

ProteoTuner™ システムを用いた分泌タンパク質レベルの直接調節と ノックアウト表現型のレスキューの調節

クロンテック（株）細胞生物学グループ

ProteoTuner™（プロテオチューナー）システムは、目的タンパク質の発現レベルをDNAやmRNAレベルではなくタンパク質レベルで直接調節する新技術を用いています。本システムのさらなる特長を示すために、Shield1が無毒性であることを実証しました。また、ProteoTunerシステムはサイトゾルのタンパク質だけでなく、分泌タンパク質にも利用できることを明らかにしました。最後に、ProteoTunerシステムを用いてノックアウト表現型をレスキューし、ProteoTunerシステムの調節性を実証しました。

ProteoTuner™ システムは、細胞内の目的タンパク質を、リガンド依存的かつ可逆調節可能な様式で安定化あるいは分解することができます。本システムは、ProteoTuner不安定化ドメイン（DD）をマルチクローニングサイトの upstream にコードするベクターから構成されており、DDを安定化するリガンドShield1も含んでいます。DDは変異型FKBPタンパク質に由来する12 kDa（107アミノ酸）のタグです。目的タンパク質をDDタグと融合した形で発現させると、細胞内で不安定化され、プロテアソームによって急速に分解されます。しかし、低分子（750 Da）の膜透過性リガンドShield1を培養培地に添加すると、それがDDタグに特異的に結合し、DDタグ融合タンパク質の分解を防ぎます。その結果、細胞内に融合タンパク質が急速に蓄積します（1）。

検出できるほどの副作用はない

ProteoTunerテクノロジーは種々の細胞株や生物で効果的に利用されています（1~6）。最近、Wandlessらは、種々の濃度のShield1によって遺伝子発現が影響されるかどうかをマイクロアレイ解析によって調べました。その結果、1 μMまたは10 μM Shield1で処理した後にRNAレベルが明確に変化する遺伝子はごくわずかであることがわかりました。Shield1の濃度が100 nMの場合では、変化は全く認められませんでした（2）。この著者らは、この知見と一致する報告を別の論文でもしています。すなわち、Shield1は担癌マウスの治療結果に影響を与えなかったこと、およびShield1で処理したマウスは正常な体重、活性および摂餌行動を維持したことを報告しています（3）。

これらの最近の報告を確認するために、我々はよく用いられているNIH-3T3、HEK 293、CHO-K1、およびU2OS細胞株に対するShield1の影響を種々の濃度で調べました。毒性はPremixed WST-1 Cell Proliferation Reagentを用いて調べました。

組織培養におけるShield1推奨濃度の5~10倍の濃度で細胞を処理しても、Shield1は細胞増殖に影響を与えませんでした（図1）。先の報告とともにこれらのデータは、Shield1は一般的に毒性がなく、特定の影響を与えないことを示しています。

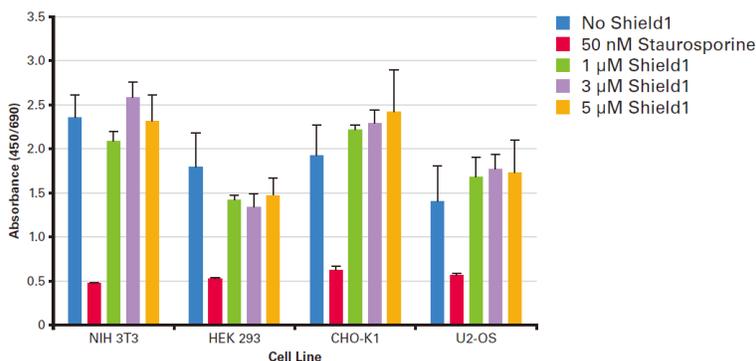


図1. 推奨濃度の5~10倍濃度でもShield1は細胞生存能に影響を与えない

図に示す各種細胞株（ 1×10^4 cells/well、96ウェルプレート）を0、1、3、または5 μMのShield1で処理した。アポトーシス誘導物質として知られているstaurosporine（50 nM）を陰性コントロールとして用いた。48時間後に、Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagentを用いて細胞増殖を測定した。

