム自体は直径0.5-1ミクロン程度の大きさであり、その決定的瞬間をとらえる電子顕微鏡レベルの解析は不可欠である。本稿では、電子顕微鏡レベルでのオートファジー形態学についてその観察法や固定法に触れながら概説し、さらに隔離膜生成に関して最近発表した我々の研究を紹介したい。

元来、オートファジーはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの3種類が存在するが、ここでは最も研究が進んでいるマクロオートファジーに注目し、以後は記載のない限りこれをオートファジーと呼ぶ。また、Atg遺伝子群が最初に発見された酵母におけるオートファジーはその膜動態が哺乳類とは異なるため、本稿では言及せず他総説に委ねたい²⁾。

2. オートファジー関連オルガネラの電子顕微鏡解析

通常電子顕微鏡によりオートファゴソームの数を比較定量する場合、その同定基準を明確にして他の類似オルガネラと区別する作業が必要であり、観察者はそのための目を養う必要がある。まず、オートファジーの進行に伴って変化する各オルガネラの観察ポイントを以下に述べる。

2.1 隔離膜, ファゴフォア, オートファゴソーム

隔離膜あるいはファゴフォアが伸びて閉じるとオートファゴソームになる。隔離膜とファゴフォアはほぼ同義であるが、想定する対象によって使い分けることが可能である。この隔

〒960-1295 福島市光が丘1番地
TEL: +81-24-547-1120; FAX: +81-24-547-1124
E-mail: waguri@fmu.ac.jp
2014年5月13日受付

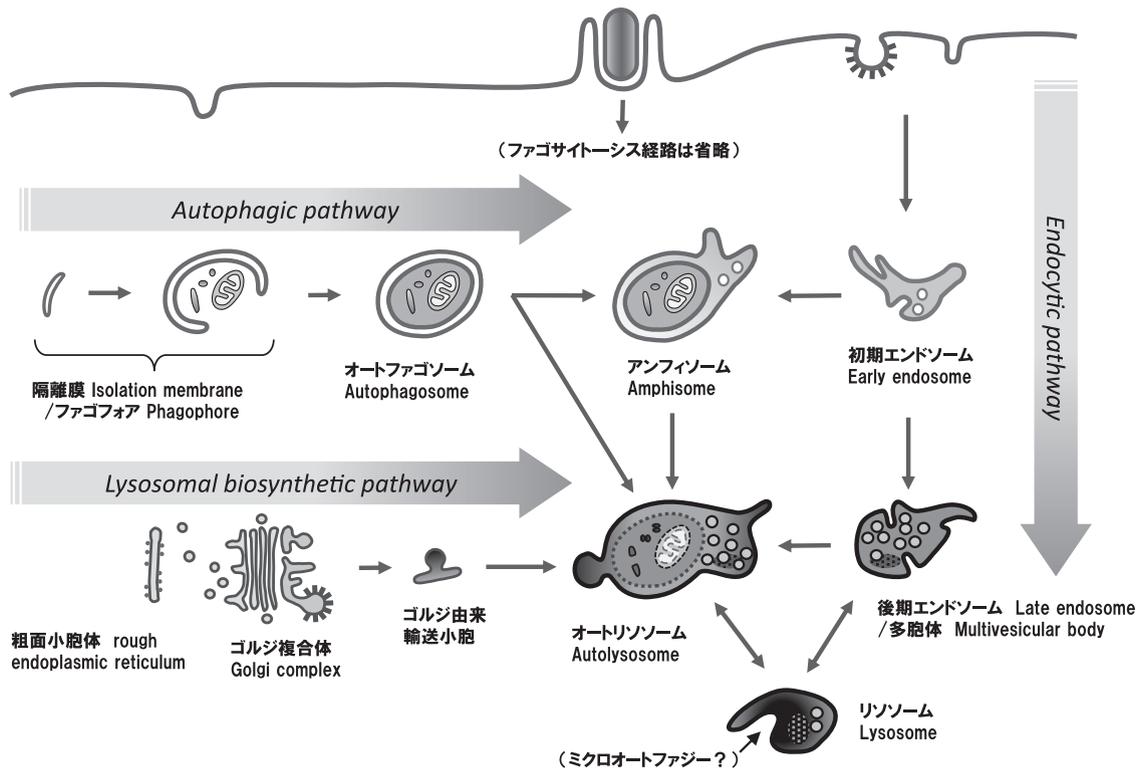


図1 オートファジーに関連する様々なオルガネラ
 オートファジー過程 (autophagic pathway), エンドサイトーシス経路 (endocytic pathway), リソソーム生合成過程 (lysosomal biosynthetic pathway) において観察される各種オルガネラをまとめた図. 詳細は本文参照.

