

原 著

M12-Tet-Off pTRE2pur FLAG mTRAF3細胞株の樹立

田邊 香野、坂本 瞳、乾 誠治

Establishment of an inducible M12-Tet-Off pTRE2pur FLAG mTRAF3 cell

Kano Tanabe, Hitomi Sakamoto, Seiji Inui

Abstract

IL-4 induces IgE class switching in B cells together with CD40 stimulation. Studies on the signal transduction mechanism downstream of IL-4 receptor have revealed that NF- κ B as well as Jak-STAT pathway plays an important role. We showed the possibility that alternative pathway of NF- κ B was activated after IL-4 stimulation of a murine B cell line M12. Alternative pathway of NF- κ B is strictly regulated by constant degradation of NIK, an essential molecule for NF- κ B activation. TRAF3 is the key molecule to keep the alternative pathway in an inactive state. TRAF3 is also regulated by the constant degradation by ubiquitin-proteasome system. To elucidate the mechanism of the TRAF3 degradation, we prepared Tet-Off gene expression system in M12 to inducibly express TRAF3 which was toxic when overexpressed in cells. Firstly, pTet-Off vector was introduced into M12 cells by electroporation and G418 resistant clones were selected which harbored pTet-Off. Clones were further selected to show high responsiveness to Doxycyclin withdrawal using transient expression of luciferase vector. One of the clones, C''', was transfected with pTRE2pur-mTRAF3 vector to obtain FLAG-tagged mTRAF3 expressing cells upon induction. One clone, C'''-1', was successfully established which expressed mTRAF3 in an inducible manner.

Key words : Tet-Off system, M12 cell, TRAF3, NF- κ B

I. はじめに

1. Tet-Offシステムについて

Tet-Offシステム (Clontech) はタンパク発現誘導システムの一つである。細胞株に導入された

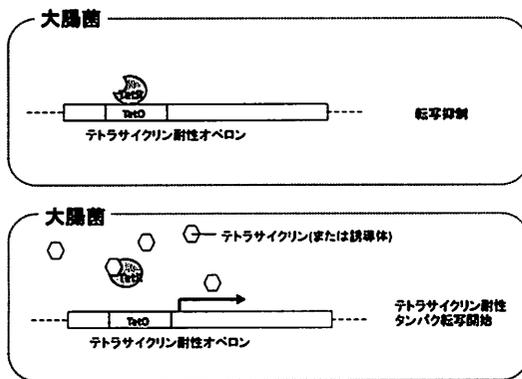
目的タンパクの遺伝子転写はドキシサイクリン (Dox) 存在の有無により調節を受け、ドキシサイクリン存在下で発現が抑制され、非存在下で誘導される[1][2]。Tet-Offシステムは大腸菌のTn10トランスポゾン上にあるテトラサイクリン耐性オペロンに存在するTetオペレーターDNA配列

受付日 2012年11月16日 採択日 2013年1月25日

熊本大学大学院保健教育部・検査技術科学分野・病態情報解析学領域

投稿責任者 (Corresponding author) : 乾 誠治・inui@kumamoto-u.ac.jp

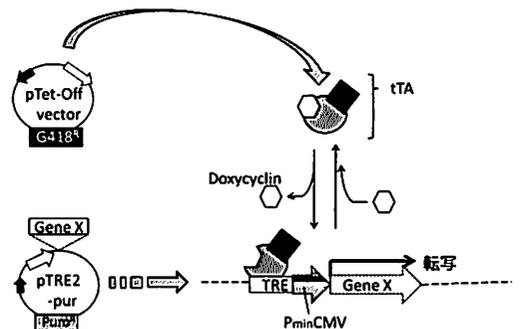
(tetO) とそれに結合するTetレプレッサータンパク (TetR) の2種類の調節因子の機能を基礎としたタンパク発現誘導システムである。大腸菌でのTetRの働きはテトラサイクリン (またはその誘導物質のドキシサイクリン) 非存在下でテトラサイクリン耐性に関与するタンパク質の産生スイッチを切ることであり、TetOに結合し耐性遺伝子の転写を抑制している。一方、テトラサイクリン存在下ではTetRはテトラサイクリンと結合するためTetOから遊離する。それによってRNAポリメラーゼがテトラサイクリン耐性オペロンに結合可能となり遺伝子の転写が開始される。TetRとTetOはテトラサイクリン存在の有無で解離が結合かが変化することでDNA発現を調節するタンパク質とDNA配列である (図：1)。



