動物細胞におけるマクロオートファジーによるミトコンドリア分解に関する検討

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Kawai, Akinori
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/3652

博　士　論　文

動物細胞におけるマクロオートファジーによる
ミトコンドリア分解に関する検討

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻
動態生理学講座

氏名　河合昭典
主任指導教員名　中村暢宏

目次

第１章　序論 3

第２章　オートファゴソームーリソソーム融合と酸性顆粒内部環境との関係 8

第１節　はじめに 8

第２節　結果と考察 9

第１項　マクロオートファジーにおけるオートファゴソームとリソソーム の融合 *9*

第２項　酸性顆粒内部 pH の上昇によるオートファゴソームとリソソームの融合阻害 *12*

第３章　マクロオートファジーによるミトコンドリア分解速度の特徴 15

第１節　はじめに 15

第２節　結果と考察 16

第１項　アミノ酸及び血清飢餓条件下における mtGFP の影響 *16*

第２項　マクロオートファジーによる mtGFP 分解速度測定法の確立 *18*

アミノ酸及び血清飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度の変化 18

オートファジー阻害剤の飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度変化への影響 18

プロテアソーム阻害剤の飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度変化への影響 19

オートファジー分解速度のミトコンドリア分解の選択性に対する影響 21

まとめ 22

第３項　誘導刺激の違いがオートファジーに及ぼす影響 *23*

誘導刺激の違いがミトコンドリアの分解速度に及ぼす影響 23

誘導刺激の違いがオートファゴソーム形成に及ぼす影響 23

まとめ 25

第３節　総括 26

材料と方法 29

略語一覧 33

引用文献 34

謝辞 44

第１章　序論

今から約 60 年前、私たちの身体のタンパク質が常に新しく作られる一方で壊されているという現象が発見された。Schoenheimer らは、体内のタンパク質が常に一定の割合で分解されながら新たに合成されたものによって置き換わっていく事を明らかにし、それをターンオーバー（代謝回転）とよんだ[1]。その後の研究から、すべてのタンパク質は各々固有の寿命をもっており、それは様々な外的要因、内的要因で制御されていること、またタンパク質の合成速度はその構成要素であるアミノ酸のレベルに強く影響されるため、細胞内のアミノ酸濃度は厳密に制御されていることが明らかとなった。細胞内アミノ酸のプールは、外界から取り込んだタンパク質を消化することによって生じたアミノ酸の吸収によるものや、細胞や個体を構成している自己タンパク質の分解によるものからなるが、後者の寄与の方が大きい。つまり、生体内におけるタンパク質分解システムは、従来考えられていたような受動的な過程ではなく、エネルギーを必要とする積極的なプロセスであることが明らかとなったのである[2]。

自己タンパク質の分解は現在大きく分けて２つの系に大別されると考えられている。すなわち細胞質におけるユビキチン／プロテアソーム系とリソソーム／液胞系である。ユビキチン／プロテアソーム系は、主に短寿命タンパク質分解に働く。分解されるタンパク質の多くは分解に先立ちポリユビキチン化され、ポリユビキチン化タンパク質は、タンパク質分解装置プロテアソームによって速やかに選択的に分解される。プロテアソームの存在量は細胞質全タンパク質の１％以上にも及び、タンパク質の分解が細胞にとっていかに重要であるかを示している[3, 4]。一方、リソソーム／液胞系は主に細胞を構成する全蛋白質の約 99%を占める長寿命タンパク質を分解する役割を担っており、大部分はオートファジーとよばれる経路を介する[5-7]。分解された蛋白質は細胞のアミノ酸プールに入り再利用可能となる（Fig. 1）。

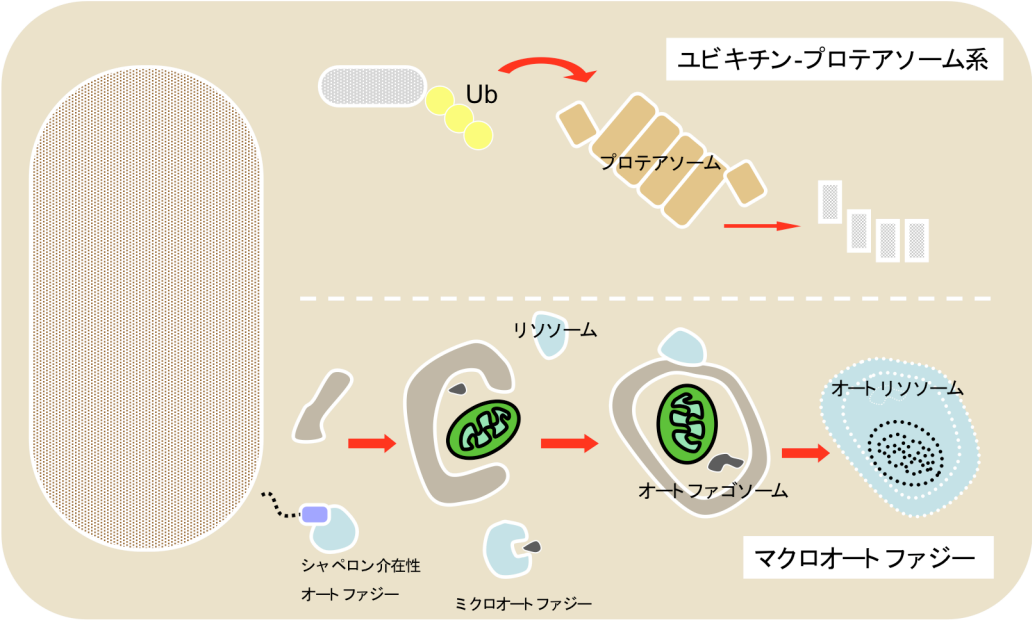

Figure 1. 動物細胞におけるタンパク質分解機構

上段は、ユビキチン／プロテアソーム系、下段はリソソームを介したタンパク質分解系の模式図

現在までに考えられているリソソームへの細胞質タンパク質輸送機構は５つに分類される。第１が“マクロオートファジー”とよばれている過程である。この過程は、まず細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれて二重膜、時には多重の膜構造体であるオートファゴソームを形成する。次にエンドソームと融合しながら成熟し、最後にリソソームと融合してオートリソソームとなり分解する[8-11]。第２は“ミクロオートファジー”とよばれている過程である。これは、リソソーム膜が陥入して細胞質の一部をリソソーム内へと喰いちぎるシステムであり、オートファゴソームは関与しない[12-14]。第３は“Cvt 経路”とよばれている過程である。これは、酵母のアミノペプチターゼ I の輸送経路で、マクロオートファジーと類似しており、多くの分子装置を共有している[15, 16]。第４は“シャペロン介在性オートファジー”とよばれている過程である。これ

は、タンパク質がリソソーム膜を直接透過する経路で、認識シグナルとしてKFERQ 様配列をもつタンパク質を特異的に分解する。全細胞質タンパク質の約30%がこの配列をもつといわれている。栄養飢餓などによってこの経路が活性化されると、細胞質シャペロンである hsc73 によってこの配列が認識され複合体を形成し、リソソーム膜にあるレセプター Lamp-2a に結合してリソソーム内へと運ばれる[17, 18]。第５は“ペキソファジー”とよばれている過程である。これはペルオキシソームを選択的に特有の膜動態で分解するオートファジーで、メタノール酵母でみられる。マクロペキソファジーとミクロペキソファジーの２つの経路がある[19, 20]。

さて、オートファジーの役割はいまだ完全には明らかにされていないが、これまでの研究からいくらか推測できる。オートファジーは基本的には常に進行している過程であり、細胞質タンパク質やオルガネラの定常状態の代謝回転に働いていると考えられるが、細胞内外の状況によっても大きく変動しうる。もっともよく知られている誘導条件は栄養素の枯渇である。これはタンパク質合成や糖新生に必要な細胞内のアミノ酸プールを確保するためと理解される。出生直後飢餓に陥る新生児ではオートファジーが強く誘導される[21]。培養細胞においても、アミノ酸飢餓や血清飢餓で容易にオートファジーは誘導される[6, 19, 22]。さらに、オートファジーは不要となった物質の積極的な除去も行っていると考えられている。例えば、オートファジーは細胞内に侵入した一部のウィルスを分解し、宿主を守る[23-25]。また、フェノバルビタールによって肝細胞に異常に誘導された小胞体は、薬剤除去によって速やかにオートファジーにより分解される[26, 27]。また最近では、培養細胞において膜電位が弱くなったような損傷ミトコンドリアが選択的に分解されるという報告[28-31]や、過剰なペルオキシソームが選択的に分解されるという報告もある[32]。オルガネラだけではなく、不要あるいは有害な蛋白質凝集体についても、オートファジーは恒常的または積極的な分解にはたらいているといわれている[33, 34]。オートファジーが利用される特殊な例として、肺胞サーファクタントの生成や内因性抗原の MHC クラスⅡへの提示への関与が示されている[35]。このような主要な分解機構であ

るにも関わらず、通常、電子顕微鏡観察下でオートファゴソームの姿は稀にしか観察されない。これは他のオルガネラと異なり、オートファゴソームの半減期が 5 分から 10 分と非常に短いことによると考えられる。また、逆にこの短い半減期によって、オートファゴソームの占める細胞内容積が小さいにもかかわらず、オートファジーによる相当量のタンパク質分解が可能となっていると考えられる。肝臓では自己のタンパク質が最大１時間に４ー６％も分解されうる[6, 36]。

一方、オートファジーの分子機構の遺伝学的解析は 1992 年に大隅らのグループによって酵母でオートファジーが起きることが報告されてから急速に進展してきた[8]。酵母細胞内の主要な構造体（オルガネラ）は、ヒト細胞でも見られ進化上よく保存されている。これまで酵母は遺伝的・分子生物学的研究法の優位性を背景に、真核細胞の膜動態や分泌経路の理解に多大な貢献をしてきた。オートファジーの解析においても、酵母は多細胞生物とは異なり１細胞で１個体であり、１細胞でのオートファジーが１個体における生死につながること、また飢餓状態を誘導しやすいことから、優れたモデル系となった。酵母オートファジーは様々な栄養源の枯渇により誘導され、細胞は細胞質の一部を膜で取り囲み、細胞質中に二重膜構造体である“オートファゴソーム”を形成する。その後直ちに液胞膜と融合し内膜に囲まれた構造体（オートファジックボディー）は液胞内へと放出され、液胞内の加水分解酵素によって分解される[37]。この酵母オートファジーの成熟に関わる遺伝子（ATG）は、大隅グループを筆頭にいくつかの研究グループで単離され解析されてきた。さらにその関連因子は、ヒトを含めた幾つかの種においてよく保存されており、その発現量や局在性、機能などが解明されつつある。

