

Ensuring Induction in the Tet-Off Expression System

Emma Rennel and Pär Gerwins, M.D., Ph.D.
 The Rudbeck Laboratory, Vascular Biology Unit
 Department of Genetics and Pathology
 Uppsala University
 Uppsala, Sweden

我々は *Tet-Off Expression System* を用いて導入遺伝子発現の変動性の問題を検討するため一連の実験を行いました。そこでドキシサイクリンが非特異的に細胞や細胞外マトリックスに結合し、組織培養液からドキシサイクリンを除去した後に徐々に遊離することを明らかにしました。残存する抗生物質は導入遺伝子の発現抑制に十分な濃度でした。我々の結果では、最初にドキシサイクリンを除去して3時間後に再播種して細胞を洗浄すると、速やかに強い発現を誘導することができました。本試験はテトラサイクリン制御発現系で時折観察される発現変動性を説明し、本発現系の効率と信頼性を向上させる簡便法を提供するものです。

*Tet-Off Gene Expression System*は、GossenとBujard (1) が報告した高レベルの調節性遺伝子発現系を研究者にとって身近なものにしました。本システムでは、テトラサイクリン (Tc) またはその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) を培地から除去すると遺伝子発現が誘導されます。この極めて高感度なシステムを用いると、種々の濃度のTcやDoxに応答する厳密に制御された遺伝子発現が可能になります。

本システムはこのように高感度であるため、微量の抗生物質でも発現量が変化します。レトロウイルス性Tet-Offベクターを使用して樹立したクローン化細胞株を用いた研究中に培地からDoxを除去すると、見かけ上誘導なしの状態から極めて強い誘導まで、発現量が変動することに気が付きました。そこで残存するDoxがこの一定しない発現の原因であると仮説を立てました。本試験では、Doxの適切な除去がTet-Offシステムにおける遺伝子発現の誘導に不可欠であることを証明します。さらに、Doxが凝集する原因部位を特定し、残存抗生物質の簡単な除去法を説明します。

Doxの完全除去により得られる最適な発現

最初に残存するDoxが発現抑制に何らかの役割を果たしているかどうかを明らかにしました。本実験では二重安定Tet-Off型の脳内皮細胞株または神経膠腫細胞株を使用しました。この細胞はTcまたはDoxの非存在下で導入遺伝子の発現を誘導す

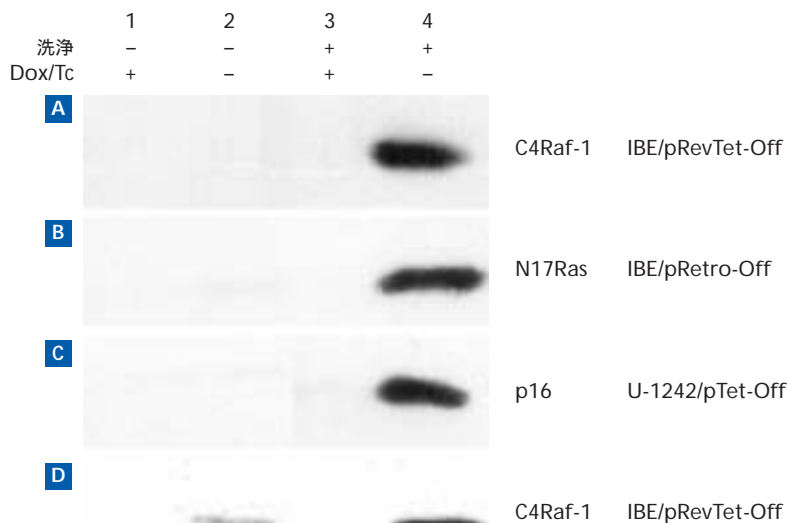


図1 残存するDoxが導入遺伝子の発現を抑制する知見 発現抑制のため200ng/mlのDox存在下で細胞株を培養しました。誘導を開始するため各細胞株を洗浄しトリプシン処理して、新しい14枚の培養プレートに再播種しました。2枚のプレートには200ng/mlのDoxを含む培地を加えました (レーン1と3)。Dox処理プレート1枚とDox非含有プレート1枚は、再播種の12時間後と24時間後に追加洗浄しました (レーン3と4)。対照として、Dox処理プレート1枚は追加洗浄後もDoxで処理しました (レーン3)。2日後、抗Raf (パネルAとD)、抗Ras (パネルB) または抗p16 (パネルC) 抗体を用いて全プレートのライセートをウェスタンブロットにより比較しました。導入遺伝子の強い発現が観察されたのは、再播種後に追加洗浄した細胞のみでした。Tcを使用すると洗浄しない細胞でもある程度の低い発現が認められました (パネルD)。IBE = 不死化脳内皮細胞。U-1242 = U-1242 M6神経膠腫細胞。pRevTet-Off = レトロウイルス性2ベクターTet-Offシステム。pRetro-Off = レトロウイルス性単一ベクター (自己調節性) Tet-Offシステム¹。pTet-Off = 非ウイルス性プラスミドTet-Offシステム。C4Raf-1とN17RasはそれぞれRaf遺伝子とRas遺伝子のドミナントネガティブです。p16は野生型です。