図：1 テトラサイクリンによるDNA発現調整

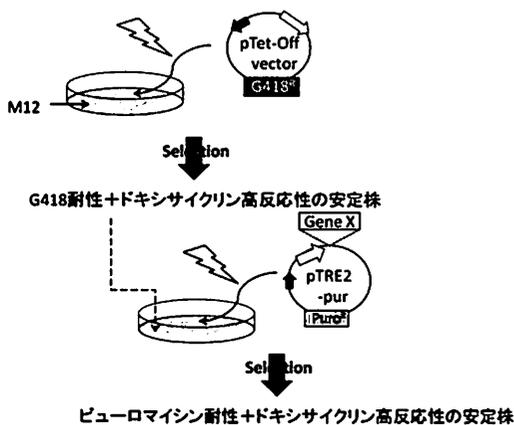
この性質を利用したものがTet-Offシステムであり、TetR配列を含むTet-Off vectorとtetO配列を含むpTRE2pur vectorの二種類を一つの細胞株に安定発現させることで稼動する。Tet-Off vectorにはTetR配列のC末端にヘルペスウイルスVP16活性化ドメインを結合させた融合タンパクであるテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) をコードする配列が組込まれており調節プラスミドとして機能している[3]。このtTA配列とtTAを発現させるために必要なpCMVプロモーター配列を含んだTet-Off vectorを細胞に導入するとtTAの産生を開始する。産生された

tTAはドキシサイクリン非存在下においてTetR部位を介して、後述するpTRE2pur vectorのTRE配列に結合する。結合するとtTAに含まれるVP16の機能によりminimal CMVプロモーターの機能欠損を補い目的遺伝子が転写される。しかし、ドキシサイクリン存在下ではtTAとドキシサイクリンが結合するためtTAはTREより遊離し、転写は抑制される (図：2)。pTRE2pur vectorにはtetOが7回反復したテトラサイクリン応答因子 (TRE) を含む配列が組込まれており、その下流にはminimal CMVプロモーターに続き、目的遺伝子を組込むためのマルチクロニングサイト (MCS) が存在している。minimal CMVプロモーターは転写開始に必要な最小限機能領域を残したCMVの変改プロモーターで、大部分のエンハンサー領域を欠損している。そのためプロモーターが結合しても転写反応が活性化されずその下流にある目的遺伝子は転写されない、または転写されたとしても極少量である。しかしTet Offシステムではその上流のTREにtTAが結合することによりtTAに含まれる転写活性化因子のVP16がエンハンサーとして作用し、minimal CMVプロモーターの欠損した機能を補うことにより下流に組込んだ目的遺伝子が転写される応答プラスミドとして機能している。つまりTet-OffシステムはTREへのtTA結合をドキシサイクリンによりコントロールすることでpTRE2pur vectorに組込んだ遺伝子の転写を調節し、タンパク発現を誘導することができるシステムである。



図：2 調節プラスミドと応答プラスミド

Tet-Offシステムの利点は細胞にとって毒性のあるタンパクでもその機能解析が可能となるという点である[4]。これまではアポトーシス誘導タンパクや過剰発現が致死性である種々のタンパクの機能解析は容易ではなかった。なぜなら機能解析に必要な遺伝子を導入した安定株を確立する前に、細胞は導入されたDNAにコードされている致死性タンパクの産生を開始し、死滅してしまうためである。Tet-Offシステムでは目的タンパクの発現はドキシサイクリン存在下では生じないため、細胞が毒性タンパクによって傷害されない。またTet-Offシステムではドキシサイクリン除去後のタンパクの発現はすばやく誘導され、48時間後にはピークを迎える。さらにこのシステムでは一度ドキシサイクリン除去により誘導されたタンパク発現も、再びドキシサイクリンを添加することにより速やかに転写を抑制できる。そのためタンパク発現のコントロールが容易である。一方、Tet-Offシステムを立ち上げるにあたり注意すべき点として細胞株にTet-Off調節プラスミドと応答プラスミドを導入するとき、一度に導入を行ってはならないという点である。必ず初めに調節プラスミドを細胞に導入し、遺伝子が安定でかつドキシサイクリンに高反応な株を得てから応答プラスミドを導入して得られる2重安定形質転換体を作製しなければならない。(図：3)



