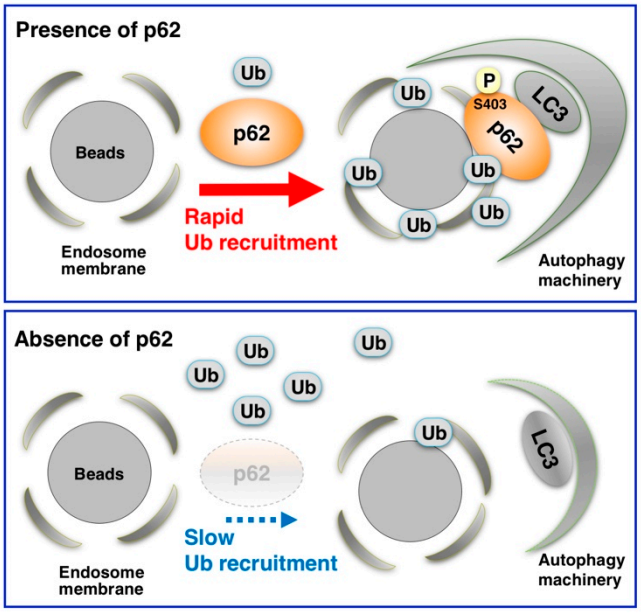
59　外来DNAの侵入を阻む細胞内免疫機構の解明	原口　徳子

【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、生きたままの状態で、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



59. 外来 DNA の侵入を阻む細胞内免疫機構の解明

原口　徳子

情報通信研究機構 未来 ICT 研究所

Key words：細胞内免疫，DNA トランスフェクション，オートファジー，p62，核膜

緒　言

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。オートファジーは、細胞が栄養（アミノ酸）飢餓に陥ったとき、細胞自身の一部を貪食して栄養源として飢餓に耐える仕組みであるが、同様の仕組みが、細胞内に侵入した細菌を除去する場合にも使われている。富栄養下でおこる、このようなオートファジーは Xenophagy と呼ばれる。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・方法開発上の大きな問題となっていた。我々は、この問題を解決するために、DNA などのエフェクター分子を結合した微小な人工ビーズ（直径 約 3 μm，ポリスチレンあるいは磁気ビーズ）を細胞内に導入し、そのビーズ周辺で起こる細胞応答を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察する可視化法を開発した［1］。その方法を用いて DNA ビーズの細胞内での挙動を観察したところ、エンドソーム脱出直後に核膜に類似した膜構造が形成され、その結果、オートファジー膜形成は抑制されることが分かった［2，3］。しかし、外来 DNA の侵入に対する、オートファジー膜形成と核膜形成の関係やその分子基盤など不明な点が多く、その解明が待たれていた。本研究は、これまでブラックボックスだった、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）を作製した。コントロールとして、エフェクター分子を結合していない人工ビーズを用いた。これらのビーズに、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、以下の手順で細胞内に導入した（図 1A）。ビーズを入れる細胞として、GFP-BAF（barrier-to-autointegration factor）あるいは GFP-LC3 （microtubule-associated protein light chain 3）を恒常的に発現するヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、GFP-Ubwt（ubiquitin，野生型）あるいは GFP-Ubunconj （Ubiquitin，結合できない変異体）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（野生型を恒常的に発現する p62 ノックアウト胚線維芽細胞（p62-KO MEF）を用いた。これらの細胞に、人工ビーズを Effectene と混ぜた後に添加し、CO_2 インキュベータ（37 度）で 1 時間培養した。細胞内に取り込まれなかった人工ビーズ取り除くために、細胞を培地で 3 回洗い、さらに 2～3 時間培養した。その細胞を、生きたままの状態で、蛍光顕微鏡（DeltaVision Core、GE Healthcare ; Olympus IX71、対物レンズ UApo40、NA＝1.35、CCD カメラ CoolSNAP HQ2）を用いて経時観察を行った。必要に応じて、細胞を 2%グルタルアルデヒドで 1 時間固定し、オスミウム染色、脱水、Epon 樹脂包埋、切片作製を行い、蛍光観察した同一細胞およびビーズを、電子顕微鏡（JEM1400）を用いて観察した。