る転写因子であるTc制御トランス活性化因子 (tTA) とTc応答配列により制御されるRas、Rafまたはp16に由来する導入遺伝子を安定発現しています (図1)。Doxを完全に除去して発現を誘導するため、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で細胞を2回洗浄し、トリプシン処理してPBS懸濁状態で1回洗浄し、Doxを含まない新しい培地に再播種しました。このような処理にもかかわらず、ほとんどの細胞株はウェスタンブロットで明らかな導入遺伝子発現を示しませんでした (図1のレーン2)。しかし、再播種の12~24時間後にPBSで細胞を追加洗浄すると、強い発現誘導が観察されました (図1のレーン4)。このような結果はDoxに特異的ではありませんでした。Tcを用いても同様の結果が得られました (図1のパネルD)。また、以上の知見はTet-Offベクターコンストラクトの特性に依存しませんでした。導入遺伝子のRasやRafでは触媒活性型 (データ省略) と不活性化型の両方で観察され、レトロウイルス性、プラスミド性、自己調節的プラスミド性のベクターでも同じ現象を認めました。これらの結果が示すように、再播種後も細胞に結合した残存抗生物質が遊離

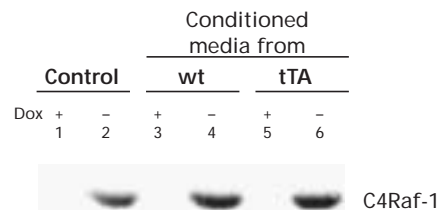


図2 細胞から遊離する残存したDox 野生型 (wt) とテトラサイクリン制御トランス活性化因子 (tTA) 発現型の脳内皮細胞をDox含有培地またはDox非含有培地で24時間処理しました。その後すべての細胞サンプルを洗浄し再播種して、Dox非含有培地で培養しました。24時間後に全サンプルから培養上清を採取し、24時間前にC4Raf-1の発現を誘導したTet-Off脳内皮細胞株のサンプルに添加しました。C4Raf-1細胞の全サンプルからライセートを調製し、上に示すように抗Raf抗体を用いたウェスタンブロットにより比較しました。レーン1: 非許容条件下での基礎発現を示す対照。レーン2: 培養上清添加前のC4Raf-1細胞における導入遺伝子の発現量を示す対照。最初にDoxで処理したwt細胞とtTA細胞の培養上清のみが遺伝子発現を抑制しました (レーン3~6を比較してください)。