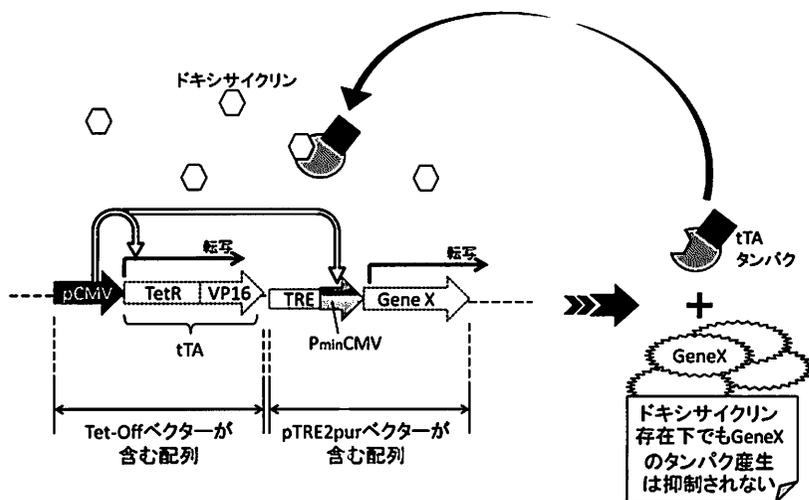
図：3 2重安定形質転換体の作成プロセス

これは、同時に2種類のプラスミドを導入した場合、染色体上に調節プラスミドと応答プラスミドが共組換え体を作る可能性があるからである[5]。プラスミドが共組換え体を作ると調節プラスミドであるTet-Off vector上にあるpCMVプロモーターが隣接した応答プラスミドであるpTRE2pur vectorに組込まれた目的遺伝子をドキシサイクリンの有無に関係なく発現させてしまう(図：4)。つまり目的タンパクの発現がドキシサイクリンでコントロールできなくなってしまうということである。

一方、2重安定形質転換体で作成した場合、一度完全に応答ベクターが安定でドキシサイクリンに高反応な細胞株を得てから調節ベクターを導入するため、2つのプラスミドが並列して導入される可能性は低くなる。さらに両プラスミドが順にドキシサイクリンに対して反応性のよい細胞株のみが選択できるためドキシサイクリンによるコントロールがより正確となる。またTet-Offシステムを稼動するにあたりドキシサイクリンの適切な除去が速やかな目的タンパクの発現に重要となる[6]。ドキシサイクリンの除去が不完全であった場合、ドキシサイクリンが目的タンパクの誘導を阻害する。さらに細胞表面にドキシサイクリンが付着した状態で残る可能性も指摘されており、この場合ドキシサイクリン未添加の培養液で培養しても時間とともに細胞表面に付着していたドキシサイクリンが遊離し、再びtTAと結合することでタンパク発現を阻害する可能性がある。

2. NF- κ Bの二つの活性化経路

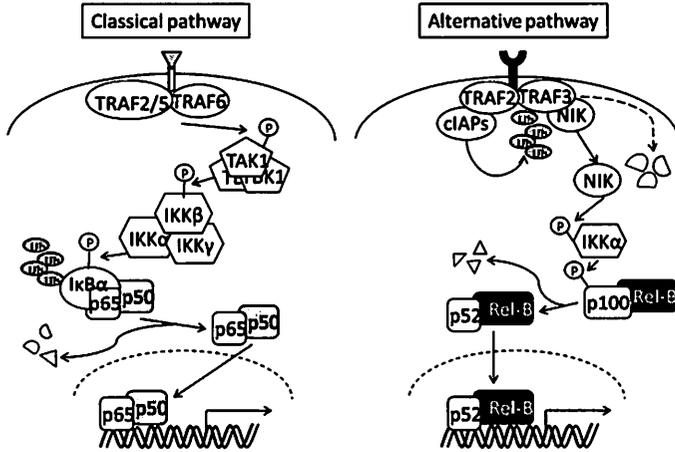
Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) は1986年にDavid Baltimoreらにより同定された転写因子である。NF- κ Bはほぼすべての細胞に発現し、炎症反応や免疫反応の制御において中心的役割を担っている[11][12][13][14][15]。一方、NF- κ Bの活性化が過剰になるとリンパ性腫瘍の腫瘍発生を誘導することが明らかとなっている。このRel/NF- κ Bファミリーにはp65 (RelA)、c-Rel、Rel-



図：4 調節プラスミドと応答プラスミドによる共組換え体

B、NF- κ B1 (p50とその前駆体p105)、NF- κ B2 (p52とその前駆体p100) の5種類が存在し、細胞質で不活性型のヘテロまたはホモダイマーを形成し存在している。NF- κ Bの活性化経路にはClassical pathway とAlternative pathwayの2種類 (図：5) が存在し、活性化シグナルやレセプターなどにより一方または両方が活性化される。Classical pathwayではRelA/p50またはc-Rel/p50などのヘテロダイマーにI κ B α が結合することで核移行シグナルを阻害し、不活性化状態を維持している。そこにInterleukin-1 (IL-1) や Tumor Necrosis Factor (TNF) α などの活性化シグナルがレセプターを介して入ると TNF receptor association factor (TRAF) 6またはTRAF2と5を活性化し、TGF-beta activated kinase (TAK) 1 Complex (TAK1/TAB1/TAB2) をリン酸化する。活性化されたTAK1 ComplexはI κ B kinase (IKK) Complex (IKK α /IKK β /IKK γ (NEMO)) のIKK β をリン酸化し活性化することで活性化状態とし、RelA/p50等に結合しているI κ B α のセリン32と36をリン酸化する。このリン酸化をきっかけにI κ B α はK48ユビキチン化され、プロテオソームによる分解を受ける。遊離したRelA/p50等は核へと移行し転写因子として機能する。一方、Alternative pathway