例えば、酵母 *ATG8* の哺乳動物オーソログである LC3 は、オートファジーが誘導されるとオートファゴソームに結合することや [38]、酵母 Apg5 の哺乳動物オーソログは、オートファジーが誘導されると隔離膜に結合し、オートファゴソーム形成とともに膜から離脱することが解明され、これらの因子を用いた系により電子顕微鏡を用いることなくオートファジーの成熟をモニターすること

が可能になった[36]（Fig. 2）。

しかし、オートファジー機構後半のリソソームでの分解段階をモニターする報告はなく、その調節機構や分解速度などは明らかでない。そこで本研究では、マクロオートファジーでのみ分解されることが示されているオルガネラの１つであるミトコンドリアの分解をマクロオートファジーの指標とし、蛍光標識したミトコンドリアの分解速度を蛍光定量法により定量化する方法を開発した。さらに各種条件での分解速度の比較検討を行うとともに、形態学的観察を行ってオートリソソーム形成の分子機構の解析を行った。

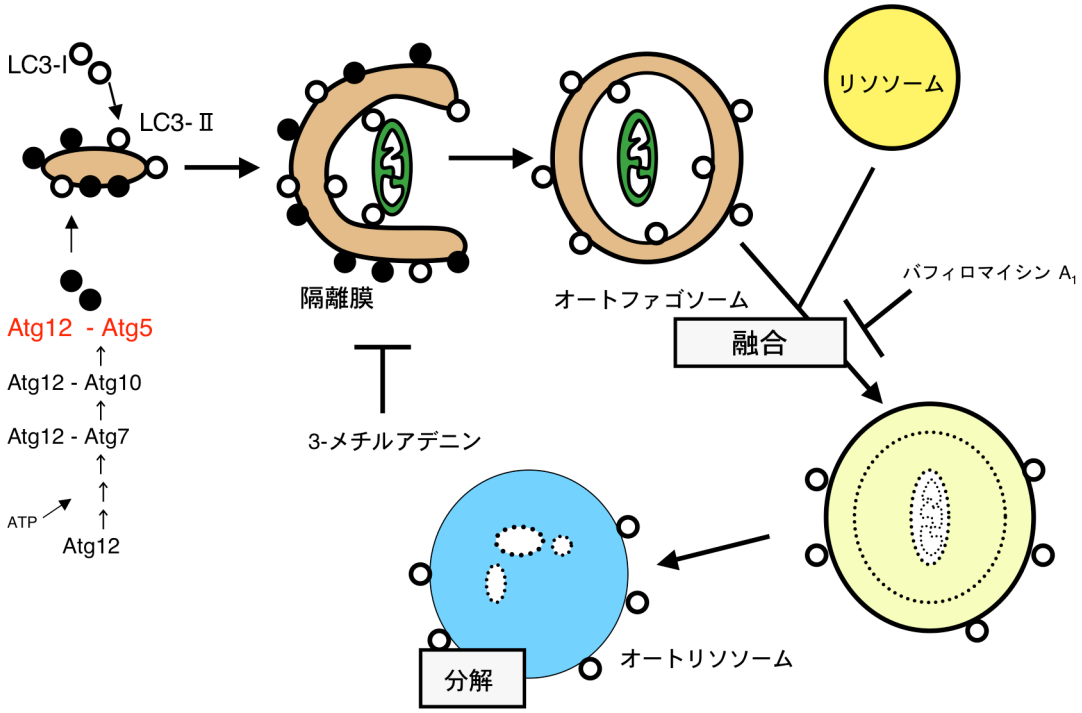

Figure 2. 動物細胞におけるマクロオートファジーの機構

マクロオートファジーが誘導されると、隔離膜が出現し、オートファゴソームを形成、さらにリソソームと融合しオートリソソームを形成する。この系には２つの Atg 結合系が存在することが報告されている。Atg12 は Atg7、Atg10 との結合を経て、Atg5 と結合し、隔離膜に結合する。また、LC3 もオートファジーが誘導されると隔離膜に結合し、オートファゴソーム形成に関わることが報告されている。

第２章　オートファゴソームーリソソーム融合と酸性顆粒内部環境との関係

第１節　はじめに

オートファジーとは、細胞がオルガネラを含む自己の構成成分をリソソームで分解する機構である。そのうちの１つであるマクロオートファジーは、従来から電子顕微鏡観察でその存在が報告されていたがその機構は長い間不明であった。しかし、酵母においてもその存在が明らかとなり[8, 39]、その実態が明らかにされてきた。マクロオートファジーが誘導されると、新しく小さな隔離膜が形成される。それは PAS （pre-autophagosomal structure）として、最近酵母で同定された[40]。 その膜が拡張することで細胞内構成成分を主に非選択的に囲い込み、オートファゴソームが形成される。さらにエンドソーム[9-11, 41]、リソソームと融合することでオートリソソームが形成され、加水分解酵素の働きで内部は完全に分解される(Fig. 2)。

V-ATPase の選択的阻害剤である bafilomycin A_1 は、マクロライド系の抗生物質の一つで、V-ATPase をもつオルガネラ（リソソームやエンドソームなど）の内部酸性化を阻害する[42]。また、哺乳動物細胞の bafilomycin A_1 処理において V-ATPase が阻害されると、オートファゴソームとリソソームやエンドソームとの融合が阻害され、細胞質にオートファゴソームが蓄積し、オートリソソームが減少することが報告されている。これは、酸性オルガネラ内部の酸性化阻害がオートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、結果的にオートファジーによる分解を阻害することが示唆される[11]。しかし、現在のところ明確な証拠はなく、直接的に融合と分解を追跡した報告や、オルガネラ内部の pH が融合を制御している証拠を示す報告はない。

そこで、本研究では オートファゴソームとリソソームの融合の指標を構築することを試みた。さらに、この系を用いて直接的に、オートファゴソームとリソソームの融合には酸性顆粒の pH が関わっていることを証明することを試みた。

第２節　　結果と考察

第１項 マクロオートファジーにおけるオートファゴソームとリソソーム の融合

オートファジーが誘導されると、ミトコンドリアはオートファゴソームに取り込まれ、その後オートファゴソームはリソソームと融合する。ミトコンドリアを取り込んだオートファゴソームとリソソームとが融合した段階（オートリソソーム）をモニターするために、ミトコンドリアとリソソームを蛍光によって標識し、それらの共局在によりオートリソソームを検出した。ミトコンドリアを標識するために、ミトコンドリアマトリックスに存在するオルニチントランスカルバミラーゼのプレ配列（pOTC）を付加した GFP を安定発現する CHO-K1 細胞（mtGFP-CHO 細胞）を作製した[43]。mtGFP-CHO 細胞はミトコンドリアが GFP（緑）によって標識された CHO 細胞である。リソソームが標識されるために、Texas red Dextran（赤）を細胞に取り込ませた。これは、エンドサイトーシスによってリソソームに運ばれ、リソソームに蓄積することでリソソームを標識する。

オートファジーを誘導するために、Texas Red Dextran を取り込ませた mtGFP-CHO 細胞の培地をアミノ酸及び血清飢餓 F-12 培地に交換し、6 時間インキュベートした。このとき、ミトコンドリアの分解を阻害するためにプロテアーゼ阻害剤を共処理した。固定後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。その結果、栄養状態の細胞ではなくアミノ酸及び血清飢餓処理した細胞でのみ、ミトコンドリアの一部はリソソームと共局在した（Fig. 3A, 3B)。この共局在はオートファジー経路のオートリソソームの段階を示していると考えられる。共局在部位の 3D image を共焦点レーザー走査顕微鏡で構築したところ、顆粒状の mtGFP は、酸性コンパートメントによって完全に囲まれていることが確認できた（Fig. 3C)。

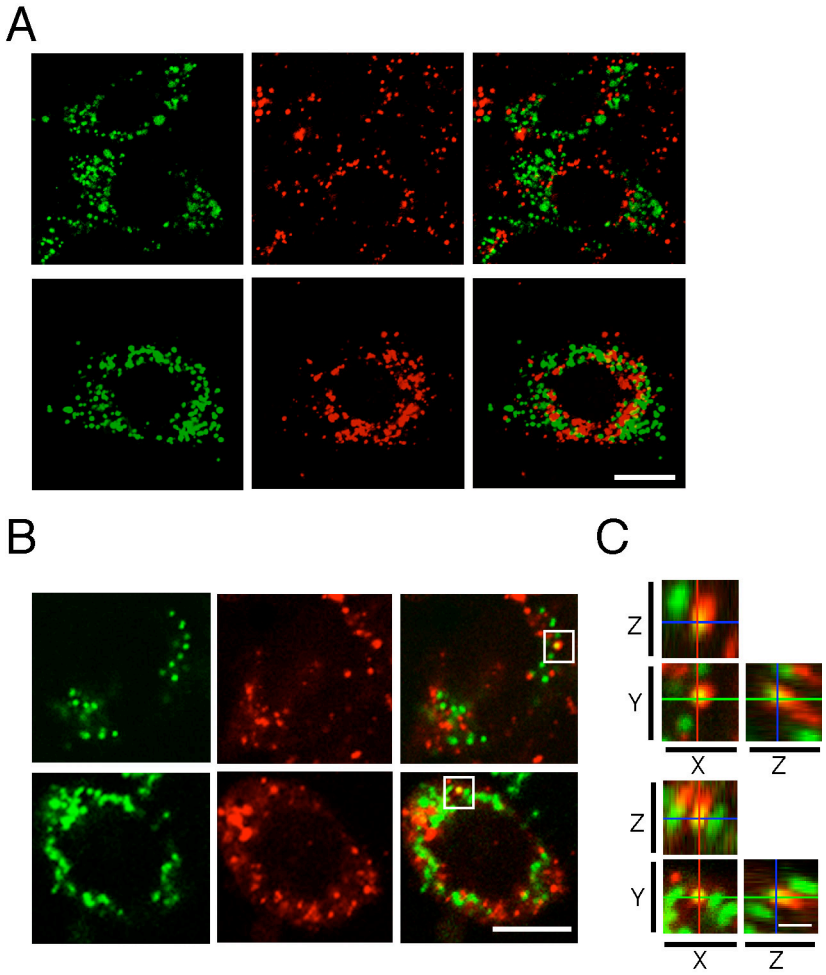

Figure 3. 飢餓処理細胞におけるミトコンドリアとリソソームの共局在

Texas Red Dextran でリソソームを標識した mtGFP-CHO 細胞を、プロテアーゼ阻害剤存在下で通常培地（A 上段）またはアミノ酸及び血清飢餓培地（A 下段、B、C）で６時間培養した.その後細胞を固定し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。(A, B) 左；mtGFP(緑)、中央；Texas Red Dextran（赤)、右；merge（黄色は mtGFP と Texas Red Dextran の共局在を示す）. (B)はより鮮明な共局在写真. Bar=10 μm.(C)(B-白枠内)の３次元画像. 各々、上段；x-z image. 左下段；x-y image 右下段；y-z image. 図中の緑線、青線、赤線は各々x-z 切片, x-y 切片, y-z 切片の位置を示す. Bar=2 μm.