結果および考察

1. 外来 DNA に対するオートファジー膜形成の役割

外来 DNA の細胞内での挙動を調べるために、HeLa 細胞に DNA ビーズを導入し、細胞内に入った DNA ビーズを、蛍光顕微鏡を用いて経時観察した。pHrodo の蛍光量を指標に細胞内での挙動を解析したところ、DNA ビーズはまず酸性エンドソーム（pHrodo は赤色蛍光を発する）へと取り込まれた後、エンドソーム膜が破れて細胞質（pHrodo は無蛍光となる）へと入る。そして、エンドソーム膜が破裂した直後数秒で、DNA ビーズに GFP-BAF が集合し、その後、数分から 10 分程度で、核膜様の膜構造が形成される[2]。しかし、核膜形成（エメリン集合）が不十分なビーズでは GFP-LC3 が集合しており、DNA の分解が見られた。コントロールとなる（DNA が結合していない）ビーズでは、エンドソーム膜破裂後、約 10 分程度で、すべてのビーズに GFP-LC3 が集合するのが観察された。そこで、異物となる外来 DNA がどのような仕組みでオートファジーによって分解されるのか、その分子メカニズムを明らかにするために、コントロールビーズを使って検討を行った。

オートファジーにおいてはターゲットタンパク質に対してユビキチン化が起こることが知られているため、このビーズを用いた実験系を用いて、エンドソーム脱出後のいつ・どこでユビキチン化が起こるか、蛍光顕微鏡による time-lapse 観察と、同一細胞に対する電子顕微鏡法（correlative light-electron microscopy）を用いて解析を行った。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）、3 分程度で、GFP-Ubwt のシグナルが集積するのが観察された（図 1B）。これは、エンドソーム膜破裂後に、ユビキチン化が起こることを示している。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（図 1C）、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（図 1D）。