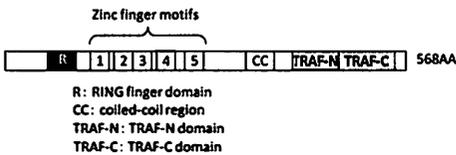
では核移行シグナルを有していない不活性型のRel-B/p100が細胞質に存在している。この状態では活性化に重要なNF- κ B Inducing Kinase (NIK) はTRAF3と結合しその機能を抑制されている。さらにcellular inhibitor of apoptosis (cIAP) 1/2とTRAF2の複合体がTRAF2とTRAF3を介してNIK/TRAF3複合体と結合するためNIKとcIAPsの距離が縮まり、恒常的にcIAPsがNIKをK48ユビキチン化する。K48ユビキチン化を受けたNIKはプロテアソームで分解されるため、ますますAlternative pathwayは不活性化の状態となる。そこにCD40やB cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) などの刺激がレセプターを介して入るとcIAPsはTRAF2によってK63ユビキチン化を受け、活性化する。活性化したcIAPsはK48ユビキチン化するターゲットをNIKからTRAF3に変え、TRAF3を分解することでNIKを遊離させる。遊離したNIKは活性化し、IKK α をリン酸化する。IKK α はRel-B/p100をリン酸化し、p100のC-terminal ankyrin-repeat domain (ARD) の限定分解を導く。限定分解により核移行シグナルが露出したRel-B/p52が生じる。このRel-B/p52が核に移行し、転写因子として機能する。[16][17][18][19]。



図：5 NF-κBの活性化経路

3. TRAF3

TRAF3はTRAFファミリーに属する細胞内シグナル伝達分子でTNFレセプタースーパーファミリーに属するCD40に結合する分子としてクローニングされた。TRAFファミリーはTRAF1, 2, 3, 4, 5, 6, 7の7分子からなっており、その中でもTRAF3は未だ多くの機能が明らかとされていない。構造はN末側にReally Interesting New Gene (RING) フィンガードメイン (R) を、C末側にTRAF-NおよびTRAF-Cドメインを有する。この2つのドメインの間に5つのZincフィンガーモチーフ (Z) と1つのコイルドコイル領域 (CC) を含んでいる (図：6)。TRAFドメインはNIKとの結合に必要であり、さらにTRAF3はE3ユビキチンリガーゼ活性を有している[20][21]。TRAF3はNF-κBのAlternative pathwayを抑制的にコントロールしている一方で、Interferon (IFN) type1の産生では促進的に働いている。



図：6 TRAF3

4. これまで我々の研究室ではマウス成熟B細胞株M12をIL-4で刺激するとNF-κBのAlternative

pathwayが活性化する可能性を示してきた。さらにその活性化にはリン酸化酵素であるCalcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IIの関与が示唆されている。IL-4の刺激はアレルギーの発症に重要なImmunoglobulin E (IgE) クラススイッチを誘導することがわかっており、我々はこのシグナル伝達経路にNF-κBのAlternative pathwayが関与するかどうかを明らかにすることを目的としてM12-Tet-Off pTRE2pur FLAG mTRAF3細胞株の樹立を行った。NF-κBのAlternative pathwayではTRAF3が重要な機能を担っている。しかしTRAF3の過剰発現はM12細胞に致死的である。そこで毒性タンパクの解析を可能にするTet-Offシステムを用いてM12細胞にTRAF3を過剰発現させることとした。

II. 方法

1. 細胞と細胞培養

M12.4.5はBALB/cマウス由来の成熟B細胞株である。M12細胞は37℃の5%CO₂条件下で培養した。培養液はIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (GIBCO) に2mM-glutamine (GIBCO)、100 μg/ml硫酸ストレプトマイシン明治 (明治製菓株式会社)、100U/mlペニシリンGカリウム (Meiji Seikaファルマ株式会社)、5

$\times 10^{-5}$ M2-mercaptoethanol (2-ME) (Wako) を加えたのち、 $0.2 \mu\text{m}$ Pore Sizeのフィルター (NALGENE) を通し、滅菌した後、8%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum : FBS) (Hyclone [Lot: 18037]) を添加したものをを用いた。Tet-Off システムはテトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンを用いてタンパクの発現コントロールを行うシステムだが、多くのFBSにはテトラサイクリン (またはその誘導体) が含まれている。そこでFBSはTet-Offシステムに影響を与えないことを予め確認したロットを用いた。

