

遺伝子ノックアウト細胞への Tet-Off[®] Gene Expression System 導入による可逆的オートファジー欠損細胞の 構築とその応用

細川 奈生¹⁾、水島 昇²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 細胞生理学分野

2) 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 細胞生理学分野 教授

■ オートファジーとは

オートファジーは、リソソームを分解の場とする細胞内分解機構であり、すべての真核生物に保存されている。オートファジーは栄養飢餓時に特に激しく誘導される。飢餓時の細胞は自らの細胞質成分を過剰に分解することで、アミノ酸などの栄養素の確保に貢献していると考えられている。

オートファジーが誘導されると、細胞質中に隔離膜と呼ばれる特有の膜構造が出現する。隔離膜は伸長しながら細胞質成分を囲い込み、二重膜のオートファゴソームを形成する。オートファゴソームの外膜はリソソームと融合し、内膜と内容物である細胞質成分がリソソーム内の分解酵素によって分解される(図1)。大容量の分解が可能であることから、高等動物では飢餓適応以外にも多くの生理機能に関与していると考えられている。実際、抗原提示、細胞内侵入細菌の分解、細胞内タンパク質品質管理などへのオートファジーの関与が相次いで報告され、高等動物におけるオートファジー研究は、現在最も注目を集める研究分野の一つとなりつつある。

オートファゴソーム形成には、いくつかのオートファジー関連遺伝子(Atg)が関与することが報告されている。その1つがAtg5である。Atg5はユビキチン様タンパク質Atg12と結合して機能型となり¹⁾、細胞内ではほぼすべてのAtg5がAtg12-Atg5結合体として存在している。Atg12-Atg5結合体は隔離膜の伸長に必要である²⁾。

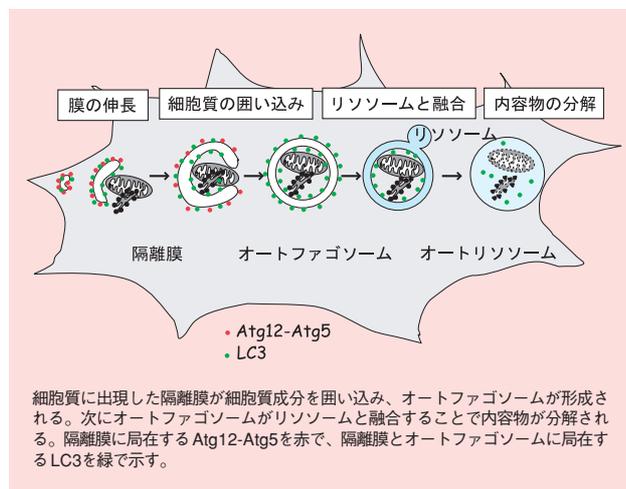


図1 オートファジーの概要

■ 蛍光タンパク質 GFP 標識 LC3 を用いた オートファゴソームの可視化

近年、オートファゴソーム結合タンパク質である LC3 を蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡を用いて簡単にオートファジーをモニターする方法が確立された。このモニター法は、高等動物におけるオートファジー研究の進展に大きく貢献し、培養細胞からマウス組織にいたるまで広く適用されている。LC3 は酵母の Atg8 の哺乳類ホモログであり、細胞内ではサイトゾル型の LC3-I と膜結合型の LC3-II の二種類の形態をとる。飢餓などオートファジーの亢進する環境下では、LC3-I が Atg12-Atg5 依存的にホスファチジルエタノールアミンと共有結合し LC3-II となる。LC3-II は隔離膜とオートファゴソームに局在するため、GFP と LC3 の融合タンパク質 (GFP-LC3) を細胞内発現させると、これらの構造体が GFP 標識される。GFP-LC3 のドットの数が多いとオートファジーが強く起こっていることを示す³⁾。また LC3-II の量もオートファゴソームの数とよく相関する。