次に、オートファジーを誘導するラパマイシン処理条件下[44, 45]、またオートファジーを阻害する 3-methyladenine（3-MA）処理条件下[46]において、同様の観察を行った。mtGFP と Texas Red Dextran の共局在は、ラパマイシン処理細

胞では観察できたが（Fig. 4A)、3-MA を含むアミノ酸及び血清飢餓飢餓培地で処理した細胞では観察できなかった（Fig. 4B)。つまり、この共局在はオートファジー誘導条件下でのみ観察でき、オートファゴソームとリソソームの融合段階を示しているといえる。

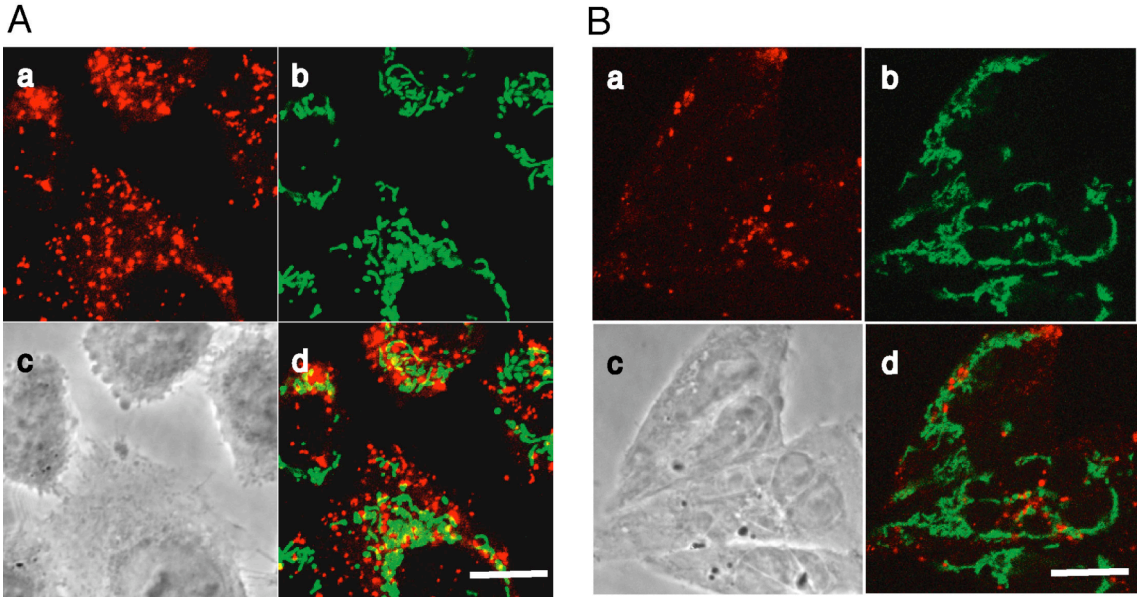

Figure 4. オートファジーとミトコンドリアとリソソームの共局在

Texas red Dextran でリソソームを標識した mtGFP-CHO 細胞を、プロテアーゼ阻害剤存在下でラパマイシン含有通常培地（A）または 3-MA 含有アミノ酸及び血清飢餓培地（B）で各々12 時間、6 時間培養した。その後細胞を固定し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した.(a) Texas Red Dextran（赤）.(b) mtGFP(緑）.(c)位相差像.(d) merge（黄色は mtGFP と Texas Red Dextran の共局在を示す）.Bar=10 μm.

第２項　酸性顆粒内部 pH の上昇によるオートファゴソームとリソソームの融合阻害

bafilomycin A_1 は V-ATPase に対する選択的阻害剤である。それはまたオートファゴソームとリソソームの融合を阻害することが報告されている。この融合阻害が、V-ATPase の阻害によるものか酸性顆粒の pH 上昇によるものかどうかを検討するために、V-ATPase 活性非依存的に酸性顆粒の pH を上昇させる、塩基性薬物（塩化アンモニウム，クロロキン）や酸性イオノフォア（ナイジェリシン）を細胞に処理し[47]、mtGFP と Texas Red Dextran の共局在の有無を観察した(Fig. 5)。その結果、これらすべての処理条件下においてミトコンドリアとリソソームの共局在は観察できなかった。従って、酸性顆粒の pH の上昇がオートファゴソームとリソソームの融合阻害を直接的に引き起こしている事が強く示唆された。

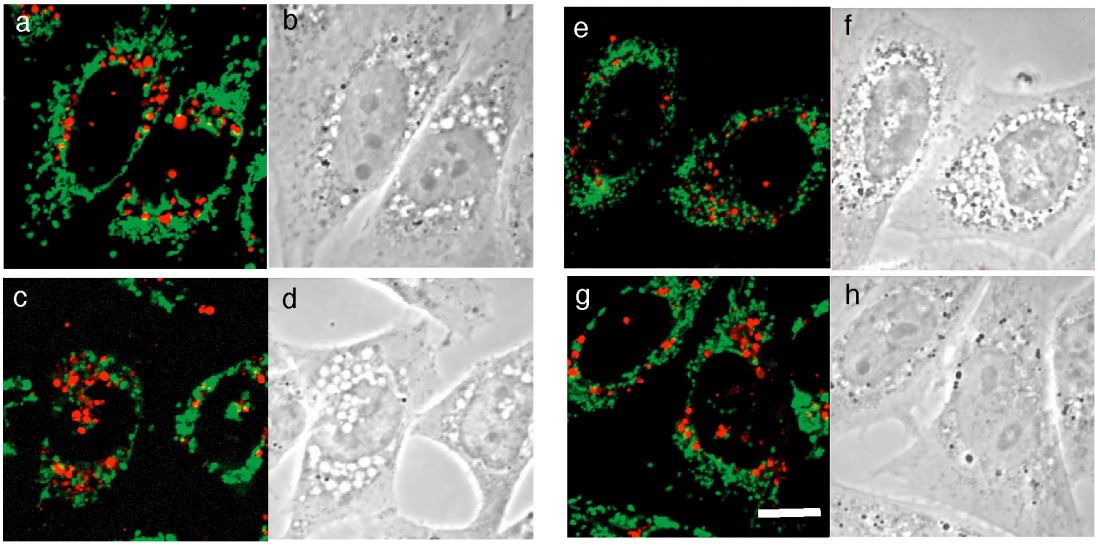

Figure 5. 塩基性薬物や酸性イオノフォア処理とミトコンドリアとリソソームの共局在
ミトコンドリアとリソソームの共局在を、Fig. 3 と同様の方法で解析した.(a, b) 10mM 塩化アンモニウム含有アミノ酸及び血清飢餓培地処理. (c, d) 25μM クロロキン含有アミノ酸及び血清飢餓培地処理. (e, f) 2μg/ml ナイジェリシン含有アミノ酸及び血清飢餓培地処理. (g, h) 100nM バフィロマイシン A_1 含有アミノ酸及び血清飢餓培地処理. (a,c,e,g) 蛍光像. (b,d,f,h) 位相差像. 赤；Texas Red Dextran. 緑； mtGFP. 黄色は mtGFP と Texas Red Dextran の共局在を示す. Bar=10 μm.

一方、これらの薬剤は、細胞質に空胞の形成を誘導する。この空胞形成がミトコンドリアとリソソームの共局在を間接的に阻害しているのか否かを調べる

ために、酸性顆粒の pH を上昇させずに空胞形成を誘導することを試みた。mtGFP-CHO 細胞を 20mM sucrose を含むアミノ酸及び血清飢餓培地で 6 時間処理し、同様にミトコンドリアとリソソームを蛍光観察した。その結果、リソソームとミトコンドリアの共局在は、通常の飢餓条件下でみられたように観察された。従って、オートファゴソームとリソソームの融合は、細胞内部の空胞化によって間接的に阻害されているのではないと結論された（Fig. 6)。

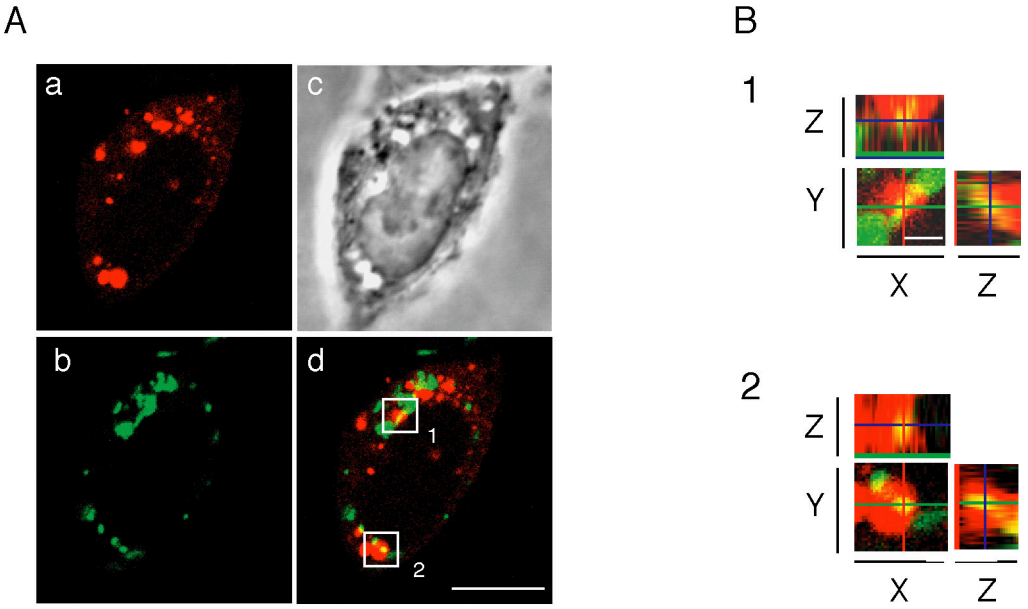

Figure 6. sucrose 処理による空胞形成時のミトコンドリアとリソソームの共局在.

ミトコンドリアとリソソームの共局在を、Fig. 3 と同様の方法で解析した.20mM sucrose 含有アミノ酸及び血清飢餓培地で 6 時間培養した mtGFP-CHO 細胞を固定し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した.(a) Texas Red Dextran（赤）(b) mtGFP(緑) (c)位相差像(d) merge（黄色は mtGFP と Texas Red Dextran の共局在を示す）Bar=10 μm.(B)(A-d)の白枠内(1, 2)の 3 次元画像. 各々、上段；x-z image. 左下段；x-y image 右下段；y-z image. 図中の緑線、青線、赤線は各々x-z 切片, x-y 切片, y-z 切片の位置を示す. Bar=2 μm.