2. ウェスタンブロット法

培養した細胞は細胞数をカウント後に冷却した $1 \times \text{PBS}$ [NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4] で2回洗い、 4°C で2分間1500rpm遠心し、上清を除いたペレットの状態で -80°C に一旦保存した。細胞を可溶化するときは -80°C のフリーザーから取りだし、すぐさま細胞可溶化液 [1% TNE buffer (10mM Tris-HCl (pH7.8), 0.01% NaN_3 , 150mM NaCl , 1 mM EDTA, 1% NP40), Leupeptin, Sodium ortho-vanadate (Na_3VO_4), Pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Aprotinin] を加え、ボルテックスで破碎しタンパクを抽出した。この時、溶解濃度が 1×10^7 個/mlとなるよう溶解した。ボルテックスした細胞は氷上で20分間静置したのち、 4°C で20分間 13,000rpm遠心し、可溶化分画を回収した。回収した可溶化分画は $2 \times \text{SDS}$ サンプルバッファー [0.078M Tris-HCl (pH6.8), 2.875% sodium dodecyl sulfate (SDS), 12.5% glycerol, 0.078% bromophenol blue (BPB), 6.25% 2-mercaptoethanol (2-ME)] と等量混合しウェスタンブロットのSDS-PAGEにおける泳動サンプルとした。SDS-PAGEはSDS-PAGEポリアクリルアミドゲルは下層の10%セパレーティングゲル [0.375M Tris-HCl pH8.8, 10% Acrylamide, 1% SDS, 0.5% Ammonium persulfate (APS),

0.05% N,N,N',N'-N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethanediamine (TEMED)] を作成後、上層のスタッキングゲル [0.125M Tris-HCl pH6.8, 3.9% Acrylamide, 1% SDS, 0.5% APS, 0.1% TEMED] を重層して作成した。作成したゲルはランニングバッファー [0.025M Tris, 0.192M Glycine, 1% SDS] 中で、200V, 45分間電気泳動を行った。次にSDS-PAGEによって分離されたタンパクは電気プロットング装置を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher&Schuell) にトランスファーした。冷却条件下のトランスファーバッファー [0.025M Tris, 0.192M Glycine, 20% methanol] 中で100V, 60分間行った。トランスファーでタンパクが転写されたニトロセルロース膜は抗体の非特異的結合を防ぐため、ブロッキング溶液 [5% スキムミルク (雪印), TBS-0.1% Tween20 (関東化学)] 中で1時間反応させた。ブロッキング後、TBS-0.1% Tween20で15分1回、5分2回洗浄した。洗浄した膜を目的のタンパク質と結合する一次抗体と1時間反応させた後、TBS-0.1% Tween20で再び15分1回、5分2回洗浄した。その後、二次抗体と1時間反応させ、再びTBS-0.1% Tween20で15分1回、5分4回洗浄した。目的のタンパクはECL Western blotting Kit (Amersham) を用いてHRPと基質の反応により発する化学発光をX線フィルムに30分露光することで検出した。

3. ルシフェラーゼアッセイ

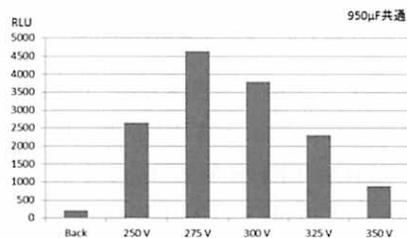
6 cm Dish (FALCON) で培養した細胞を回収し、冷却した $1 \times \text{PBS}$ で2回洗い、 4°C で2分間 5,000rpm遠心し、ペレット状にした。細胞溶解剤 (Pica Gene) を $250 \mu\text{l}$ 加え、室温で15分間溶解した。室温で2分間 2000rpm遠心し、エッペンドルフチューブに上清を $100 \mu\text{l}$ 回収した。回収した上清から $20 \mu\text{l}$ 分注し、発光基質 (Pica Gene) $100 \mu\text{l}$ と混和後、ルミノメーター (MiniLumat LB 9506 (EG&G BERTHOLD)) で20秒間、相対発光強度 (単位: RLU) を測定した。

III. 結果

1. M12細胞のトランスフェクションの条件決定

M12細胞のトランスフェクションの条件決定には電ポレーション法を用いて行った。1回の電ポレーションにつき、ルシフェラーゼ（基質と反応し蛍光を発する酵素）をコードするpGV-C vector（東洋ビーネット）4 μ gを制限酵素Xho I（Roche）で直鎖状にし、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行った。その後、1 \times KPBS [KPBS : 30mM NaCl, 8mM NaHPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 120mM KClに5mM MgCl₂を添加したものとする] 100 μ lに溶解させた（4 μ g/100 μ l）。次にM12細胞を2 \times 10⁶個に調節し、冷却した1 \times KPBSで一回洗ったのち、4 $^{\circ}$ Cで2分間 1500rpmで遠心した。遠心後、冷却した1 \times KPBS 500 μ lに懸濁した（2 \times 10⁶個/500 μ l）。1 \times KPBSに懸濁したDNA 100 μ lとM12細胞 500 μ lをGene pulser Cuvette, 0.4cm (Bio-Rad) に移し、950 μ F一定で、250V, 275V, 300V, 325V, 350Vと電圧条件を変えながら電ポレーションを実施した。各条件で電ポレーション後の細胞を培養液6 mlに懸濁し、3.5cm Dish (FALCON) 2枚に分け2日間培養した。培養後、細胞のトランスフェクション効率を調べるため、ルシフェラーゼ産生量をルシフェラーゼアッセイの相対発光強度によって測定した。その結果より、相対発光強度が最大となった950 μ F, 276Vの条件がM12細胞に最適であると決定した（表1）。