■ Tet-Off[®] Gene Expression System 導入による可逆的オートファジー欠損細胞構築の意義

高等動物におけるオートファジーの機能解析では、多くの場合、細胞レベルでのオートファジー阻害実験が行われる。しかし、オートファジー研究への関心が急速に高まっている一方で、オートファジー阻害実験系は十分に確立されているとはいえない。これまでオートファジーを阻害するためには、オートファジー阻害効果を示す薬剤の使用や RNA 干渉法によるオートファジー必須遺伝子の発現抑制、オートファジー必須遺伝子破壊細胞などが使用されてきた。しかし、これらの方法には問題点も多い。例えば、阻害剤として使用される 3-メチルアデニン は PI3 キナーゼ阻害効果を持つことが明らかとなっている⁴⁾。PI3 キナーゼは栄養シグナルや成長因子のシグナル伝達経路など複数の経路で機能するため、阻害することによって生じる副作用は無視できない。RNA 干渉法では発現を完全に抑制することは困難であり、さらに抑制後の再誘導制御も難しい。完全に発現を抑制した細胞を使用するという目的であれば、既にオートファジー遺伝子欠損マウスが作成されており⁵⁾、オートファジー遺伝子欠損細胞の使用も可能である。しかし、遺伝子破壊実験は不可逆的である。

オートファジーの分解容量は非常に大きいため、オートファジー活性の長期的欠損によって生じる二次的影響は計り知れない。以上の点から考えて、細胞レベルでオートファジーを解析するためには、可逆的かつ迅速にオートファジー能を制御することができる実験材料が必要である。そこで私たちは、Tet-Off® Gene Expression System (Clontech 社) を導入し、テトラサイクリン、またはその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) に依存してオートファジー遺伝子の発現を可逆的に制御できる細胞株、m5-7細胞を構築した。

m5-7細胞は Dox 添加によってオートファジー欠損細胞となり、Dox 除去によって速やかにオートファジー誘導能が回復する。m5-7細胞は、Atg5を欠損したマウス線維芽細胞⁵⁾に pTet-Off と pTRE2hyg-mAtg5を2段階で導入して構築した細胞である。通常、この細胞ではマウス Atg5の cDNA が発現しており、あたかも野生型のようにオートファジーを誘導することができる。しかし、Dox 存在下では Atg5の発現が完全に抑制され、オートファジー誘導不能状態に陥る(図2)。m5-7細胞は、Atg5欠損細胞を用いて構築されているため、内在性の Atg5の発現を無視でき、Dox の添加量を調整することで Atg5の発現を制御することが可能である。

私たちはまず、m5-7細胞のオートファジー誘導能が完全に抑制されるまでの時間を検討した。Dox を 10 ng/ml で添加して2日間培養すると Atg12-Atg5が顕著に減少した。そして3日間の培養で検出感度以下となった。しかし LC3-II を指標にしてオートファジー活性を検討した場合、飢餓処理によりオートファジーが完全に抑制されるには4日間を要した。さらに、オートファゴソームを観察するため、m5-7細胞に GFP-LC3 を安定発現させた m5-7;GFP-LC3細胞を構築した。m5-7;GFP-LC3細胞では、アミノ酸・血清除去2時間後、細胞質に GFP-LC3のドットが多数出現した。このことから、この細胞が通常状態ではオートファジーを誘導可能であることが示された(図3)。一方 m5-7;GFP-LC3細胞を4日間 Dox 処理すると、飢餓時の GFP-LC3のドット形成が十分に阻害された。

次に、オートファジー誘導能が完全に抑制された m5-7細胞において、Dox の除去によりオートファジー誘導能が回復するかどうか検討した。Atg12-Atg5は Dox 除去から24時間後には十分に検出された。一方で、LC3-IIは Dox 除去4時間後にはすでに出現し、8時間後にはほぼ正常レベルまで回復した(図4)。蛍光顕微鏡観察からも GFP-LC3の輝点が Dox 除去後4時間で出現し始めていることが確認された。このことから、Dox を除去してから短時間でオートファジー誘導能がほぼ十分に回復することが示された。また Dox 添加後の抑制実験と同様に、Atg12-Atg5の発現レベルがウェスタンブロットでの検出感度以下に減少している状態でさえオートファジーが誘導されることが認められた。Atg5は哺乳動物にホモログを一つしか持たないため、しばしば RNA 干渉に利用される。しかし、今回の結果から、ほぼ完全に Atg5の発現を抑制しなければオートファジー活性を完全に阻害することが難しいことが示された。発現抑制実験を行う際にはこの点に十分に注意する必要があると考えられる。以上のことから、m5-7細胞株が可逆的かつ迅速にオートファジー誘導能を制御できる細胞であることが明らかとなった。