隔離膜の大きな特徴は「2重膜構造」を成すことで、通常の固定法では内外の膜間に空隙が存在する (図1, 2, 4A). その空隙が広いものは固定・脱水・包埋作業で生じたアーチファクトであると考えられており、通常内容物はない³⁾. 後述するように、この空隙はオートファゴソームに特徴的であり、特に低倍の電顕観察で同構造物を見出す時には有用である. また、凍結超薄切片法を用いる免疫電顕法では、さらに広がる傾向がある. このように「2重膜」は重要な特徴であるが、一方で過信することは禁物である. 例えば中枢神経系の神経細胞軸索では、隣接するオリゴデンドロサイトの細胞質を伴って軸索細胞膜が陥入する場合があります、切片方向によっては2重膜構造に見える⁴⁾. ミトコンドリアもクリステがない部分を切片が横切れば2重膜構造になり得る.

もう一つの特徴として、オートファゴソームで隔離された部分は周囲の細胞質とほぼ同じに見えることが挙げられる. これは隔離された領域に存在するリボソームや粗面小胞体、ミトコンドリアなどに変性像が見られないこと、背景の電子密度が均一で周囲細胞質と同程度であること (しかし、多少の電子密度の上昇はある) など、総合的に判断される (図2). 多くの場合は、以上2つの基準で同定は可能である.

次に留意すべき点は、切片上での隔離膜とオートファゴソームの区別である. 500–1000 nm 径のオートファゴソームに対し、透過型電子顕微鏡は60–100 nm 厚の切片を観察する. よって完成したオートファゴソームと閉じようとしている隔

離膜との区別は困難であり、後者は隔離部分と細胞質が連続している像を観察した時のみ同定できる. また、隔離膜自体は弧を描くためにそれと推測できるが、もし弧を描く前の隔離膜を想定した場合は判定するのは困難であろう. しかし、粗面小胞体に挟まれて成長する隔離膜を観察した場合 (図3 上段) は、他の現象では説明困難であるために、その位置関係からおおよその同定が可能である.

2.2 オートリソソームとアンフィソーム

この2者を理解するには、リソソーム酵素の生合成・輸送経路およびエンドサイトーシス経路を合わせて理解する必要がある (図1). オートリソソームはオートファゴソームがリソソーム酵素を獲得した後のオルガネラを指す. 酵素獲得先として既存のリソソーム、後期エンドソーム、ゴルジ由来輸送キャリアー等が考えられ、これらを一括してリソソームとする総説が多い. 実際の電子顕微鏡観察では明瞭な隔離内容物の変性 (不定形高電子密度構造の存在、不均一性など) が認められればオートリソソームと考えられる. また、2重膜の内側の膜も分解されるために、その限界膜は1重膜となる. 内容物として膜性要素が存在した場合は、オートファジーに由来する場合を考えがちであるが、厳密に言えばエンドサイトーシス経路にある多胞体 (MVB: multivesicular body) 形成に由来する場合もある.