分泌タンパク質にも適している

サイトゾルのタンパク質レベルの調節にProteoTunerシステムが威力を発揮することはすでに実証されています。最近、このシステムは分泌タンパク質に対しても試されました(3)。我々も別の分泌タンパク質*Metridia* ルシフェラーゼに対するProteoTunerシステムの効果をReady-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Systemを用いて調べました。我々はまず、*Metridia* ルシフェラーゼのN末端シグナルペプチドと遺伝子本体の間にDDを挿入したコンストラクトを構築しました。この操作は、このタンパク質を分泌経路に入れるために必要でした。

このコンストラクトを細胞にトランスフェクトし、種々の濃度のShield1で処理しました。培養上清中に分泌されたDD-*Metridia* ルシフェラーゼの量をReady-To-Glow assayプロトコールに従って測定しました。アッセイの結果は、分泌されたDD-*Metridia* ルシフェラーゼを安定化するShield1の能力を反映しました。培地中のShield1濃度は、測定した生物発光と正比例しました(図2)。このことは、Shield1は濃度依存的にDDタグ分泌タンパク質を安定化することを示しています。しかし、分泌タンパク質の安定化の程度は、サイトゾルのDDタグ融合タンパク質の場合よりも若干低い可能性があります。

小胞体を通ずるこの分泌タンパク質の最大の安定化には、より高濃度のShield1 (2 μM) が必要でした。一方、サイトゾルのタンパク質の場合では、500~1,000 nMの範囲でほぼ完全な安定化が得られます。しかし図1に示すように、Shield1濃度が5 μMでも細胞の生存能に影響を与えません。

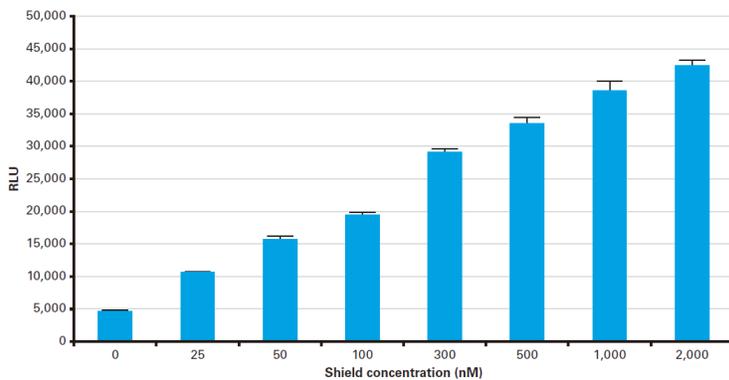


図2. Shield1は分泌型*Metridia*ルシフェラーゼタンパク質に対しても安定化効果をもち、分泌タンパク質およびサイトゾルタンパク質に対するShield1の安定化効果は同様なメカニズムであることを示唆している。Shield1は、調節可能な様式で分泌タンパク質を安定化する。細胞にDD-*Metridia*ルシフェラーゼコンストラクトを一過性にトランスフェクトし、種々の濃度のShield1で処理した。6時間後、培地サンプルを採取し、培地中の分泌型DD-*Metridia*ルシフェラーゼの量をReady-To-Glow Secreted Luciferase Reporterアッセイによって求めた。RLU = relative light units (相対光ユニット)

ノックアウト表現型の調節可能なレスキュー

ノックアウトモデルは、タンパク質の機能研究に有力なツールです。しかし、“ノックアウト”タンパク質を調節制御可能な様式で再導入して表現型をレスキューすれば、そのタンパク質の機能をより詳細に知ることができます。そのため、我々はProteoTunerシステムを用いてDDタグを付けたZAP70タンパク質をZAP70ノックアウト細胞株(116 Jurkat)に再導入し、レスキューの程度をShield1依存的に調節しました。ZAP70 (Zetachan-associated protein kinase 70) はT細胞やナチュラルキラー細胞で天然に分泌されるチロシンキナーゼで、IL-2分泌へとつながるT細胞シグナリングの開始に重要な役割を果たしています(図3)。