以上の結果は、オートファゴソームとリソソームの融合が、V-ATPase とは無関係に酸性顆粒の pH を上昇させることによって阻害されることを示している。従って、酸性顆粒の pH が低いことがオートファゴソームとリソソームの融合に重要であることが示唆された。

小胞内部の酸性化が輸送に必須であることを示すいくつかの報告がある[48-52]。例えば、エンドソームの成熟、リソソームとの融合にはV-ATPase活性が必要といわれている[48, 52]。従って、オートファジーにおいても酸性オルガネラ内部pHが融合を調節している可能性がある。また、オートファゴソームはリソソームと融合する前にエンドソームと融合するが[41]、bafilomycin A_1処理してもオートファゴソームとエンドソームの融合は阻害されないことが報告されている[53]。従って、エンドソーム内pH低下の阻害は、オートファゴソームとの融合に影響しないと考えられる。一方、エンドソームと融合したオートファゴソームpH低下の阻害が、リソソーム内pH低下の阻害とともに膜融合阻害が引き起こされる原因となっている可能性は否定できない。この可能性を検証するためには、オートファゴソームのpHの変化を測定する必要があろう。

リソソーム内が酸性でなければ、オートファゴソームと融合しても中身を分解できないため生理的意味がないばかりか有害であるかもしれない。そのためリソソーム内pHを感知して無役な融合を回避する系があるのかもしれない。しかし、酵母においては、bafilomycin A_1処理すると、液胞内にオートファゴソームが蓄積し液胞内での分解は阻害されるが、オートファゴソームは液胞と正常に融合し、その細胞質への蓄積はみられない[8, 54]。酸性顆粒pHによる融合の制御機構は、高等生物特有の現象である可能性も考えられる。

第３章　マクロオートファジーによるミトコンドリア分解速度の特徴

第１節　はじめに

酵母におけるオートファジー研究の進展によって、様々な方法でオートファジーを追跡する試みが成されてきた。遺伝学的解析として、酵母 ATG8 がオートファゴソーム形成過程の指標として用いられた[55]。哺乳動物細胞においては、オートファゴソーム形成の指標として Atg5 や LC3 が用いられ、現在広く利用されている[36, 38, 56](Fig. 2)。このような知見により、“オートファゴソーム形成”の追跡は大変容易となった。しかし“分解”を直接追跡することはできていない。大隅らのグループは、出芽酵母において液胞膜タンパク質であるアルカリホスファターゼ（ALP）を用いた“ALP アッセイ”とよばれる方法を考案した。ALP は小胞輸送経路を介して直接液胞膜に輸送されると、液胞でプロセシングされ細胞質型から液胞型に変換される。野生型 ALP を欠損させ、代わりに膜貫通部位を欠如した ALP を発現させると、液胞に直接輸送されない ALP 前駆体が細胞質に蓄積する。この株では、オートファジーを誘導すると ALP 前駆体がオートファゴソームを経て液胞に運ばれ活性化する。そしてその変異 ALP の活性化レベルを測定することでオートファジーの追跡が可能となる[57]。この方法はきわめて特異性が高く、かつ鋭敏であるが、現在のところ哺乳動物においてこの原理を利用した方法は成功していない。そこで、本研究ではマクロオートファジーによる分解速度を調べることを目的として、ミトコンドリアの分解速度を測定することを試みた。ミトコンドリアは通常状態では簡単に分解されないことから、オートファジー分解を追跡するのに適している[58]。また、形態が明らかであり視覚的なアプローチが可能である。前章の研究で作製したミトコンドリアに移行する GFP を発現する CHO 細胞を利用し、その蛍光の変化を飢餓処理後経時的に追跡した。

第２節　結果と考察

第１項　アミノ酸及び血清飢餓条件下における mtGFP の影響

前章の研究で作製した mtGFP-CHO 細胞を用いて、まず培地のアミノ酸と血清を除いて飢餓状態にしてオートファジーを誘導した時の mtGFP の蛍光強度と局在、タンパク質量の変化を解析した[38, 59]。mtGFP-CHO 細胞をアミノ酸及び血清飢餓培地で 12 時間培養後、固定し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。通常培養条件下とアミノ酸及び血清飢餓条件下でミトコンドリアの構造や分布に影響はなかったが、通常培養条件下と比べてアミノ酸及び血清飢餓培養条件下の mtGFP の蛍光強度は、約 40 %減少していた (Fig. 7A, B)。次に、同じ処理をした mtGFP-CHO 細胞を回収し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。GFP の量は、アミノ酸及び血清飢餓処理によって減少していた(Fig. 7C, D)。つまり、各々の細胞の mtGFP 量は、培地のアミノ酸と血清を除去することによって約 20 %減少した。これは、GFP 蛍光の減少はほとんどタンパク質の分解が原因で起こっている事を示している。しかし、GFP 蛍光の減少割合と、GFP タンパク質量の減少割合に違いが見られた。これは、形態学的定量法の誤差が原因かもしれない。

次に、この飢餓条件下において、mtGFP-CHO 細胞のミトコンドリア (mtGFP) とリソソーム (Texas Red Dextran) を蛍光標識し、蛍光顕微鏡観察すると、オートリソソームの指標となるこれらの共局在が観察された (Fig. 3)。従って、マクロオートファジーによって mtGFP が分解され、蛍光が減少している可能性が示唆された。

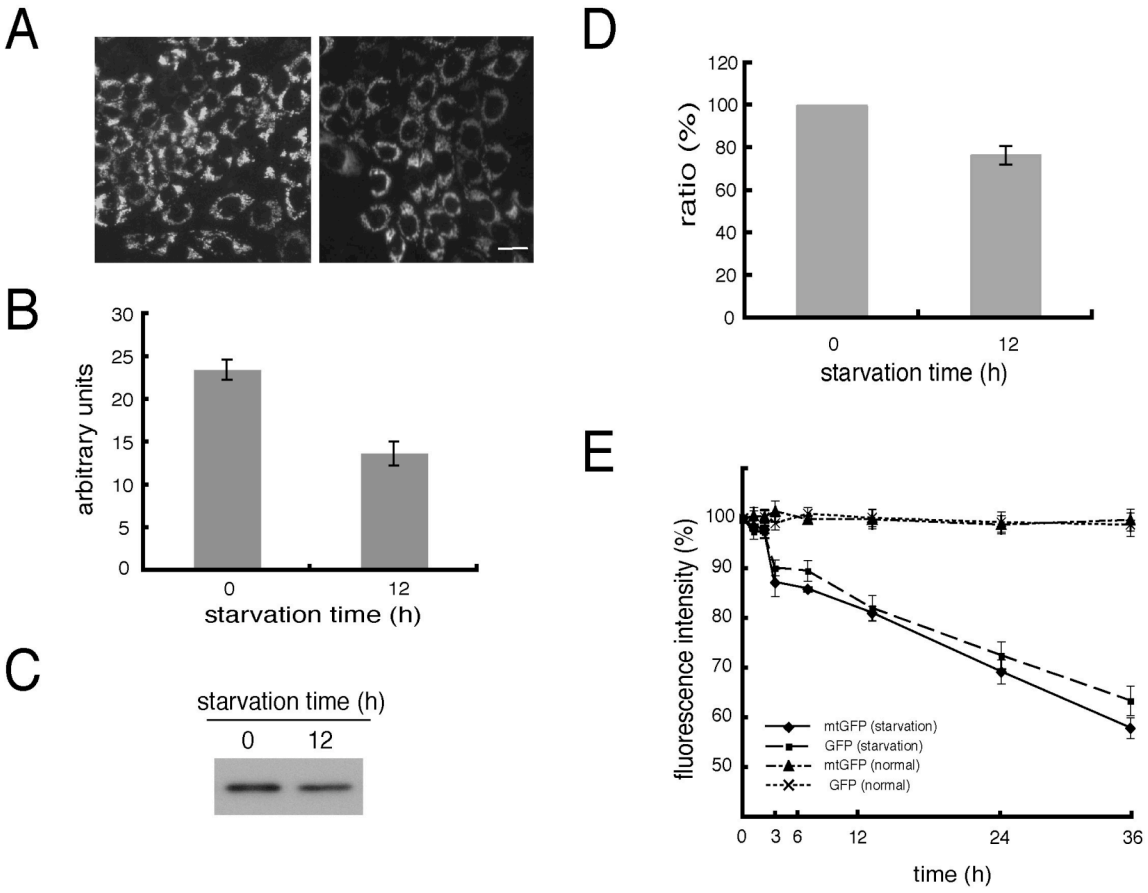

Figure 7. アミノ酸及び血清飢餓処理による mtGFP の分解

(A)mtGFP-CHO 細胞 を通常培地（左図）またはアミノ酸及び血清飢餓培地（右図）で 12 時間培養し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。Bar=20 μm. (B)(A)の細胞あたりの蛍光強度を数値化した.各イメージから 20 細胞をランダムに選び、画像解析ソフト(image J)により、細胞 1 個あたりの蛍光強度を算出した。(n=3) (C) mtGFP-CHO 細胞を(A)と同様に処理し、細胞を回収し、「材料と方法」で示したように抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットを行った.(D) (C)のバンド濃度を数値化した.誤差棒は s.e.m.. (E) mtGFP-CHO 細胞又は GFP-CHO 細胞 を通常培地(normal)又はアミノ酸及び血清飢餓培地処理後(starvation)経時的に回収し、「材料と方法」で示したように、GFP の蛍光強度を測定した.各々DNA 量あたりの GFP 蛍光強度を算出し、未処理細胞をコントロールとしてその割合で示した。mtGFP; mtGFP-CHO 細胞、GFP; GFP-CHO 細胞.