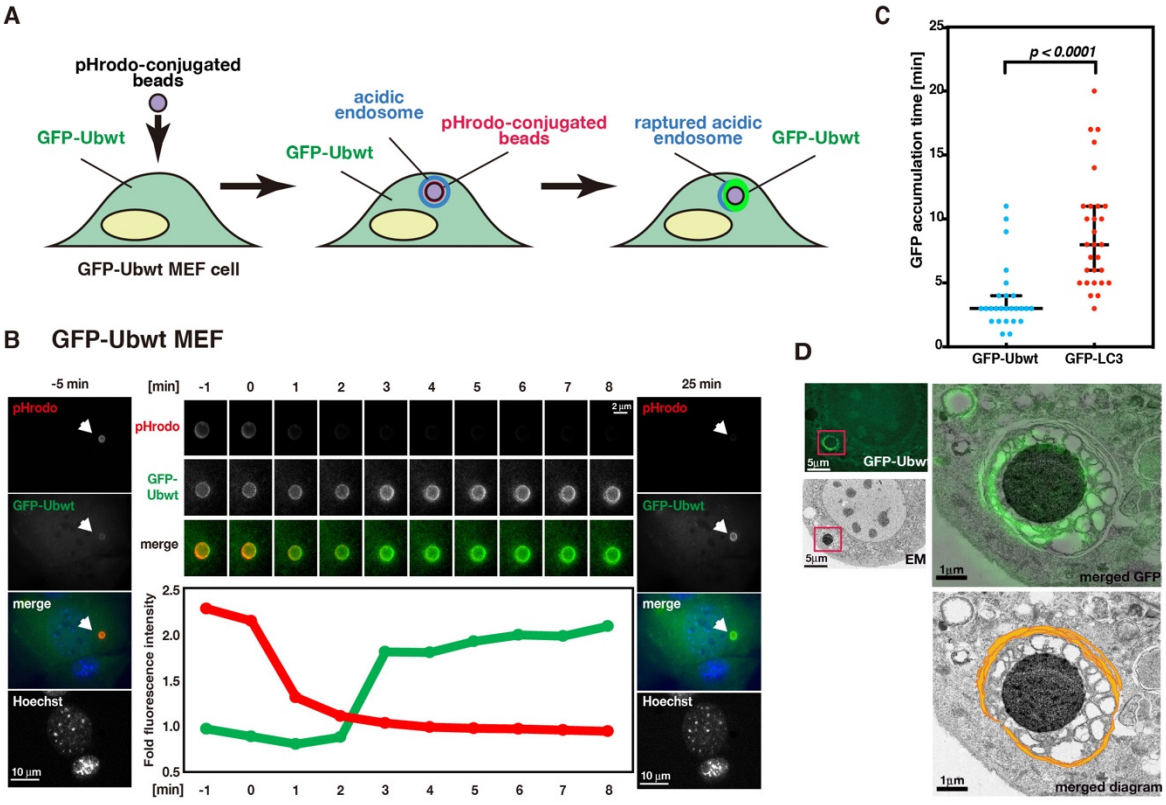


図 1. 外来因子（ビーズ）侵入でみられるユビキチン化はエンドソーム破裂後におこる

A. 実験系の模式図。 B. 細胞内に入ったビーズの蛍光顕微鏡写真。矢印はビーズの位置。グラフは 1 分毎の時間経過を示した。赤は pHrodo の、緑は GFP-Ubwt の蛍光量を示す。 C. ビーズに GFP-Ubwt と GFP-LC3 が集積した時間を示した。有意差検定は Krustal-Wallis test で行った。 D. 蛍光観察した細胞内ビーズ（左上）を電子顕微鏡観察した画像（左下）。右側図の緑は GFP-Ubwt の局在、黄色は隔離膜を示す。

結合できない変異体ユビキチン（GFP-Ubunconj）を発現する細胞にビーズを導入した場合には、ビーズ上への GFP-Ubunconj の集合が見られなかった。このことは、GFP-Ubwt 発現細胞で見られたビーズへの集積は、ユビキチン化を反映していることを示している。

ユビキチン化はオートファジーレセプターの集合に働くと考えられている。そこで、オートファジー受容体のひとつである p62 タンパク質に着目し、ビーズへのオートファジー膜集合に対する p62 の影響を調べた。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、正常が約 3 分で起こるのに対して（図 1B）、この細胞では、約 10 分まで遅延した（図 2A，C）。この細胞に p62 を発現させると、ユビキチン化の速度が、正常のレベルまで回復した（図 2B～D）。この結果は、p62 が、ユビキチン化を迅速化させる働きをすることを示している。さらに、p62 の 405 番目のセリン残基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（図 2C，D）。それに対して、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（図 2C，D）。マウスの p62 の 405 番目のセリンは、ヒトの p62 では 403 番目のセリンに相当する。この結果は、ヒト細胞で報告されている p62 の 403 番目のリン酸化によってオートファジーの働きが亢進することと一致しており、405 番目のセリンのリン酸化が、活性型として、ユビキチン化を迅速化することを示している［4］。