一方、アンフィソームは、オートファゴソームと初期エンドソームの融合により形成されるオルガネラで、リソソーム

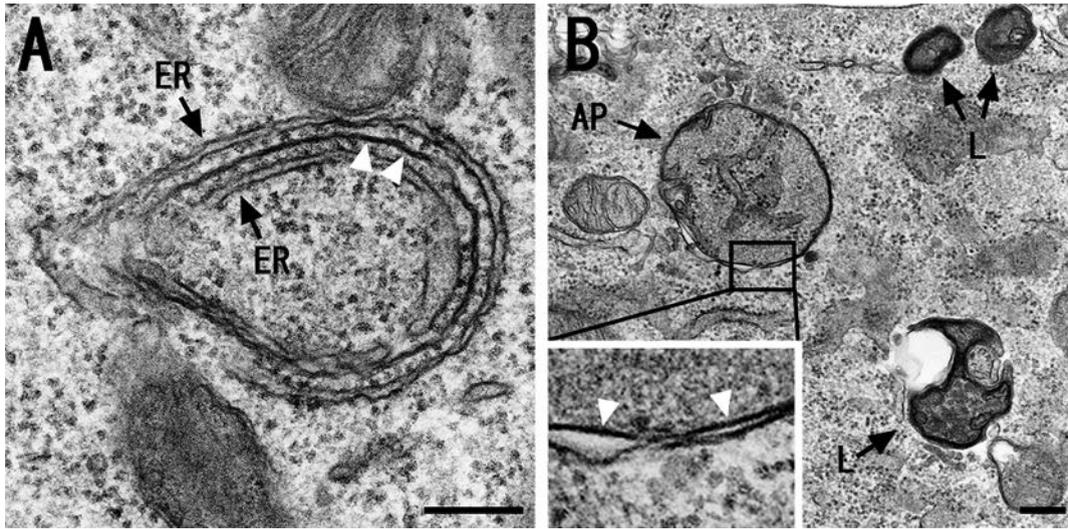


図2 オートファジー関連オルガネラの電子顕微鏡写真

MEF をハンクス液（アミノ酸を含まない）で2時間培養し、還元オスミウム法で固定処理した。A: 典型的な隔離膜（ファゴフォア）を示し、隔離されつつある領域は左側で細胞質とつながっている。高電子密度を有する隔離膜（白矢頭）が内外を粗面小胞体（ER）に挟まれており、典型的な小胞体—隔離膜複合体を成している（図3参照）。本固定法では、隔離膜における二重膜間の空隙が見られない。B: オートファゴソーム（AP）は二重膜で囲まれ（挿入図、白矢頭）、内容物として明瞭なERとリソソームが見られる。リソソーム（L）は全体的に電子密度が高く、不均一な内容物を含む。Bars = 200 nm. 文献22)より改変。

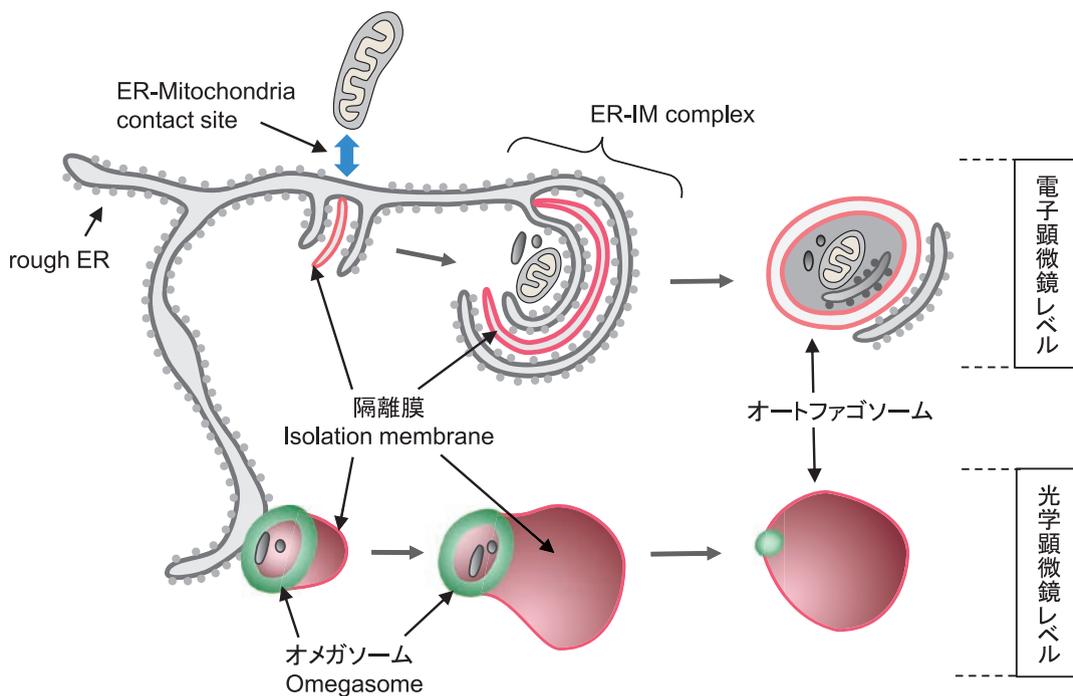


図3 オートファゴソーム形成の初期段階で観察される構造

小胞体（rough ER）由来の隔離膜（赤色）形成過程において、近年報告された構造物を模式図で示す。小胞体—隔離膜複合体（ER-IM complex）は電子顕微鏡レベルの構造であり、オメガソーム（omegasome, 緑色）は光学顕微鏡レベルの構造であることに留意。詳細は本文参照。