第２項　マクロオートファジーによる mtGFP 分解速度測定法の確立

アミノ酸及び血清飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度の変化

マクロオートファジーによるミトコンドリアの分解速度を調べるために、mtGFP 蛍光強度の減少速度をアミノ酸及び血清飢餓処理後経時的に測定することを試みた。アミノ酸と血清を欠如した F-12 培地で培養した mtGFP-CHO 細胞を経時的に回収し、各々蛍光強度を測定した。細胞あたりの mtGFP 蛍光強度として、より定量的に測定するために、DNA 量（Hoechst33258 蛍光強度）あたりの mtGFP 蛍光強度を算出した。mtGFP 蛍光強度は飢餓 24 時間で約 30 %減少した（Fig.7E)。また、アミノ酸と血清除去後 3 時間で mtGFP 蛍光強度の速い減少が起こった（Fig.7E)。

オートファジー阻害剤の飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度変化への影響

アミノ酸及び血清飢餓による mtGFP 蛍光強度の減少が、オートファジー依存的か否かを調べるため、オートファジー阻害剤処理により飢餓処理で誘導される mtGFP 蛍光強度の減少が抑制されるか否かを調べた。オートファジー阻害剤として、3-methyladenine、chroloquine diphosphate、ammonium chloride、bafilomycin A_1 を用いた。chroloquine diphosphate と ammonium chloride は塩基性薬物であり、酸性顆粒の pH を上昇させる[47]。これは、リソソーム内分解を阻害するだけでなく、哺乳動物細胞におけるマクロオートファジーではオートファゴソームとリソソームの融合を阻害するという報告もある[11]（第１章)。Bafilomycin A_1 は、V-ATPase 選択的阻害剤であり、リソソーム内分解を阻害するだけでなく、哺乳動物細胞におけるマクロオートファジーではオートファゴソームとリソソームの融合も阻害する[11, 37]。3-methyladenine は phosphatidyl-inositol-3-kinase （PI3K） の阻害剤であり、マクロオートファジーにおいてはオートファゴソーム形成を阻害する[46]（Fig. 2)。

各種オートファジー阻害剤の存在下で、アミノ酸及び血清飢餓処理を 6 時間行ったところ、オートファジー阻害剤は、mtGFP 蛍光強度の減少を抑制した（Table

1)。従って、飢餓処理で誘導される mtGFP 蛍光強度の減少は、オートファジーに依存していることが強く示唆された。

	The rate of inhibition (%) n=3
100μM Chloroquine	40.0 ± 4.0
40mM Ammonium chloride	47.1 ± 6.7
100nM Bafilomycin A1	49.3 ± 7.8
10mM 3-methyladenine	53.2 ± 4.8

Table 1. mtGFP 分解におけるオートファジー阻害剤の影響

mtGFP-CHO 細胞を、各オートファジー阻害剤含有アミノ酸及び血清飢餓培地で６時間培養し、Fig. 7E と同様の方法で蛍光強度を測定した。未処理細胞、アミノ酸及び血清飢餓処理細胞についても同時に測定し、各々飢餓で誘導される mtGFP 蛍光強度減少の阻害割合を算出した。

プロテアソーム阻害剤の飢餓処理後の経時的な mtGFP 蛍光強度変化への影響

アミノ酸及び血清飢餓による mtGFP 蛍光強度の減少が、リソソームを介さない蛋白質分解系であるユビキチン／プロテアソーム系によるものかどうかを検討するため、プロテアソーム系の特異的阻害剤であるラクタシスチン処理が、飢餓処理で誘導される mtGFP 蛍光強度の減少に影響を与えるか否かを調べた。まず、ラクタシスチンでプロテアソームを阻害したとき、アミノ酸及び血清飢餓処理によって、通常レベルのマクロオートファジーが起こるか否かを調べた。マクロオートファジー活性を調べるために、抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。LC3 はマクロオートファジーに関わる必須因子であり、隔離膜やオートファゴソーム、オートリソソームに局在することが知られている[38]。LC3 は通常培養時は 18kD の LC3-Ⅰ型で細胞質に散在しているが、栄養飢餓など

の刺激を受けマクロオートファジーが誘導されると、16kD の LC3-Ⅱ型にプロセシングされ autophagic vacuole に結合することが明らかとなっている。マクロオートファジー誘導時には、形成されるオートファゴソームの増加とよく似たキネティクスで LC３-Ⅱも増加するため、LC３-Ⅱの量はオートファゴソーム形成の指標となる[38] (Fig. 2)。

10μM ラクタシスチン含有アミノ酸及び血清飢餓培養条件下で 6 時間培養した mtGFP-CHO 細胞を回収し、その細胞溶解液を SDS-PAGE に展開し、抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。コントロールとして DMSO 含有アミノ酸及び血清飢餓培養細胞や通常培養細胞についても、同様の操作を行い比較した。ラクタシスチン処理アミノ酸及び血清飢餓培養細胞においても DMSO 含有アミノ酸及び血清飢餓培養細胞と同レベルの LC3-Ⅱ量を発現した。従って、ラクタシスチン処理はオートファゴソーム形成及びマクロオートファジー誘導に影響を与えないことが確認された (Fig. 8A)。次に、ラクタシスチンのプロテアソーム阻害効果を確認した。プロテアソームが阻害されると、分解されるべきユビキチン化蛋白質が細胞内に蓄積する。これは、抗ユビキチン化抗体を用いたウェスタンブロットによって、容易に検出できる[60,61]。10μM ラクタシスチン処理したアミノ酸及び血清飢餓培養細胞のユビキチン化蛋白質のレベルは、通常培養細胞やアミノ酸及び血清飢餓培養細胞のレベルに比べて顕著に増加した (Fig. 8B)。従って、この 10μM ラクタシスチン含有アミノ酸及び血清飢餓培養条件下でプロテアソーム阻害が起こっていることが確認された。最後に、同様の条件で回収した細胞について、Fig.7E と同様の方法で mtGFP 蛍光強度測定を行った。ラクタシスチン含有アミノ酸及び血清飢餓培養細胞及び DMSO 含有アミノ酸及び血清飢餓培養細胞は、通常培養細胞とほぼ同レベルの減少を示した (Fig. 8C)。従って、アミノ酸及び血清飢餓条件下で誘導される mtGFP 蛍光強度の減少は、ユビキチン／プロテアソーム系を介したタンパク質分解とは無関係であることが結論された。

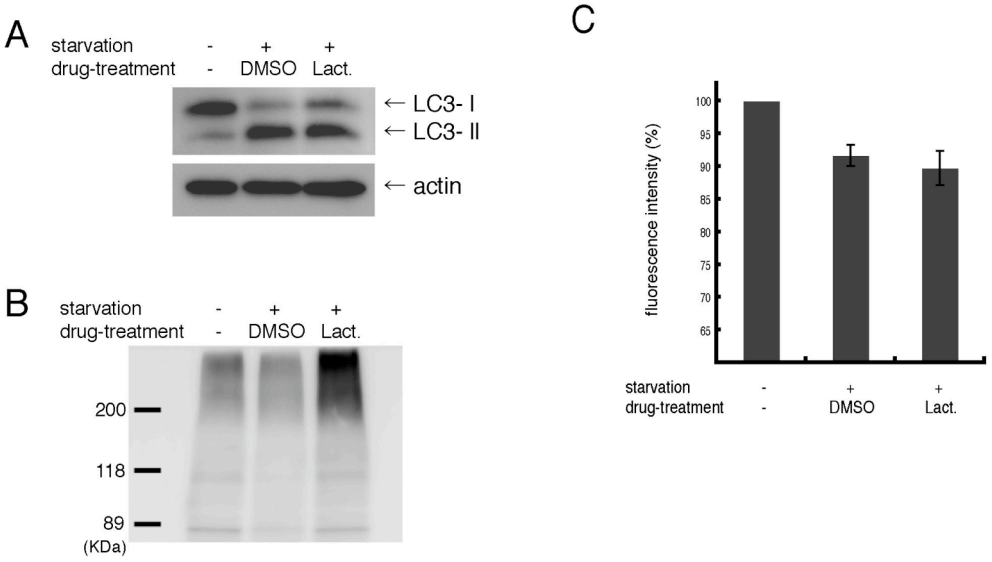

Figure 8. mtGFP 分解におけるプロテアソーム阻害剤の影響

mtGFP-CHO 細胞を、通常培地、ラクタシスチン含有アミノ酸及び血清飢餓培地(Lact)又は DMSO 含有アミノ酸及び血清飢餓培地(DMSO)で６時間培養し、各々「材料と方法」で示したように細胞溶解液を回収した.(A, B)抗 LC３抗体,抗アクチン抗体(A)または抗ユビキチン抗体 (B) を用いたウェスタンブロティングを行った. (C) Fig. 7E と同様の方法で蛍光強度を測定した。通常培地処理をコントロールとしてそれぞれ割合を算出した.

オートファジー分解速度のミトコンドリア分解の選択性に対する影響

マクロオートファジーによってミトコンドリアが選択的に分解されることを示す報告がある（ミトファジー）[29, 31]。また、損傷ミトコンドリアが選択的に分解されるとの報告もある[28, 30, 62]。そこで、アミノ酸及び血清飢餓培地で mtGFP-CHO 細胞に誘導されるミトコンドリア分解が、マクロオートファジーによるミトコンドリアの選択的分解なのか、それとも非選択的な分解なのかを解析した[63]。

細胞質で安定に GFP を発現する CHO-K1 細胞(GFP CHO 細胞)を作製した。GFP CHO 細胞をアミノ酸及び血清飢餓培地で培養し、アミノ酸及び血清飢餓処理後経時

的に回収し、蛍光強度を測定した。その結果、GFP は mtGFP 同様の分解プロファイルを示した（Fig. 7E)。従って、アミノ酸及び血清飢餓条件下で誘導される mtGFP 分解速度は、ミトコンドリアの選択的分解ではなく、ミトコンドリアを含む細胞質のバルク分解を反映していることが示唆された[63]。

まとめ

mtGFP-CHO 細胞をアミノ酸及び血清飢餓処理すると、mtGFP 蛍光強度が減少した。そして、その減少はマクロオートファジーによるバルクなミトコンドリア分解を反映していることが示された。経時的な蛍光強度測定の結果から、アミノ酸及び血清飢餓により、ミトコンドリアはマクロオートファジーによって 24 時間で約 70 %まで分解されることが明らかとなった。またアミノ酸及び血清飢餓処理 3 時間後に急速なオートファジー分解が起こっていることが明らかとなった。

第３項　誘導刺激の違いがオートファジーに及ぼす影響

誘導刺激の違いがミトコンドリアの分解速度に及ぼす影響

第２項で確立した mtGFP を用いたオートファジーによるミトコンドリア分解測定法は、簡便かつ定量的でありキネティクス分析に適している。そこで、マクロオートファジーの誘導刺激の違いが分解速度に及ぼす影響を解析した。これまでに用いてきたアミノ酸と血清を欠如した培地に加え、アミノ酸のみ欠如した培地と血清のみ欠如した培地を作製し、mtGFP-CHO 細胞を処理した。また、一方で飢餓培地処理以外のオートファジー誘導方法として mTOR 阻害剤であるラパマイシン処理を行った。これらの条件はそれぞれ異なるシグナル伝達経路を刺激してオートファジーを誘導する可能性が示唆されている[45, 64]。

各々の条件で処理した細胞を経時的に回収し、Fig. 7E と同様の方法で mtGFP 蛍光強度測定を行い比較した。その結果、アミノ酸及び血清飢餓条件下においては 3 時間で急激にミトコンドリア分解が促進したのに対し、アミノ酸のみ欠如、又は血清のみ欠如した飢餓条件下においては、飢餓初期に急激な分解の促進は起こらなかった。ラパマイシン処理についてはさらに分解速度が遅く、12 時間後に初めて蛍光強度の減少が確認された (Fig. 9A)。従って、培地のアミノ酸や血清単独の欠如やラパマイシン処理ではより弱いオートファジーの誘導しかみられず、アミノ酸と血清の両方が欠如した場合のみ、3 時間後に強いマクロオートファジーの誘導が起こることが明らかとなった。