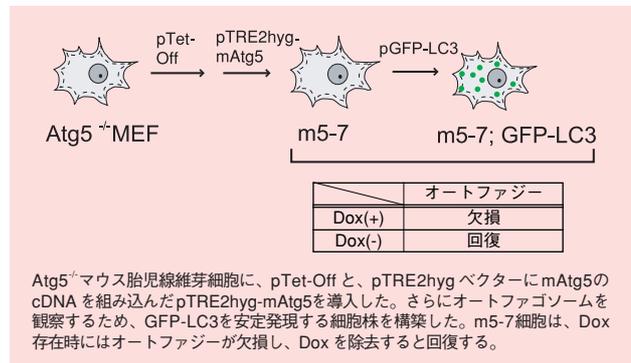


図2 Tet-Off® Gene Expression System 導入細胞と蛍光タンパク質 GFP-LC3 を安定発現する細胞の構築

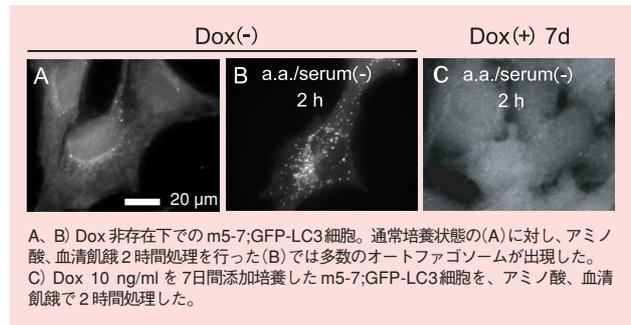


図3 Dox 処理による m5-7細胞のオートファジー能の欠損

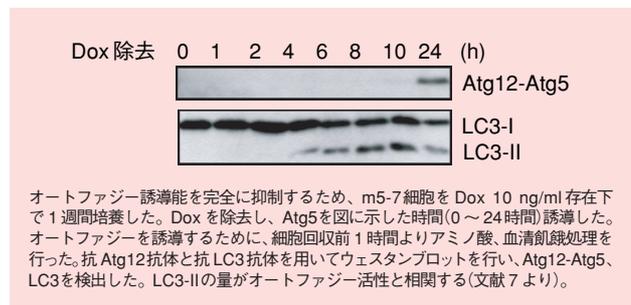


図4 Dox 除去による m5-7細胞の速やかなオートファジー能回復

■ 可逆的オートファジー欠損細胞 m5-7 の細胞サイズ解析への応用

オートファジーは隔離膜によって細胞質の一部を覆い囲むため、大規模な分解が可能となっている。飢餓時の胚性幹細胞では一時間に細胞質の2%を分解することも報告されており²⁾、オートファジーによる細胞質分解によって細胞のサイズが減少することが予想される。細胞サイズは細胞成長と細胞分裂によって決定される。細胞成長は、成長因子や栄養によって制御されており、これらの除去により細胞は萎縮する⁶⁾。この条件下では、タンパク質合成が著しく抑制されることが示されており、これが細胞萎縮の原因であると考えられている。しかし、成長因子や栄養の除去はオートファジー誘導条件でもある。タンパク質の合成と分解のシグナルは密接にリンクしているため、これまでオートファジーの細胞萎縮への関与についてはほとんど明らかとなっていなかった。オートファジーが細胞萎縮に貢献するかどうかを明らかにするためには、オートファジーを特異的に阻害する実験系が必要である。そこで、m5-7細胞を用いて、飢餓時の細胞サイズの減少に

