

【目的】細菌感染やウイルス感染を受けた場合には、それら外来の“異物”を迅速に捉え、排除することが、細胞の生存に極めて重要なことである。そのような細胞内“免疫”機能のひとつとして、オートファジーがあげられる。一方、遺伝子治療を行いたい場合や、効率よく遺伝子導入を行いたい場合には、目的の外来DNAを何らかの方法で細胞内（とりわけ核内）に入れる必要がある。しかし、非ウイルスベクターを用いたトランスフェクションでの外来DNAの挙動や、細胞応答についての知見はほとんどなく、試薬・方法開発上の問題となっていた。本研究は、外来DNAの細胞内での挙動を明らかにし、外来遺伝子侵入を阻もうとする細胞の仕組みを解明しようとするものである。

【方法】人工ビーズ（直径 約 3 μm 、磁気ビーズ）に、エフェクター分子として DNA（約 8 Kbp）を結合させたもの（DNA ビーズ）あるいは結合していないビーズに、pH 指示薬である pHrodo を結合させ、トランスフェクション試薬（Effectene など）を用いて細胞内に導入した。ビーズを入れる細胞として、GFP-Ubwt（ubiquitin、野生型）を恒常的に発現するマウス胚線維芽細胞（MEF）および p62 ノックアウトマウス胚線維芽細胞（p62-KO MEF）、GFP-LC3 と mCherry-Ubwt（野生型）恒常的に発現する p62 ノックアウト胚線維芽細胞（p62-KO MEF）などを用いた。これらの細胞に、人工ビーズを導入し、生きたままの状態、蛍光顕微鏡を用いて経時観察を行った。必要に応じて、蛍光観察した同一細胞およびビーズを、電子顕微鏡を用いて観察した。

【結果】GFP-Ubwt を発現する MEF 細胞にビーズを導入したところ、エンドソーム膜破裂後（pHrodo シグナル消失後）に、GFP-Ubwt のシグナルが集積するのが観察された。ユビキチン化に要する時間（約 3 分）は、GFP-LC3 が集積する時間（約 8 分）より短く、ユビキチン化がオートファジーの隔離膜形成に先行して起こることが分かった。p62 をノックアウトした MEF（p62-KO/GFP-Ubwt MEF）細胞にビーズを導入したところ、エンドソーム膜破裂後のユビキチンのビーズへの集積は、約 10 分まで遅延した。マウス p62 の 405 番目のセリン残基（ヒトでは 403 番目）をアラニンに置換した変異体 p62（p62S405A）を発現させると、p62 活性は、ノックアウト変異体と同様のレベルまで低下した。それに対して、野生型の p62 あるいは 405 番目のセリン残基をリン酸化状態に近いグルタミン酸（E）にした変異体（p62S405E）を発現させると、正常と同等のレベルに戻った。この結果は、外来 DNA の侵入に対して、p62 のリン酸化型が、ユビキチン化を迅速化することで異物除去に働くことを示している。

外来 DNA の侵入を阻む細胞内免疫としての p62 タンパク質の機能