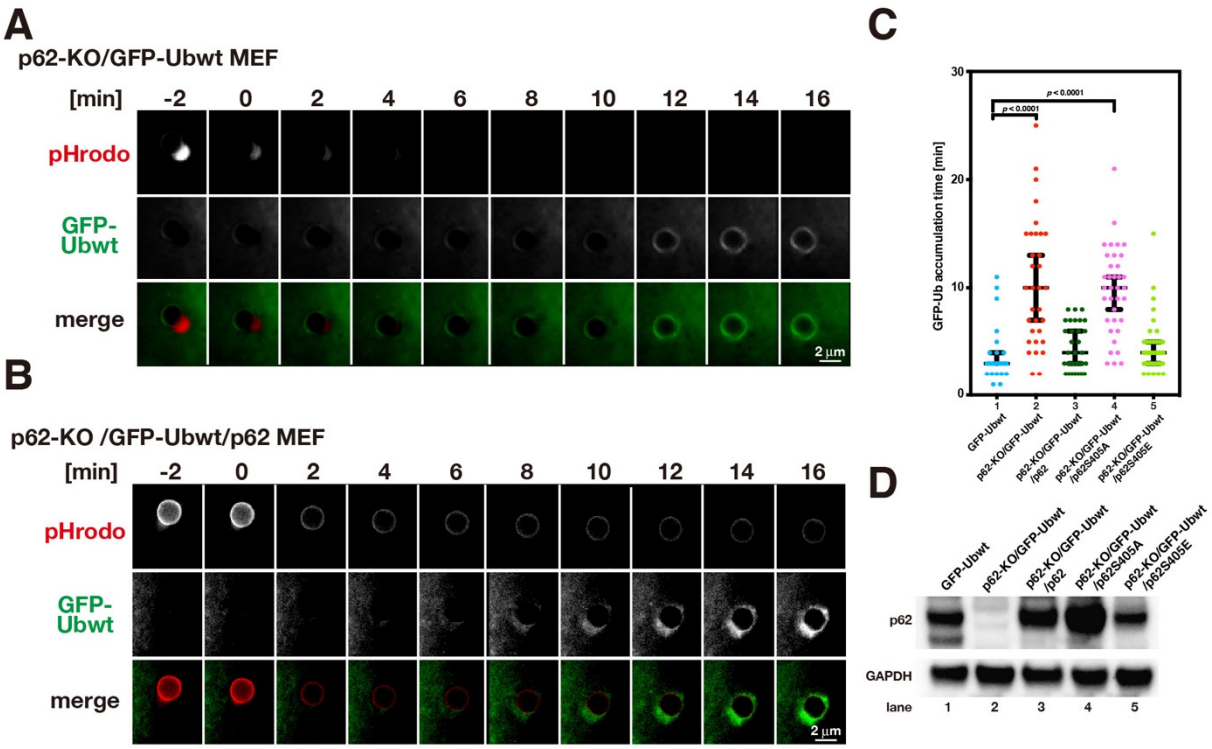


図 2. p62 はユビキチン化を迅速化する

A. p62 ノックアウト MEF に GFP-Ubwt を発現させた細胞にビーズを導入し蛍光 time-lapse 観察した画像。0 分は pHrodo シグナルが消失した時間。 B. p62 ノックアウト MEF に GFP-Ubwt と p62 を発現させた細胞にビーズを導入して蛍光 time-lapse 観察した画像。0 分は pHrodo シグナルが消失した時間。 C. pHrodos シグナルの消失（エンドソーム破裂）から GFP-Ubwt のシグナルが出現するまでの時間。有意差検定は Krustal-Wallis test で行った。 D. ウェスタンブロッティング法による p62 タンパク質の定量。GAPDH は、サンプル使用量を調べるためのコントロール。

3. 外来 DNA に対する核膜形成の役割

DNA を結合したビーズ（DNA ビーズ）を HeLa 細胞内に導入すると、上述したように、DNA ビーズはまず酸性エンドソームへと取り込まれた後、エンドソーム膜が破れて細胞質へと入る。そして、エンドソーム膜が破裂した直後数秒で、DNA ビーズに GFP-BAF が集合し、数分から 10 分程度で、核膜様の膜構造が形成される［2］。この過程を time-lapse 観察すると、核膜形成がオートファジー膜集合に先行して起こると、オートファジー膜集合が抑制されることが分かった。核膜形成に働く因子である BAF をノックダウンした細胞では、オートファジーが有意に増加し、オートファジーに働く因子 p62 をノックダウンした細胞では、DNA ビーズでの核膜形成が亢進し、オートファジー膜集合は抑制された。この結果は、外来 DNA が、細胞質内に侵入したときに起こる核膜形成とオートファジー形成は、互いに競合的な現象であることを示している。面白いことに、外来 DNA 周辺に形成された核膜には核膜孔が存在せず、連続する二重膜構造で DNA を覆っていた。すなわち、外来 DNA をまるで牢屋に閉じ込めたような構造をしていたのである。この“牢屋”核膜の生物学的な意義は、今のところ分かっていない。しかし、我々は、マウス胚性幹細胞（embryonic stem cell，ES 細胞）を用いて、p62 を除去あるいは減少させるとトランスフェクション効率が上がることを見いだしており［5］、この結果は、オートファジーが抑制され、“牢屋”核膜形成が促進されれば、トランスフェクション効率が向上することを意味している。従って、核膜形成は、オートファジーによる分解から外来 DNA を保護し、細胞核への遺伝子デリバリーを促進する働きをすると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院生命機能研究科平岡核ダイナミクス研究室の小川英知、土屋惠、平岡泰、国立研究開発法人情報通信研究機構未来 ICT 研究所の荒神尚子、森知栄、小坂田裕子、小林昇平である。

文　献

1） Kobayashi S, Kojidani T, Osakada H, Yamamoto A, Yoshimori T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in nonphagocytic cells. Autophagy. 2010 Jan;6(1):36-45. Epub 2010 Jan 12. PMID: 19901555.

2） Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jun 2;112(22):7027-7032. PMID:25991860. doi: 10.1073/pnas.1501235112. Epub 2015 May 19.

3） Kobayashi S, Haraguchi T. A novel pathway to detect and cope with exogenous dsDNA. Commun Integr Biol. 2015 Aug 27;8(5):e1065361. PMID:2706494. doi: 10.1080/19420889.2015.1065361.

4） Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T. p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy. FEBS Open Bio. 2018 Feb 7;8(3):470-480. PMID:29511624. doi: 10.1002/2211-5463.12385.

5） Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells.　FEBS Lett. 2016 Aug;590(16):2671-2680. PMID: 27317902. doi: 10.1002/1873-3468.12262. Epub 2016 Jul 4.