表1：相対発光強度(RLU)を用いたM12細胞へのトランスフェクション効率の決定



※Backgroundはサンプルのかわりに細胞溶解剤と発光基質を混和したものを測定した。

2. M12細胞のピューロマイシン耐性濃度決定

M12細胞は24well Plate 1wellにつき1 \times 10⁵個/mlとなるよう準備した。次にピューロマイシン (CALBIOCHEM) の終濃度が0, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 4.0 μ g/mlになるよう培養液で希釈し、準備したM12細胞に添加した。その後、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂インキュベーターで培養した。耐性濃度決定において各ピューロマイシンを加えた同一のwellを2個用意した。培養液は2日に1回、上清を除いたwellに薬剤を含む新しい培養液を加えた。培養を開始してから8日目にM12細胞の生死判定を、顕微鏡を用いて肉眼で形態学的に判定した。その結果、1.8 μ g/ml以下の濃度ではM12細胞の生存が確認された。一方、2.0 μ g/ml以上ではM12細胞は完全に死滅していた。このことからM12細胞に対するピューロマイシン選択濃度を2.0 μ g/mlと決定した。

3. pTRE2pur vectorに FLAG mouse TRAF3 DNAを組み込んだプラスミド (pTRE2 pur-FLAG mTRAF3) の作製

pEF-BOSS FLAG mouse TRAF3をテンプレートとし、5'側にBamHI、3'側にEcoRVの制限酵素サイトが付加されるように設計したPrimerを用いたPCRによってFLAG mouse TRAF3 [TRAF3 isoform A : CCDS26175.1]のクローンを作成した。まずpEF-BOSS FLAG mouse TRAF3をSph I (Roche)で直鎖状にし、フェノール/クロロホルム抽出後にエタノール沈殿を行った。このエタノール沈殿したプラスミドを10mM Tris pH7.5で0.25 μ g/ μ lになるよう可溶化し、PCRでFLAG mouse TRAF3をクローン化するためのテンプレートとして用いた。PCR反応液はmilli-Q water, 10 \times Pfu buffer, 2mM dNTP mix, pEF-BOSS FLAG mouse TRAF3 250ng, For Primer 3.2 pmol/ μ l, Rev Primer 3.2 pmol/ μ l, 2.5Unit/ μ lのPfuポリメラーゼ (STRATAGENE) を0.2mlチューブに混和し、ミネラルオイルを重層した。混和したサンプルは

下記の設定でPCR [ASTEC PC-320] を行った。95℃, 2分間反応後、95℃ 1分間, 55℃ 1分間, 72℃ 2分間を30サイクル反応させた。最後に72℃で7分間反応させた(図: 7)。

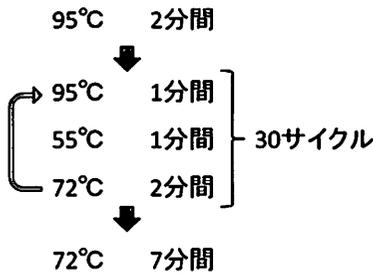


図: 7 PCR反応条件

PCRに用いたPrimerの配列はFor: 5'-GGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGAC-3'と Rev: 5'-GATATCTCAGGGGTCAGGCAGATCCGAGGT-3' (北海道システム・サイエンス株式会社) である。PCRで得られた、BamH I-FLAG mouse TRAF3-EcoR Vフラグメントはフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿を行った後に10mM Tris pH7.5に溶解させた。溶解したフラグメントは1%アガロースゲルのDNA電気泳動法により、フラグメントとPrimerを分離させた後、フラグメントのみをゲルから切出して回収した。このときBamH I-FLAG mouse TRAF3-EcoR VはPfuポリメラーゼを用いて作成したため、両端が平滑末端の状態にある。このフラグメントをシーケンスするために、Sma I (BioLabs) で直鎖状にしたpUC18 vectorを準備した。これらフラグメントとベクターをDNA Ligation Kit ver.2.1 (TAKARA) を用いてライゲーションした。ライゲーションしたプラスミドは大腸菌 XL1-Blueにカルシウム法を用いて形質転換した。ブルー・ホワイトセレクションを行い、プラスミドが形質転換されたXL1-Blueを回収・増殖した後、Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) でプラスミドを精製した。この精製したプラスミドをテンプレ

ートとし、シーケンスを行った。シーケンスはBigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を使い、96℃ 1分間反応後96℃ 10秒, 50℃ 5秒, 60℃ 4分間を25サイクルPCR反応 [ASTEC PC-320] (図: 8) させた。反応液をBigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) で精製し、injection secondを15secに設定したABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析を行った。