と融合する前の段階と理解されている。理論的にはアンフィソームの限界膜は2重膜部分と1重膜部分が共存するはずであるが（図1）、もし少量のリソソーム酵素が混在すれば分解が開始され得る。また、通常電子顕微鏡法で同定するのは困難で、エンドサイトーシス経路をラベルするためのト

レーサーが必要である。文献上はリソソーム酵素阻害剤であるロイペプチンを投与すると数が増える⁵⁾。細胞内小胞輸送の分野では、小胞が標的コンパートメントに正しく融合するためにSNARE（soluble NSF [N-ethylmaleimide sensitive factor] attachment protein receptor）分子が機能することが知ら

れている。最近はオートファゴソームと後期エンドソーム／リソソームの融合に必要な SNARE 分子として syntaxin17 と VAMP8^{6,7)} が同定され、オートリソソーム生成の意義は確立されつつあるが、アンフィソーム形成の重要性については今後の研究が必要であろう。

2.3 ミクロオートファジー

オートファジーの一種であり、リソソーム膜が内腔側に陥入した像が見つかれば、その可能性がある (図 1)⁸⁾。電子顕微鏡を観察していると比較的良く見つかるが、その形態の意義や機構はほとんど分かっておらず、本当にオートファジーと言えるのかも含めて謎である。エンドソームの一種である MVB の内部小胞形成過程は、細胞質部分を取り込む点に関してはミクロオートファジーと同じであるが、形態学的には大きく異なる。

3. オートファジー隔離膜の特性に合った固定法の選択

オートファジー隔離膜は他のオルガネラ膜と異なり、通常の固定法では明瞭に検出できない場合がある。我々の研究室では、通常 2%パラホルムアルデヒド—2%グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて実験動物の灌流固定や培養細胞の固定を行い、その後、2%四酸化オスミウム—3.75%ショ糖／0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で後固定している。この方法を用いると、経験的には特に培養細胞の観察で隔離膜が検出できないことが多かった (図 4A)。オートファジー隔離膜の特性については、凍結切断法により膜内粒子に乏しいことが報告されているため³⁾、通常タンパク質を介した化学固定法では、膜脂質が溶け出してしまう可能性が指摘されてきた。そのため、オートファジー隔離膜の保存に適した固定法として、イミダゾール緩衝液で調整したオスミウム液やフェロシアン化カリウムを含む還元オスミウム液による後固定が推奨されている⁹⁾。我々は、マウス胎児由

来線維芽細胞 (MEF) を観察する場合は後者の還元オスミウム法を用いている。すなわち、2%パラホルムアルデヒド—2%グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定し、洗浄後に 1%四酸化オスミウム—1.5%フェロシアン化カリウム／0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で後固定を行っている。その結果、オートファジー隔離膜の電子密度は特異的に高くなると共に、2重膜構造の膜間隙はほとんどなくなる (図 4B)。

4. 隔離膜生成に関する 3 つの特殊構造

次に、近年オートファジー隔離膜形成の研究に関連して発見された 3 つの重要な細胞内構造、すなわち小胞体—ミトコンドリア接触部位 (ER-mitochondria contact site, あるいは MAM [mitochondria-associated ER membrane]), 小胞体—隔離膜複合体 (ER-IM complex), オメガソーム (omegasome) について概説する。

オートファジー隔離膜の由来はその発見当時から長年の謎であった。1990年に Dunn は飢餓状態にしたラット肝臓において各種オルガネラマーカーを用いた免疫電顕法を行い、その結果、隔離膜は小胞体由来し、細胞膜、ゴルジ膜、エンドソーム膜は寄与しないと結論付けた¹⁰⁾。しかし最近、様々な先端解析により、細胞膜、ゴルジ膜、エンドソーム膜、さらにミトコンドリア膜も隔離膜形成に関わることが報告された¹¹⁻¹³⁾。古くからの電子顕微鏡観察からは小胞体起源説が有力であるものの、細胞種やオートファジー誘導法あるいは新規メカニズムに関連してその他のオルガネラが関わっていると考えられる。特にミトコンドリア起源説と小胞体起源説の両者をうまく説明する機序として、最近濱崎らは、隔離膜形成が ER-mitochondria contact site から開始されると報告した¹⁴⁾。彼女らによれば、小胞体上に隔離膜形成部位が存在し、そこにミトコンドリアが接触を繰り返すことで隔離膜が形成