誘導刺激の違いがオートファゴソーム形成に及ぼす影響

オートファジー誘導刺激の違いで起こるミトコンドリア分解速度の違いが、各条件下におけるオートファゴソーム形成の差によることを確認するために、アミノ酸と血清を欠如した培地やアミノ酸のみ欠如した培地や血清のみ欠如した培地、ラパマイシン含有培地で培養した細胞を経時的に回収し、LC3 の検出を試みた。

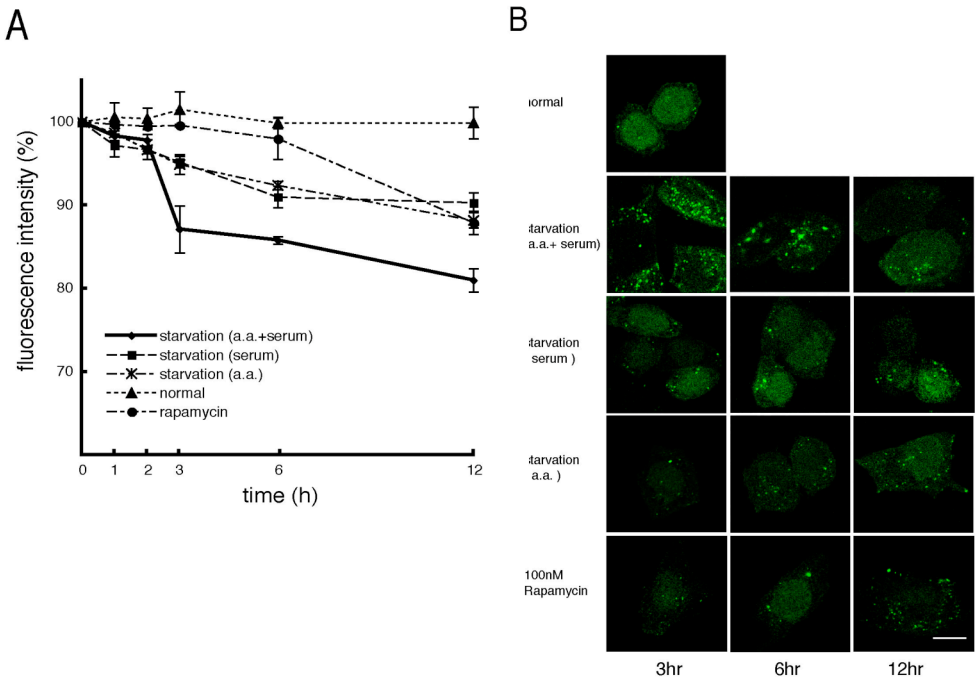

Figure 9.誘導刺激の違いとマクロオートファジー分解のキネティクス

mtGFP-CHO 細胞を、通常培地(normal)、アミノ酸及び血清飢餓培地(a.a.+serum)、アミノ酸のみ飢餓培地(a.a.)、血清のみ飢餓培地(serum)又はラパマイシン含有培地(rapamysin)で処理し、経時的に回収して Fig. 7E と同様の方法で分解速度を算出した。(B)GFP-LC3 CHO 細胞に(A)と同様の処理をし、固定後共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。Bar=10 μm

この目的のため、GFP-LC3 融合タンパク質（GFP-LC3）を安定発現する CHO-K1 細胞（GFP-LC3 CHO 細胞）を作製した。LC3 のオートファゴソーム結合型である LC3-Ⅱは蛍光顕微鏡下で GFP-LC3 dots として検出でき、これは autophagic vacuole のマーカーとして広く用いられている[38, 56, 65]。そこで、各条件において GFP-LC3 dots を蛍光顕微鏡観察することにより、オートファゴソーム形成のキネティクスを検討した。

GFP-LC3 CHO 細胞を、アミノ酸と血清を欠如した培地やアミノ酸のみ又は血清のみ欠如した培地やラパマイシン処理培地で 3 時間、6 時間、12 時間処理し、各サンプルを固定後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。その結果、すべての条件下において、GFP-LC3dots は検出された（Fig. 9B)。しかし、アミノ酸

及び血清飢餓によってオートファジーを誘導した細胞においては、3 時間後に特に多くの GFP-LC3 dots が観察された (Fig. 9B)。これは、 オートファゴソームがより強く誘導されていることを意味している。一方、アミノ酸のみ飢餓、血清のみ飢餓、又はラパマイシン処理によってオートファジーを誘導しても、急激な GFP-LC3 dots の増加は観察できなかった (Fig. 9B)。従って、培地中のアミノ酸及び血清飢餓後３時間で、他の誘導条件と比べてより強いオートファゴソーム形成が起こっており、ミトコンドリア分解速度の違いはオートファゴソーム形成速度の違いによることが明らかとなった。

まとめ

誘導条件の違いによるマクロオートファジーによるミトコンドリア分解速度の違い (Fig. 9A) は、蛍光顕微鏡で観察された GFP-LC3 dot 量 (Fig. 9B) と相関していた。したがって、アミノ酸及び血清飢餓培地で培養しオートファジーを誘導したときにのみおこる、3 時間後の特徴的なマクロオートファジー分解速度の促進は、ラパマイシン処理時、アミノ酸のみ又は血清のみ飢餓処理時よりも強いオートファゴソーム形成が起こるためと考えられる

第３節　　総括

マクロオートファジー分解速度の測定法

栄養飢餓条件下でのミトコンドリア分解を、mtGFP-CHO 細胞を用いて定量的に解析することにより、マクロオートファジー分解速度を測定する系を確立した。オートファジーの分解速度測定についてはこれまで長寿命蛋白質のバルク分解量（非選択的蛋白質分解量）を計測する方法が用いられてきた。この方法は、まず細胞全蛋白質を ^{14}C バリンなどで標識後、過剰量の未標識バリンとともに培養し（この間に短寿命蛋白質は分解され、長寿命蛋白質のみがラベルされた状態になる)、この時点から細胞内外の非蛋白質性 ^{14}C バリン量を測定して、長寿命蛋白質の分解量とするものである[66]。この長寿命蛋白質のバルク分解は飢餓で亢進し、そのほとんどはオートファジーによるものと考えられている。しかし、オートファジー関連遺伝子であり、オートファゴソーム形成に関わる ATG5 を欠損させたマクロオートファジー欠損細胞でも、長寿命蛋白質の分解は飢餓下で野生型の約 30%程度は亢進する[36]。したがって、長寿命蛋白質がマクロオートファジー以外の経路で分解されることが示唆され、長寿命蛋白質の分解をモニターする方法は、マクロオートファジーの特異的な検出とは適さない。そこで、本研究ではマクロオートファジーでのみ分解されるミトコンドリアを GFP で標識し、飢餓条件下における蛍光強度の減少を測定した[58]。この減少はマクロオートファジー阻害剤で抑制され(Table 1)、プロテアソーム阻害剤の影響を受けないこと(Fig.8C)、オートファゴソームの形成プロファイルと一致することから(Fig.9B)、マクロオートファジーによる分解の速度を特異的に測定できたと結論できる。

一方で、最近損傷ミトコンドリアを特異的に分解するオートファジーが存在することが示された[28, 30, 62]。また、過剰に誘導されたペルオキシソームはオートファジーによって選択的に分解されるという報告もある[32]。では、本研究で示したミトコンドリア分解は選択的であろうか？ミトコンドリア GFP の分解は細胞質に発現する GFP の分解速度と同様の分解プロファイルを示したことか

ら(Fig.7E)、ミトコンドリアは選択的に分解されているのではなく、細胞質とともに非選択的に分解されているものと考えられる。今後、他のオルガネラを標識した細胞と比較することで、本測定法を用いて、オートファジーによるオルガネラ分解の選択性を分解速度から議論することも可能である。

誘導条件がマクロオートファジーの分解速度に及ぼす影響

本研究で確立したマクロオートファジーの分解速度測定法は、簡便かつ定量的であり、キネティクス分析に適している。そこで、オートファジー誘導条件と分解速度の関係について検討した。ラパマイシン処理ではマクロオートファジーの誘導も分解速度も飢餓に比べて遅いことが明らかとなった(Fig. 9AB)。ラパマイシンはmTORの阻害剤である。mTORは、細胞内の栄養応答において統合的な役割を果たしており、アミノ酸やインスリンによる蛋白質合成の翻訳調節に関わるシグナル伝達分子であり、下流のp70S6Kなどをリン酸化する[67,68]。また、オートファジーの抑制的な調節因子であり、これを阻害することでオートファジーが誘導されることからラパマイシンはオートファジー誘導剤として広く用いられている[44, 69]。ラパマイシンの mTOR 阻害効果が弱いことを示した報告があるが[70, 71]、これがオートファジーを遅らせた原因かもしれない。少なくとも、ラパマイシン処理では、オートファジーの誘導が飢餓処理に比べて、遅いことが明らかとなった。今後、ラパマイシン処理によってオートファジーを誘導する場合は、考慮すべき点である。

一方、栄養飢餓で誘導されるマクロオートファジーの中でも、誘導する因子の違いによってレセプターや誘導経路が異なる可能性を示す報告がある[45, 64]。例えば、単離肝細胞において mTOR はアミノ酸によるオートファジー調節に関与せず、インスリンによるオートファジー抑制に対してのみ関わっているという報告[72]や、C2C12 筋管細胞においてはロイシンの効果は mTOR を経由しないという報告[73]、オートファジーに関わるアミノ酸のシグナル伝達系が複数ある可能性を示す報告[74,75]などがある。しかし、そのオートファジー誘導のキネティクス、分解速度は不明であった。本研究で、マクロオートファジーを

定量的に測定する系を確立したことにより、培地の主要成分であるアミノ酸と血清を共に欠如すると、飢餓３時間以内により強いオートファゴソーム形成が誘導され、急激なマクロオートファジー分解が起こることが明らかとなった。アミノ酸のみ飢餓、血清のみ飢餓によりオートファジーを誘導しても３時間では顕著なオートファジー誘導そして分解促進は観察されなかった(Fig. 9AB)。したがって 3 時間後の急激なオートファジー分解は、血清とアミノ酸どちらかの欠如の影響という訳ではなく、どちらも欠如することによって起こると結論できる。培地の主要成分であるアミノ酸と血清の除去により、外部からの栄養供給が困難になり、細胞がより早急にエネルギーを獲得する必要にせまられると、早期に多くのオートファゴソームが誘導され、マクロオートファジーの分解速度が促進することが明らかとなった。外部の栄養状況の違いが、オートファゴソーム後期ではなく前期のオートファゴソーム形成に影響を与え、結果的に分解速度に反映されることが強く示唆された。