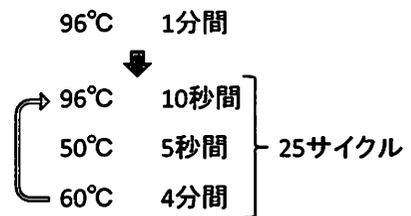


図: 8 シーケンス反応条件

シーケンスに用いたPrimerは以下の6種類である。

M13-47: 5'-CGCCA GGGTT TTCCCAGTCA CGAC-3', pUC REV: 5'-AGGAAACAGCTATGACCATG-3', mTRAF3 280For: 5'-AGTCCAAAATGCACAGCGT G-3', mTRAF3 REV1311: 5'-CCATGACGGCCTCTGCTTC-3', mTRAF3 For690: 5'-CTTGTCCGAGTGTGTCAATG-3', REV690: 5'-CATTGACACACTCGGACAAG-3' (北海道システム・サイエンス株式会社)。(図: 9)

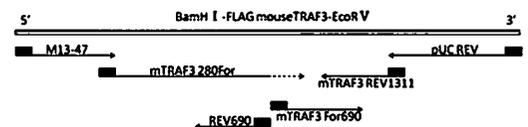


図: 9 シーケンスPrimer

シーケンス後、pTRE2pur vectorおよびpUC18 vectorに組込まれたBamH I-FLAG mouse TRAF3-EcoR VをそれぞれBamH I (BioLabs) とEcoR V (BioLabs) でダブルダイジェストした。直鎖状になったベクターアームと

切出されたフラグメントは各々1%アガロースゲルのDNA電気泳動法で夾雑物と分離し、それぞれベクターアームとフラグメントのみをゲルから切出し、精製した。さらにそれぞれをフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿後、10mM Trisに溶解した。その後このベクターアームとフラグメントをDNA Ligation Kit ver.2.1 (TAKARA) を用いてライゲーションし、pTRE2pur vectorにBamH I と EcoR V でFLAG mTRAF3を組み込んだプラスミド (pTRE2pur FLAG mTRAF3) を作成した。プラスミドはXL1-Blueにカルシウム法にて形質転換し、プラスミドを増幅後、Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) で精製した。

4. M12-Tet-Off細胞株の樹立

M12細胞にTet-Off vectorをエレクトロポレーション法を用いて導入した。まずSca I (BioLabs) で直鎖状にしたTet-Off vector 10 μ gを、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿後に1 \times KPBS 100 μ lに溶解した。次にM12細胞を10⁷個準備し、冷却した1 \times KPBSで1回洗浄した後、4 $^{\circ}$ Cで2分間 1500rpm遠心し、1 \times KPBS500 μ lに懸濁した(10⁷個/500 μ l)。1 \times KPBSに懸濁したDNAとM12細胞をGene pulser Cuvette, 0.4cm (Bio-Rad) に移し、276V, 950 μ Fの条件でエレクトロポレーションを行った (Gene Purser II)。DNAを導入したM12細胞は中フラスコ (Nunc) で2日間培養したのちG418によって薬剤選択を行った。G418はアミログリコシド系の抗生物質で、80Sリボゾームの機能に干渉し、真核細胞のタンパク質合成を阻害する。そのためG418耐性遺伝子が組み込まれたTet-Off vectorが導入されなかったまたは安定して発現できなかったM12細胞は死滅する。つまり、G418で薬剤選択することにより、Tet-Off vectorが組み込まれていないM12を除くことが可能となる。G418による薬剤選択は中フラスコから24 ウェルプレート (FALCON) にM12細胞が2 \times 10⁵個/mlに

なるよう調節し、1mg/ml G418硫酸塩 (Wako) を含む培養液で、3~4日に一度培養液を交換しながら観察した。増殖してきた細胞から順に24ウェルプレート1wellから6ウェルプレート (IWAKI) 1wellに移した。生存したM12細胞はTet-Off vectorが組込まれることでG418耐性を獲得した細胞株であり、6ウェルプレート4wellになるまで増殖させ、ドキシサイクリンに対して高反応性を示すクローンのみを以下の方法でさらに選択した。耐性株はTet-Off vector にコードされたtTAを産生している状態であり、一過性にルシフェラーゼをコードしたpTRE2pur-Luc vectorをエレクトロポレーションで導入すると、ドキシサイクリン非存在下でTRE配列にtTAが結合し、ルシフェラーゼ産生を誘導する。産生されたルシフェラーゼはルシフェラーゼアッセイによりその産生量を確認した。このドキシサイクリンによるルシフェラーゼ産生制御を最もよく受けていた株のみ選択した。G418耐性株6~8 \times 10⁶個を1 \times KPBS 500 μ lに懸濁したものとPvu I (BioLabs) で直鎖状にし、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿をしたpTRE2pur-Luc vectorを1 \times KPBS 100 μ lに懸濁したものを準備し、これらを950 μ F, 275Vの条件でエレクトロポレーションを行った。反応液は8mlの培養液に懸濁し、6cmDish 2枚に分け、一方に1 μ g/mlドキシサイクリン (MP Biomedicals) を添加し、もう一方は未添加の状態でも24時間培養した。24時間後、細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行った。ドキシサイクリン存在下 (+)・非存在下 (-)での蛍光強度を比較した結果、ドキシサイクリン (+)の相対発光強度が低く、(-)で高くなる細胞株A・B・Cを得ることができた(表2)。