オートファジーが貢献するのか検討した。オートファジー誘導能の有無による2次的な影響を低くするため、あらかじめDoxを添加しm5-7細胞をオートファジー誘導能欠損状態に維持した。次に細胞を二群に分け、一方の細胞はDoxを除去して24時間培養し、オートファジー誘導能を完全に回復させ、もう一方はオートファジー欠損状態に保った。細胞にアミノ酸・血清飢餓処理を施すと、飢餓処理の開始から30分後にはオートファジーが誘導され始め、10時間後までオートファジーは激しく誘導された。このため、オートファジーの影響を十分に検出できるよう、飢餓処理を開始して10時間後に細胞サイズを測定した。細胞のサイズはフローサイトメトリーを用いて検出した。Dox除去後24時間後には、両群の細胞サイズに差は認められなかった。次に、飢餓10時間後に検討したところ、どちらの群も細胞サイズの減少が認められた。しかし、オートファジー誘導能を回復させた細胞の方がオートファジー不能細胞より、飢餓細胞サイズの減少がより顕著であった。このことから、飢餓時の細胞萎縮にオートファジーが関与することが明らかとなった⁷⁾。

■ まとめ

Tet-Off[®] Gene Expression Systemを導入することで、可逆的かつ迅速にオートファジー誘導能を制御できる細胞を構築した。さらに、この細胞を利用することで、これまで解析が困難であったオートファジーの細胞サイズ制御への関与についての検討が可能となり、オートファジーが飢餓時の細胞萎縮に関与することを明らかにすることができた。今後、この細胞がオートファジーの細胞レベルでの解析に広く利用され、オートファジー研究に大きく貢献することを期待したい。

【参考文献】

- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y.: A protein conjugation system essential for autophagy. (1998) *Nature*, **395**, 395-398.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 657-667.

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.
- Petiot A., Ogier-Denis E., Blommaert EF., Meijer AJ., Codogno P.: Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells (2000) *J Biol Chem*, **275**, 992-9985.
- Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhiya T., Mizushima N.: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. (2004) *Nature*, **432**, 1032-1036.
- Fingar, D.C., Blenis, J.: Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. (2004) *Oncogene*, **23**, 3151-3171.
- Hosokawa, N., Hara, Y., Mizushima, N.: Generation of cell line with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 2623-2629.

■ 本稿でご使用いただいた製品

- pTRE2hyg Vector
製品コード 631014 20 µg
- Tet System Approved FBS, US-Sourced
製品コード 631101 500 ml
- Doxycycline
製品コード 631311 5 g

水島先生へのインタビュー

Q:先生のご研究内容について、簡単に教えてください。

A:オートファジーの分子機構と生理的役割の解析です。細胞内大規模分解系であるオートファジーの誘導機構、オートファゴソームの形成機構、オートファジーの哺乳類での役割、病態への関与などについて幅広く研究をしています。

Q:オートファジーに注目された理由は?

A:すべての真核生物のすべての細胞がオートファジーの機能をもっているという普遍性、それにも関わらずあまり研究が進んでいなかったという意外性、形態学と酵母遺伝学が基盤にあったという確実性、そしてたまたまオートファジーの存在を知り得たという偶然性が理由です。

Q:ご研究にTet Systemを取り入れられたのはいつ頃でしょうか?

A:Tet Systemの有効性についてはかなり以前より認識していました。自分自身で使い始めたのは、2000年頃だったと思います。ES細胞などで使い始めました。誘導、抑制ともに非常に良かったため、今回のオートファジーノックアウト線維芽細胞の実験には迷わず採用しました。

Q:先生のモットーを教えてください。

A:モットーというのは特に意識したことはありませんが、かなり頑固なところがあるので、モットーのようなものがあるのだと思います。たくさんありそうな気がします。

Q:今後の研究の方向性は?

A:オートファジー、タンパク質代謝をキーワードに縦横無尽に様々な生命現象を見ていきたいと思っています。一見無関係にみえる現象に、隠された共通性を見いだせれば楽しいと思います。最近ではより全般的な栄養信号にも興味を持っています。

今後も先生のご研究を応援させていただきます。ありがとうございました。



水島先生(中央)、細川さん(その右)と研究室の皆さん(2006年当時)