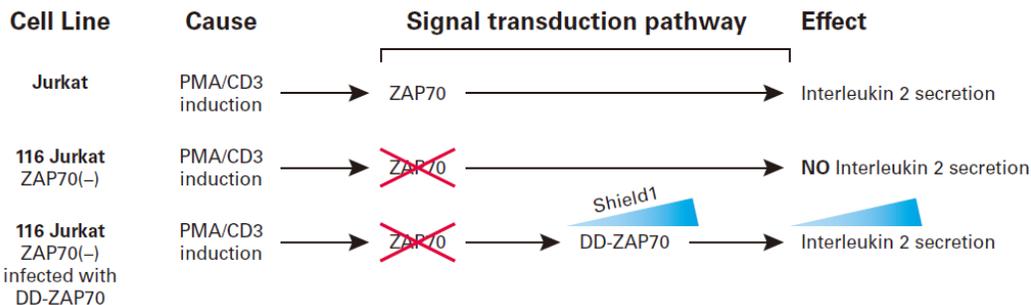


図3. ZAP70 欠損116 Jurkat細胞株におけるZAP70シグナル伝達経路の調節可能なレスキュー

我々はLenti-X™ ProteoTuner SystemとRetroNectin® Reagentを用いてDD-ZAP70をコードするコンストラクトを116 Jurkat細胞に導入し、遺伝子導入が困難なこの細胞に最大90%の効率で導入できました。Shield1濃度を増加させることによりDDZAP70は安定化し、PMA/CD3誘導時におけるZAP70依存性のシグナル伝達を調節可能な様式でレスキューすることができました（図4）。培養培地中のIL-2量に反映されるレスキューの程度は、Shield1濃度、その結果である安定化されたDD-ZAP70の細胞内濃度に正比例しました。このことは、ZAP70シグナル伝達経路はオン/オフ・スイッチではなくZAP70発現を介して調節できることを示しています。Shield1非存在下では遺伝子導入細胞内のDD-ZAP70レベルは低く、シグナル伝達経路のレスキューはできません。これは低いIL-2レベルに反映されており、遺伝子導入していない116 Jurkat細胞の場合に匹敵しています。

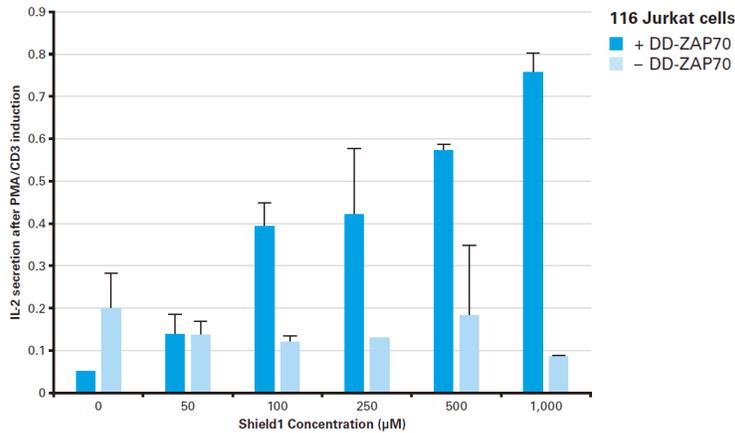


図4. ProteoTunerシステムを用いたZAP70依存性シグナル伝達経路のレスキュー
 レスキューのレベルは、レスキューされたZAP70の量に比例している。DD-ZAP70コンストラクトを116 Jurkat細胞（ZAP70欠損）にトランスフェクションあるいはmockトランスフェクション（ベクターなし）し、種々の濃度のShield1存在下で培養し、PMAおよびCD3でシグナル伝達を誘導した。レスキューの程度は、培地中に分泌されたIL-2の量をELISAアッセイで測定して調べた。

用途の多いシステム

ProteoTunerシステムは、広範囲のタンパク質やさまざまな実験に利用できます。Shield1は毒性がないため、観察された変化は目的タンパク質の操作によるものと判断できます。また、ProteoTunerシステムはサイトゾルのタンパク質だけでなく、分泌タンパク質の量の調節にも利用できます。我々は本システムを用いてノックアウトシステムに目的タンパク質を再導入し、レスキューの程度を迅速かつ正確に調節することができました。

参考文献

1. Banaszynski, L. A. *et al.* (2006) *Cell* **126**(5):995–1004.
2. Maynard-Smith, L. A. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* **282**(34):24866–24872.
3. Banaszynski, L. A. *et al.* (2008) *Nature Med.* **14**(10):1123–1127.
4. Armstrong, C. M. and Goldberg, D. E. (2007) *Nature Meth.* **4**(12):1007–1009.
5. Berdeaux, N. *et al.* (2007) *Nature Med.* **13**(5): 597–603.
6. Herm-Gotz, A. *et al.* (2007) *Nature Meth.* **4**(12):1003–1005.