オートファジー誘導刺激の違いによる、マクロオートファジーのオートファゴソーム形成キネティクス、分解速度の違いは、それぞれ異なるレセプターや誘導経路を介してオートファジーを誘導したことが原因か？分解速度を何が調節しているのか？は今後明らかにしなければならない。そのために、現在までに知られているオートファジーのシグナル伝達経路に関わる各々の蛋白質の機能を RNAi 法等で欠如させ、その分解速度への影響を調べたい。

材料と方法

CHO-K1 細胞

CHO 細胞は、チャイニーズハムスター卵巣組織から分離された繊維芽細胞株である。起源は線維芽細胞であるが、株化細胞として樹立される過程で上皮性細胞株に変化している。至適条件下での倍化時間 12 時間で、コロニー形成率は 24 時間である。染色体構成が安定であり、変異株分離の親株に適している。CHO-K1 細胞は CHO 細胞の亜株でありプロリン要求性である。

CHO-K1 細胞の培養方法

10％ 牛胎児血清（FBS)、F-12 （シグマ社）を増殖培地として用い、5％CO_2、湿度 100 %、37℃に静置し、プラスチック製培養シャーレ（Falcon 社）を用いて、単層培養した。継代培養の際には、0.05 % Trypsin-0.02 % EDTA solution (4.1 mM KCl, 0.3 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 29.4 mM Na_2HPO_4・$12H_2O$, 0.2％glucose, 0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA・2Na)を用いて細胞をシャーレから剥離した。

mtGFP-CHO 細胞の培養方法

10 % 牛胎児血清（FBS)、500 μg／ml Geneticin 、 F-12（invitrogen 社）を増殖培地として用い、5 % CO_2、湿度 100 %、37℃に静置し、プラスチック製培養シャーレ（Falcon 社）を用いて、単層培養した。継代培養は CHO-K1 細胞と同様の方法で行った。アミノ酸飢餓培地は、通常の F-12 培地からすべてのアミノ酸を除いたものを調製した。

トランスフェクション

トランスフェクションは Effectene（QIAGEN)を用いて行った。1 μg 相当のプラスミドに EC Buffer を加え 150μl にした。Enhancer を 8μl 加え、軽く撹拌し、室温で 3 分放置した。Effectene Transfection Reagent を 25μl 加え、5 回サスペンドの後、室温で 5 分放置した。培地（F-12）を 1 ml 加え、2 回サス

ペンドし、前日に準備しておいた培養細胞（40〜80 % confluent/60 mm dish）に加えた。5％CO_2、37℃下で培養し、2〜3 日後、500μg／ml　G418（シグマ社）含有培地に交換した。以後約 4 日毎に培地を交換し、コロニーを形成させた。コロニー形成後、選択したコロニーをペニシリンカップ内で PBS 洗浄、0.05 % Trypsin-0.02 % EDTA solution 処理し、24 穴プレートに移して培養し、増殖させた。更に 30 mm dish に移して増殖させ、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡（LSM510）を用いて GFP が強く発現している細胞を選択し、増殖させた。

タンパク試料の調製

60 mm dish に CHO 細胞を培養し、PBS (phosphate buffered saline; 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 8.1 m M Na_2PO_4・$12H_2O$）で細胞を洗浄した後、0.05 % Trypsin-0.02 % EDTA solution 処理して細胞を剥がし、マイクロチューブ 1 本に集めた。13000×g　1 分遠心後、沈澱にホモジネート用溶液（0.1 M Tris-HCl (pH6.7), 4 % SDS）を 50μl 加え、ソニケーション（20 sec 間隔 5 分）にかけた。5μl 蛋白質定量用に分取し、さらに 0.1 M DTT, 0.2 M sucrose, 0.04 % BPB を加え全量 90μl とした。100 ℃　5 分処理後、-20 ℃で保存した。

タンパク質定量

BCA 法(PIERCE)に従って行った。分光光度計（Beckman）を用いて 562 nm で吸光度測定を行い、検量線を作製しタンパク量を算出した。

SDS - PAGE（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

濃縮用ゲルは 3 %、分離ゲルは 8-15 %で行った。泳動用緩衝液の組成は、0.024 M Tris, 0.19 M Glycine, 0.1 % SDS、泳動は室温にて 20 mA（パワーサプライ；日本エイド-NC1010)で行った。

ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE ゲル、濾紙、20 秒間メタノールに浸した転写用フィルター（Immunobilon PVDF 0.45μm or 0.25μm）を Transfer buffer(25 mM Tris, 190 mM Glycine, 20 % Me-OH, 0.1 % SDS)に 30 分間浸した。転写装置（日本エイド-)にセット後 100 mA で 60 分転写した。転写後のフィルターを TBST(0.5 M Tris, 1.5 M NaCl, 0.05 % Tween20）で 10 分間 3 回洗浄した後、2 % スキムミルク（森永乳業)／TBST に浸して 37℃で 2 時間ブロッキングを行った。フィルターを TBST で 10 分間 3 回洗浄した後、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。2 % スキムミルク／TBST で 10 分間 3 回、TBSS(0.5 M Tris. 1.5 M NaCl, 0.05 M SDS）で 10 分 2 回、TBST で 10 分 2 回フィルターを洗浄し、二次抗体（anti-mouse or rabbit IgG(H+L) peroxidase）と室温で 1 時間反応させた。2 % スキムミルク／TBST で 10 分間 3 回、TBST で 10 分 3 回、PBS で 10 分 2 回フィルターを洗浄し、ECL 法（ECL+plus Western Blotting Detection System; AmershamBiosciences）にてバンドを検出(LAS1000; FUJIFILM)した。

蛍光強度測定

培養細胞を PBS で 2 回洗浄し、SDS buffer(0.1 M Na-phosphate buffer pH7.4, 0.1 % SDS)で溶解した。その後 15 秒間ソニケーションを行い、蛍光強度計（HITACHI F-4500）で測定した。DNA 定量については、Hoechst solution（1μg／ml Hoechst33258, 2 M NaCl, 2 mM EDTA／0.05 M PBS)に細胞溶解液 100μl 加え、30 分間室温で放置後、蛍光光度計で測定した[76]。

リソソームの染色

まず、培養細胞を 500μg／ml　TexasRedDextran(Molecular probes)処理し、37 ℃で一晩培養した。必要に応じて飢餓状態にし、同時にプロテアーゼインヒビター(プロテアーゼインヒビターカクテル:シグマ)処理後、6 時間培養した。カバーガラスに 4 % パラホルムアルデヒドで 30 分固定し、封入後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

試薬

Chloroform, 2-propanol, Ethanol, KCl, KH_2PO_4, NaCl, Na_2HPO_4・$12H_2O$, Glucose, Trypsin, EDTA・2Na, Polypeptone, sucurose, DMSO, Tris, Glycine, SDS, Tween20, Glycerol, Agarose S, Chroloquine, Ammonium chloride, Bafilomycin A1, Leupeptin, Pepstatin, Rapamycin （和光純薬）

TritonX-100, NaOH, DMSO, Cycloheximide （ナカライテスク）

Geneticin, MOPS, BSA, 3-methyladenine, Protease inhibitor cocktail, Lactacystin（シグマ）

FBS (GIBCO)

制限酵素, CIAP, Loading buffer (TaKaRa)

Yeast extract (DIFCO)

Anti-Ubiquitin antibody, Chymostatin (Calbiochem)

Antipain (Bachem AG)

Anti-GFP polyclonal antibody, Anti-mouse or Rabbit IgG(H+L) peroxidase (Santa Cruz Biotechnology)

機器

遠心機　HITACHI himac CF 15R
　　HITACHI himac CR 20F

浸とう機　TAITEC NR-1
　　TAITEC NR-30

分光光度計　Beckman DU530

遺伝子増幅装置　TaKaRa PCR Thermal Cycler TP600

蛍光光度計　HITACHI F-4500

オートシークエンサー　ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 ZAISS LSM510

略語一覧

Atg, autophagy mutant

BSA, bovine serum albumin

CIAP, calf intestine alkaline phosphatase

CHO, Chainese hamster overy

Cvt, cytoplasm-to-vacuole targeting

DMSO, dimethylsulfoxide

ECL, enhanced chemiluminescence

EDTA, ethylendiaminetetraacetic acid

Em, emission

Ex, excitation

FBS, fetal bovine serum

GFP, green fluorescein protein

Hsc, heat shock cognate gene

Lamp, lysosome-associated membrane protein

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

PBS, phosphate-buffered saline

PI, propidium iodide

SDS, sodium dodecyl sulfate

Tris, Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Triton X-100, polyethylene glycol mono-*p*-isooctylphenyl ether

Tween 20, polyoxyethylene sorbitan monolaurate

引用文献

1. Ratner, S., D. Rittenberg, A.S. Keston, and R. Schoenheimer, *The Journal of Biological Chemistry, Volume 134, June 1940: Studies in protein metabolism. XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. By S. Ratner, D. Rittenberg, Albert S. Keston, and Rudolf Schoenheimer.* Nutr Rev, 1987. **45**(10): p. 310-2.
2. Plomp, P.J., P.B. Gordon, A.J. Meijer, H. Hoyvik, and P.O. Seglen, *Energy dependence of different steps in the autophagic-lysosomal pathway.* J Biol Chem, 1989. **264**(12): p. 6699-704.
3. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
4. Hochstrasser, M., *Ubiquitin-dependent protein degradation.* Annu Rev Genet, 1996. **30**: p. 405-39.
5. Dunn, W.A., Jr., *Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation.* Trends Cell Biol, 1994. **4**(4): p. 139-43.
6. Mortimore, G.E. and A.R. Poso, *Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply.* Annu Rev Nutr, 1987. **7**: p. 539-64.
7. Seglen, P.O. and P. Bohley, *Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms.* Experientia, 1992. **48**(2): p. 158-72.
8. Takeshige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, and Y. Ohsumi, *Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction.* J Cell Biol, 1992. **119**(2): p. 301-11.
9. Tooze, J., M. Hollinshead, T. Ludwig, K. Howell, B. Hoflack, and H. Kern, *In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early*

endosome. J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 329-45.