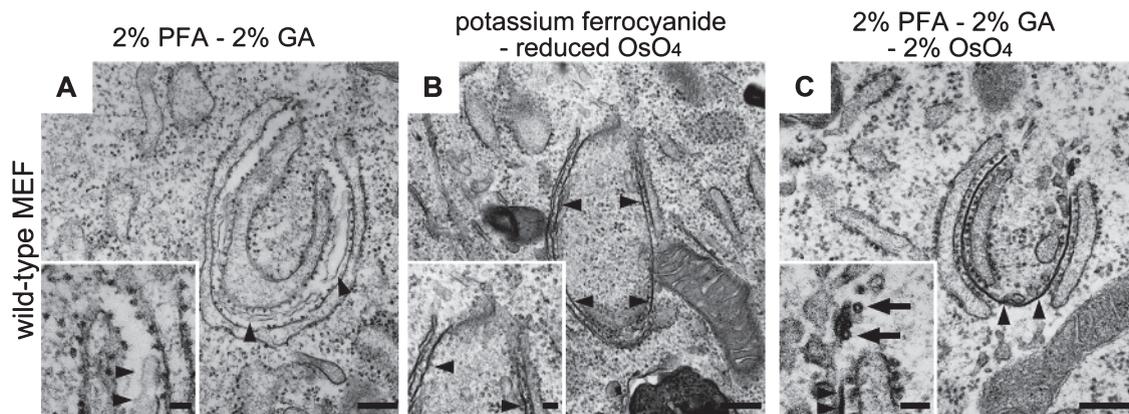


図 4 化学固定法による隔離膜形態の比較

野生型 MEF (wild-type MEF) をハンクス液で 2 時間培養してオートファジーを誘導し、2%パラホルムアルデヒド—2%グルタルアルデヒド—0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (A)、フェロシアン化カリウム—還元オスミウム法 (B)、2%パラホルムアルデヒド—2%グルタルアルデヒド—2%四酸化オスミウム—0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) (C) で固定し、小胞体—隔離膜複合体を電子顕微鏡観察した。矢頭は隔離膜、矢印は IMAT を示す。詳細は本文参照。Bars = 200 nm, 挿入図 50 nm. 文献 18) より転載。

されるという (図 3)。

小胞体と隔離膜が連続していることを電子顕微鏡レベルで、しかも電子線トモグラフィー法を用いて 3D 観察により証明したのが、西野一林らである¹⁵⁾。彼女らは、飢餓によるオートファジー誘導下の細胞を観察することにより、隔離膜が粗面小胞体に挟まれた状態 (ER-IM complex) で生成、伸張することを提唱し、さらに細い小管が隔離膜と小胞体とを繋いでいることを明らかにした (図 3 上段)。同様の結論は Ylä-Anttila ら¹⁶⁾ によっても報告されている。一方、光学顕微鏡観察からも小胞体由来説を支持する重要な知見が得られた。Axe らは、GFP を付加した double FYVE domain-containing protein 1 (DFCP1) を指標にしてその分子が局在する phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) ドメインを解析した。その結果、アミノ酸飢餓刺激を行うと GFP-DFCP1 は小胞体付近のリング構造として出現し、その中央部が隔離膜となって突出し、リングが閉じることでオートファゴソーム形成が完了していた (図 3 下段)¹⁷⁾。彼女らはこの PI3P に富むドメインをオメガソームと命名し、隔離膜の前駆体構造と結論付けた。

5. 新たな固定法による新たな膜構造体の発見

オメガソームの発見は画期的であったものの、光学顕微鏡レベルの構造である故にその微細形態の詳細は不明であっ

た。しかしごく最近、我々の研究室ではその一端を見出すことに成功した。オメガソームリングが閉じて点状になる部分を correlative light and electron microscopy (CLEM) で観察すると、そこは隔離膜が閉鎖する縁の部分に相当していた。さらに、新規固定法を開発して同部位を集中して観察すると、多数の極細管クラスターが存在していた。この細管は小胞体と隔離膜を繋いでおり、その形態学的特殊性から電子顕微鏡レベルの名称として IMAT (isolation membrane-associated tubule) を提唱した¹⁸⁾。興味深いことに IMAT の直径は約 30 nm であり、通常の輸送キャリアーが 50–100 nm 程度であることを考えるとサイズから見ても特殊であることが分かる。前述したように、既に小胞体と隔離膜を繋ぐ小管の存在は報告されているが^{15,16)}、実際は細管がクラスターを形成するほどたくさん存在していたことになる。また、MEF 以外にも HeLa 細胞、NRK 細胞、ARPE-19 細胞、Huh-1 細胞でも見出されており、普遍的に存在する構造であることが分かった¹⁸⁾。