Ensuring Induction in the Tet-Off Expression System...continued

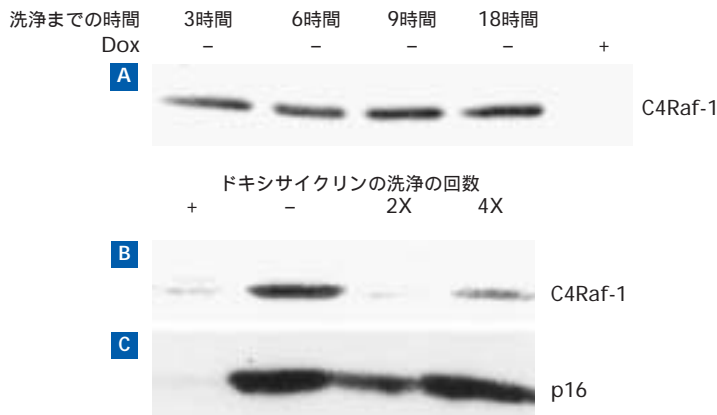


図3 Doxの完全除去には再播種と洗浄が必要 パネルA. 残存するDoxは再播種3時間後に細胞から遊離しています。C4Raf-1導入遺伝子を発現する細胞は最初に200ng/mlのDox存在下で培養し、その後洗浄してトリプシン処理し、Dox非含有培地を入れた新しい培養プレート5枚に再播種しました。プレート1枚は対照として使用するためDoxを添加しました。残りのプレートはそれぞれ規定時間（播種後3、6、9または18時間）に洗浄しました。洗浄24時間後に抗Raf抗体を用いたウェスタンブロットにより各サンプルプレートのライセートを解析しました。パネルBとC. 残存するDoxの細胞特異的遊離。各細胞種に2セットのプレートを使用しました。対照プレートはトリプシン処理して洗浄しDox含有培地またはDox非含有培地に再播種しました。他のプレートはDoxで24時間処理した後、2回（実験開始24時間後と30時間後）または4回（実験開始24、31、51、55時間後）洗浄し、Dox非含有培地で培養しました。実験開始76時間後に、抗Raf抗体または抗p16抗体を用いたウェスタンブロットにより全サンプルのライセートを解析しました。神経膠腫細胞（パネルC）ではp16の発現が完全に誘導されましたが、脳内皮細胞（パネルB）でのC4Raf-1の発現は不十分でした。

し、この残留する薬物が導入遺伝子の発現を抑制する原因でした。ただし、以上の実験は、トリプシン処理や再播種の際に生成され抑制原因となる可能性がある未同定な要因を除外するものではありません。

この可能性を検討するため野生型（wt）細胞またはtTA発現細胞をDox含有培地で24時間処理し、PBSで細胞を2回洗浄して再播種し、Dox非含有培地で培養しました。24時間後に培養上清を採取し、培養上清添加24時間前にDoxを完全に除去して導入遺伝子C4Raf-1の発現を誘導したTet-Off脳内皮細胞に添加しました。図2に示すように、最初にDoxで処理したwt細胞またはtTA細胞の培養上清は、C4Raf-1の発現抑制に有効でした。これらの結果が示すように、非特異的に細胞に結合した残存するDoxが培地中に遊離し、Tet制御遺伝子発現を効果的に抑制します。また、tTA調節タンパク質の存在はDoxの非特異的結合に影響せず、Dox存在下で培養したtTA細胞とwt細胞の培養上清はいずれも発現を抑制しました（図2のレーン3と5）。一方、Doxで処理しなかったwt細胞またはtTA細胞の培養上清は発現を抑制しないことから（図2のレーン4と6）発現抑制はトリプシン処理や再播種時に生成される内因性因子によるものではありません。

以上の知見は、残存するDoxが再播種後に細胞から遊離することを強く示唆しています。

再播種とその後の細胞株の洗浄が必要

Doxが非特異的に細胞に結合するため、残存するDoxの遊離に必要な時間を明らかにしたいと考えました。C4Raf-1導入遺伝子を発現する二重安定Tet-Off細胞からDox含有培地を除去して洗浄し、Dox非含有培地を入れた新しい培養プレートに再播種しました。その後異なる時点で細胞を洗浄し、この洗浄から24時間後に細胞を溶解しました（図3のパネルA）。導入遺伝子を検出するためウェスタンブロットを実施した結果、ほとんどの残存するDoxは再播種後最初の3時間以内に遊離することが明らかになりました。

さらにDoxの除去を単純化するため、再播種せず洗浄のみでも同様に有効であるかどうかを明らかにしたいと考えました。細胞をDoxで24時間処理した後、52時間培養中に合計2回または4回洗浄しました（図3のパネルBとC）。C4Raf-1導入遺伝子を発現する脳内皮細胞は、洗浄・再播種した細胞と同程度には誘導されませんでした。しかし、神経膠腫細胞のp16発現は4回洗浄後に回復しました。これらの結果が示すように、特定の細胞種が産生する

ある種の細胞外マトリックスがDoxと結合し、導入遺伝子の発現を抑制します。このため、Doxの完全除去には再播種が不可欠です。

以上をまとめると、細胞や細胞外マトリックスは残存するDoxの蓄積場所として作用し、二重安定Tet-Off細胞株の導入遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかになりました。現在のHPLCの技術的限界のため、残存するDoxの濃度を検出することはできませんでしたが、Dox非含有細胞の培養上清は発現を抑制しないという知見は、Doxが発現抑制の原因物質であることを強く示唆しています。また、残存する抗生物質は細胞の洗浄・再播種と再播種3時間後の追加洗浄により容易に除去可能であることがわかりました。この方法により、導入遺伝子の迅速かつ強い発現誘導が可能になりました。このような知見はTet-Off発現系で時折みられる発現変動を説明し、本システムを用いた結果を効果的に改善する簡便法を提供すると考えています。

参考文献

- Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5547-5551.
- Iwaki, K., Okumura, N., & Yamazaki, M. (1993) *J. Chromatogr.* **619**:319-323.

Analytical Biochemistry, Volume 309, pages 79-87, ©2002, E. Rennel & P. Gerwins, "How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off" から Elsevier Scienceの許可を受けてデータを転載しました。

† 現在pRetro-Offは Clontechでは取り扱っていません。