10. Liou, W., H.J. Geuze, M.J. Geelen, and J.W. Slot, *The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles.* J Cell Biol, 1997. **136**(1): p. 61-70.
11. Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro, *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells.* Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
12. Roberts, P., S. Moshitch-Moshkovitz, E. Kvam, E. O'Toole, M. Winey, and D.S. Goldfarb, *Piecemeal microautophagy of nucleus in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Biol Cell, 2003. **14**(1): p. 129-41.
13. Sakai, Y., A. Koller, L.K. Rangell, G.A. Keller, and S. Subramani, *Peroxisome degradation by microautophagy in Pichia pastoris: identification of specific steps and morphological intermediates.* J Cell Biol, 1998. **141**(3): p. 625-36.
14. Tuttle, D.L. and W.A. Dunn, Jr., *Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast Pichia pastoris.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 1)**: p. 25-35.
15. George, M.D., M. Baba, S.V. Scott, N. Mizushima, B.S. Garrison, Y. Ohsumi, and D.J. Klionsky, *Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 969-82.
16. Scott, S.V., M. Baba, Y. Ohsumi, and D.J. Klionsky, *Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism.* J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 37-44.
17. Agarraberes, F.A. and J.F. Dice, *A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation.* J Cell

Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2491-9.

18. Cuervo, A.M. and J.F. Dice, *A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes.* Science, 1996. **273**(5274): p. 501-3.
19. Klionsky, D.J. and Y. Ohsumi, *Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 1-32.
20. Sakai, Y., *[Molecular mechanism of pexophagy].* Seikagaku, 2002. **74**(11): p. 1352-6.
21. Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhisa, and N. Mizushima, *The role of autophagy during the early neonatal starvation period.* Nature, 2004. **432**(7020): p. 1032-6.
22. Kim, J. and D.J. Klionsky, *Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 303-42.
23. Birmingham, C.L., A.C. Smith, M.A. Bakowski, T. Yoshimori, and J.H. Brumell, *Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole.* J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11374-83.
24. Nakagawa, I., A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, and T. Yoshimori, *Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus.* Science, 2004. **306**(5698): p. 1037-40.
25. Ogawa, M., T. Yoshimori, T. Suzuki, H. Sagara, N. Mizushima, and C. Sasakawa, *Escape of intracellular Shigella from autophagy.* Science, 2005. **307**(5710): p. 727-31.
26. Bolender, R.P. and E.R. Weibel, *A morphometric study of the removal*

of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of threatment. J Cell Biol, 1973. **56**(3): p. 746-61.

27. Masaki, R., A. Yamamoto, and Y. Tashiro, *Cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase are degraded in the autolysosomes in rat liver.* J Cell Biol, 1987. **104**(5): p. 1207-15.
28. Elmore, S.P., T. Qian, S.F. Grissom, and J.J. Lemasters, *The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes.* Faseb J, 2001. **15**(12): p. 2286-7.
29. Kissova, I., M. Deffieu, S. Manon, and N. Camougrand, *Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria.* J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 39068-74.
30. Xue, L., G.C. Fletcher, and A.M. Tolkovsky, *Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis.* Curr Biol, 2001. **11**(5): p. 361-5.
31. Priault, M., B. Salin, J. Schaeffer, F.M. Vallette, J.P. di Rago, and J.C. Martinou, *Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast.* Cell Death Differ, 2005.
32. Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka, and E. Kominami, *Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals.* J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4035-41.
33. Iwata, A., J.C. Christianson, M. Bucci, L.M. Ellerby, N. Nukina, L.S. Forno, and R.R. Kopito, *Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13135-40.
34. Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J.E. Davies, S. Luo, L.G. Oroz, F. Scaravilli, D.F. Easton, R. Duden, C.J. O'Kane, and D.C. Rubinsztein, *Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of*

polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 585-95.

35. Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz, *Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy.* Science, 2005. **307**(5709): p. 593-6.
36. Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhisa, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells.* J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
37. Baba, M., M. Osumi, and Y. Ohsumi, *Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method.* Cell Struct Funct, 1995. **20**(6): p. 465-71.
38. Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.* Embo J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
39. Mizushima, N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M.D. George, D.J. Klionsky, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi, *A protein conjugation system essential for autophagy.* Nature, 1998. **395**(6700): p. 395-8.
40. Suzuki, K., Y. Kamada, and Y. Ohsumi, *Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in Saccharomyces cerevisiae.* Dev Cell, 2002. **3**(6): p. 815-24.
41. Berg, T.O., M. Fengsrud, P.E. Stromhaug, T. Berg, and P.O. Seglen, *Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes.* J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21883-92.
42. Bowman, E.J., A. Siebers, and K. Altendorf, *Bafilomycins: a class of*

inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 7972-6.

43. Yano, M., M. Kanazawa, K. Terada, C. Namchai, M. Yamaizumi, B. Hanson, N. Hoogenraad, and M. Mori, *Visualization of mitochondrial protein import in cultured mammalian cells with green fluorescent protein and effects of overexpression of the human import receptor Tom20.* J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8459-65.
44. Blommaart, E.F., J.J. Luiken, P.J. Blommaart, G.M. van Woerkom, and A.J. Meijer, *Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes.* J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2320-6.
45. Schmelzle, T. and M.N. Hall, *TOR, a central controller of cell growth.* Cell, 2000. **103**(2): p. 253-62.
46. Seglen, P.O. and P.B. Gordon, *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.
47. Ohkuma, S. and B. Poole, *Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(7): p. 3327-31.
48. Clague, M.J., S. Urbe, F. Aniento, and J. Gruenberg, *Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation.* J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 21-4.
49. Oda, K., Y. Nishimura, Y. Ikehara, and K. Kato, *Bafilomycin A1 inhibits the targeting of lysosomal acid hydrolases in cultured hepatocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **178**(1): p. 369-77.
50. Presley, J.F., S. Mayor, T.E. McGraw, K.W. Dunn, and F.R. Maxfield, *Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling.* J Biol Chem, 1997. **272**(21): p.

13929-36.

51. Reaves, B. and G. Banting, *Vacuolar ATPase inactivation blocks recycling to the trans-Golgi network from the plasma membrane.* FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 61-6.

52. van Sluijters, D.A., P.F. Dubbelhuis, E.F. Blommaart, and A.J. Meijer, *Amino-acid-dependent signal transduction.* Biochem J, 2000. **351 Pt 3**: p. 545-50.

53. Nara, A., N. Mizushima, A. Yamamoto, Y. Kabeya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation.* Cell Struct Funct, 2002. **27**(1): p. 29-37.

54. Nakamura, N., A. Matsuura, Y. Wada, and Y. Ohsumi, *Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, Saccharomyces cerevisiae.* J Biochem (Tokyo), 1997. **121**(2): p. 338-44.

55. Kirisako, T., M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, and Y. Ohsumi, *Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast.* J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 435-46.

56. Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1101-11.

57. Noda, T., A. Matsuura, Y. Wada, and Y. Ohsumi, *Novel system for monitoring autophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **210**(1): p. 126-32.

58. Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, and T. Chiba, *Impairment of starvation-induced and*

constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 425-34.

59. Munafo, D.B. and M.I. Colombo, *Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24.* Traffic, 2002. **3**(7): p. 472-82.

60. Lee, D.H. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists.* Trends Cell Biol, 1998. **8**(10): p. 397-403.

61. Mimnaugh, E.G., P. Bonvini, and L. Neckers, *The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins.* Electrophoresis, 1999. **20**(2): p. 418-28.

62. Rodriguez-Enriquez, S., I. Kim, R.T. Currin, and J.J. Lemasters, *Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes.* Autophagy, 2006. **2**(1): p. 39-46.

63. Kopitz, J., G.O. Kisen, P.B. Gordon, P. Bohley, and P.O. Seglen, *Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes.* J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 941-53.

64. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Regulation and role of autophagy in mammalian cells.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2445-62.

65. Mizushima, N., *Methods for monitoring autophagy.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2491-502.

66. Pattingre, S., C. Bauvy, and P. Codogno, *Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16667-74.

67. Hara, K., K. Yonezawa, Q.P. Weng, M.T. Kozlowski, C. Belham, and J. Avruch, *Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism.* J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14484-94.

68. Thomas, G. and M.N. Hall, *TOR signalling and control of cell growth.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(6): p. 782-7.

69. Noda, T. and Y. Ohsumi, *Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.* J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3963-6.

70. Raught, B., A.C. Gingras, and N. Sonenberg, *The target of rapamycin (TOR) proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7037-44.

71. Scott, P.H., G.J. Brunn, A.D. Kohn, R.A. Roth, and J.C. Lawrence, Jr., *Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7772-7.

72. Kanazawa, T., I. Taneike, R. Akaishi, F. Yoshizawa, N. Furuya, S. Fujimura, and M. Kadowaki, *Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes.* J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8452-9.

73. Mordier, S., C. Deval, D. Bechet, A. Tassa, and M. Ferrara, *Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway.* J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29900-6.

74. Ogier-Denis, E., S. Pattingre, J. El Benna, and P. Codogno, *Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39090-5.

75. Talloczy, Z., W. Jiang, H.W.t. Virgin, D.A. Leib, D. Scheuner, R.J. Kaufman, E.L. Eskelinen, and B. Levine, *Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling*

pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 190-5.

76. Arai, K., S. Ohkuma, T. Matsukawa, and S. Kato, *A simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein - an application for cell cycle analysis.* FEBS Lett, 2001. **507**(2): p. 181-6.

謝辞

本研究の遂行と、論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学 自然科学研究科 大熊 勝治 教授、 中村 暢宏 助教授に深く感謝いたします。

また、本研究遂行のためにご支援ご協力頂きました、高野 秀一 博士に感謝します。

pOTC-GFP プラスミドを御供与頂きました、熊本大学　森正敬　教授、GFP-LC3 プラスミド、 anti-LC3 抗体を御供与頂きました、大阪大学　微生物病研究所 吉森保　教授に心から感謝いたします。

さらに、楽しい研究の場を提供して頂き、あらゆる相談にのってくださいました、金沢大学 薬学部 生化学研究室に在籍したすべての皆さん（平成 13 年度−平成 18 年度）に心より感謝いたします。

最後に、長い学生生活を経済的、精神的に支えてくださいました両親　河合秀明、孝子、そして家族に心から感謝し、お礼申し上げます。

大熊勝治教授を偲んで

恩師、大熊勝治教授は、平成 18 年 11 月 5 日にお亡くなりになられました。

私は、博士前期課程より約６年間お世話になりました。
本研究を行う機会を与えて頂いたことに大変感謝しております。

大熊先生の死は本当に急でした。
亡くなる前日まで実験室に顔を出されていました。
当時、論文も投稿中でした。
突然の死に本当に無念でなりません。

先生の研究に対する情熱は、並はずれており、
亡くなる数日前まで自ら実験しておられました。
毎日朝早くから夜遅くまで教授室の灯りは消えませんでした。
先生の姿を見て、私自身よく奮起させられたのを今も忘れることはできません。

残念ながら私の 6 年間にわたる大学院生活のラストを見届けて頂くことはできませんでした。
もし先生が生きておられたならば、最後になんて声をかけて下さったのだろう。。

私はこれから、大熊先生の時折見せるあの温和な笑顔を思い出しながら

先生の教えを胸に 。 。 。

平成 19 年 2 月 7 日