文献を調査した限り、過去に IMAT 相当の構造は報告されていない。今回、我々は特殊な固定法、すなわち 2%パラホルムアルデヒド–2%グルタルアルデヒド–2%四酸化オスミウムを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を初期固定液に用いることで、偶然にも IMAT の観察に成功した。四酸化オスミウムをグルタルアルデヒドと混合して初期固定液に用いる方法は 1960 から 1970 年代にも紹介されており^{19,20)}、

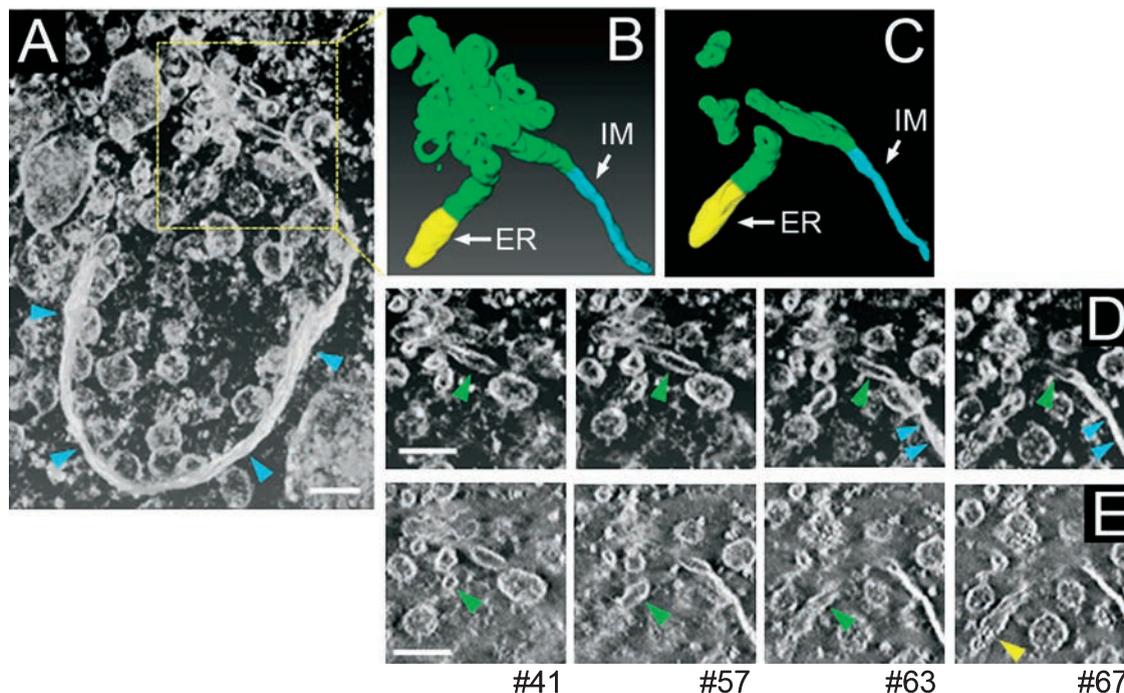


図 5 電子線トモグラフィーによる隔離膜、小胞体、IMAT の構造解析

アミノ酸飢餓によりオートファジーを誘導した野生型 MEF を 2%パラホルムアルデヒド–2%グルタルアルデヒド–2%四酸化オスミウム–0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) で固定、包埋した。約 200 nm 厚切片を電子線トモグラフィーで観察し、75 枚のスタック画像として取得した。(A) ファゴフォア (青矢頭) のプロジェクション画像。四角枠部分に見られる小胞体 (ER, 黄)、隔離膜 (IM, 青)、細管集合体 (IMAT, 緑) を抽出、立体構築し (B)、さらに 4 つの IMAT を抽出した画像を C に示す。また、同部分における Z 軸方向の連続画像を D および E に示す。IMAT (緑矢頭) の内腔は隔離膜 (青矢頭)、あるいは ER (黄矢頭) と連続している様子が分かる。Bars = 100 nm. 文献 18) より転載。

脂質膜の迅速な固定とグルタルアルデヒドの膜透過性向上が期待される固定法である。オメガソームは PI3P が豊富であること、膜内粒子に乏しい隔離膜の前駆体であることなどの特性が、本固定法に向いていた理由ではないかと推測している。IMAT は隔離膜の閉鎖過程で見られる構造であるが、各種 Atg 遺伝子を欠損した MEF で詳しく調べたところ、隔離膜形成の初期過程でも同様に働くことが示唆された。今後、小胞体から IMAT が形成される分子機構の解明に弾みがつくことを期待している。

6. おわりに

オートファジー分野は Atg 関連遺伝子の機能解析の広がりとともに、それら反応の場であるオルガネラとその形態解析にも新風を起し、新たな疑問を提起している。例えば、前述したマイクロオートファジーは本当に存在するのか、制御分子機構は何か。そして今回は言及しなかったが、オートリソソームからリソソーム前駆体が再生される機構として autophagic-lysosomal reformation という現象が提唱されており²¹⁾、しばしば議論になる。本稿が次なる形態研究プロジェクトのヒント、新発見に繋がれば幸いである。

謝 辞

電子顕微鏡観察において多大な技術的支援を頂いた菅野勝行氏に感謝します。本研究は JSPS 科研費 21659045, 24390048, および福島県立医科大学研究助成金を受けて行われたものです。

文 献

- 1) van der Vaart, A., Mari, M. and Reggiori, F.: *Traffic*, **9**, 281–289 (2008)
- 2) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467 (2009)
- 3) Kovacs, A.L., Palfia, Z., Rez, G., Vellai, T. and Kovacs, J.: *Autophagy*, **3**, 655–662 (2007)
- 4) Li, Y.C., Li, Y.N., Cheng, C.X., Sakamoto, H., Kawate, T., Shimada, O. and Atsumi, S.: *Neurosci. Res.*, **53**, 298–303 (2005)
- 5) Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Berg, T. and Seglen, P.O.:

- J. Biol. Chem.*, **273**, 21883–21892 (1998)
- 6) Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. and Mizushima, N.: *Mol. Biol. Cell* (2014)
- 7) Itakura, E., Kishi-Itakura, C. and Mizushima, N.: *Cell*, **151**, 1256–1269 (2012)
- 8) Pfeifer, U.: functional morphology of the lysosomal apparatus. in Glauman, H. and Ballard, F.J. (Eds.) *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*, Academic Press, New York, 3–59 (1987)
- 9) Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Eskelinen, E.L.: *Methods Enzymol.*, **452**, 143–164 (2009)
- 10) Dunn, W.A., Jr.: *J. Cell. Biol.*, **110**, 1923–1933 (1990)
- 11) Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K. and Lippincott-Schwartz, J.: *Cell*, **141**, 656–667 (2010)
- 12) Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. and Rubinsztein, D.C.: *Nat. Cell Biol.*, **12**, 747–757 (2010)
- 13) Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M. and Tooze, S.A.: *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1860–1873 (2012)
- 14) Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A. and Yoshimori, T.: *Nature*, **495**, 389–393 (2013)
- 15) Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. and Yamamoto, A.: *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1433–1437 (2009)
- 16) Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Eskelinen, E.L.: *Autophagy*, **5**, 1180–1185 (2009)
- 17) Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G. and Ktistakis, N.T.: *J. Cell Biol.*, **182**, 685–701 (2008)
- 18) Uemura, T., Yamamoto, M., Kametaka, A., Sou, Y.S., Yabashi, A., Yamada, A., Annoh, H., Kametaka, S., Komatsu, M. and Waguri, S.: *Mol. Cell Biol.*, **34**, 1695–1706 (2014)
- 19) Audrey, M.G.: in Audrey, M.G. (Ed.), *Fixation, dyhydration and embedding of biological specimens*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1975)
- 20) Hayat, M.: *Fixation for electron microscopy*, Academic Press, New York, (1981)
- 21) Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E.H. and Lenardo, M.J.: *Nature*, **465**, 942–946 (2010)
- 22) 谷田以誠, 上野 隆, 和栗 聡: *実験医学*, **29**, 2054–2062 (2011)