表：2 3クローンのルシフェラーゼアッセイ結果

| | A | B | C |
|-------------|-------|--------|--------|
| Dox(+)[RLU] | 3499 | 8544 | 14060 |
| Dox(-)[RLU] | 69114 | 218240 | 403610 |
| (+)/(-)[倍] | 19.7 | 25.5 | 28.7 |

次にドキシサイクリンに対して高反応性を示したG418耐性株3クローンを限界希釈法で単クローンにした。まずA, B, Cの耐性株をそれぞれ計算上0.45個/100 μ lになるよう準備した。これらを1 mg/ml G418を含む培養液30mlに懸濁し、96ウェルプレート3枚に1 well 100 μ lとなるよう12-Pette (costar) を用いて撒いた。その後、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂インキュベーターで培養し、順次増殖してきた3つの耐性株のサブクローンを24ウェルプレートに移した。その後、細胞の増殖に合わせ培養を6ウェルプレートに変更し、80%コンフルエントなwellが4つになるまで増殖させてから、再びドキシサイクリン反応性を同様に調べた。その結果、A' およびC' を得た(表3)。

表：3 2クローンのルシフェラーゼアッセイの結果

| | A' | C' |
|-------------|--------|--------|
| Dox(+)[RLU] | 21557 | 16512 |
| Dox(-)[RLU] | 594691 | 543776 |
| (+)/(-)[倍] | 27.6 | 32.9 |

さらにこの得られた2クローンに対して再び限界希釈法による選択を行った。その結果、安定したドキシサイクリン反応性を示すC''を得た(表4)。

表：4 C''サブクローンのルシフェラーゼアッセイ結果

| | C'' |
|-------------|--------|
| Dox(+)[RLU] | 7959 |
| Dox(-)[RLU] | 157495 |
| (+)/(-)[倍] | 19.8 |

5. FLAGタグ付きmouse TRAF3 Tet-Off 誘導可能細胞株(M12-Tet-Off pTRE2pur FLAG mTRAF3)の樹立

4.で樹立したドキシサイクリン高反応性のG418耐性株 C''(M12-Tet-Off細胞) 1×10^7 個およびPvu Iで直鎖状にし、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿により調整しpTRE2 pur-FLAG mTRAF3 10 μ g/mlをそれぞれ 1×10^6 cells/mlに懸濁し950 μ l, 275V

の条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、C''を0.5mg/ml G418が含まれる培養液30mlに懸濁し、中フラスコで2日間培養した。その後、培養液を0.5mg/ml G418硫酸塩, 2 μ g/ml ピューロマイシン(CALBIOCHEM), 1 μ g/ml ドキシサイクリンが添加されたものに変更し、24ウェルプレートに 2×10^5 個/ml になるよう調節し播種した。プラスミドのpTRE2 pur-FLAG mTRAF3にはピューロマイシン耐性遺伝子がコードされているため、ピューロマイシン存在下で増殖してきた細胞はこのベクターが導入されたC''であることがわかる。培養液は2日に一度新しいものに換えた。また先に導入したTet-Off vectorの脱落防止のため、選択時より低濃度のG418を加え、TRE配列にtTAが結合することで誘導されるFLAG mTRAF3の発現を抑制するためにドキシサイクリンを加えた。増殖してきた細胞には順次番号をつけ、必要量まで増殖させた後、一部を凍結保存に用い、残りをドキシサイクリン高反応性クローンであるかを調べる実験に用いた。凍結保存は 8×10^6 個/ml程度の細胞をFreeze液[10% DMSO(Wako), 90%FBS] 2mlに懸濁し、凍結チューブ(WHEATON) 2本に1mlずつ分注し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。ピューロマイシン耐性かつドキシサイクリン高反応性株の選択は耐性株を6ウェルプレート各1wellにドキシサイクリン存在下(+)と非存在下(-)で培養し、FLAG mTRAF3発現量がドキシサイクリン(+)と比較しドキシサイクリン(-)でどれだけ上昇しているのかをウエスタンブロット法で検出することで選択した。まず6ウェルプレート1wellまで増殖した耐性株の細胞数をトリパンブルー法でカウントし、ドキシサイクリンを含まない培養液で2回洗った。これは耐性株が増殖するまでの培養液にはFLAG mTRAF3の産生を抑制する目的でドキシサイクリンを添加しているため、それを除去する目的で行った。その後、0.5mg/ml G418, 2 μ g/ml ピューロマイシンを含む培養液 6mlに懸濁し、新しい6ウェ

ルプレート 2 wellに 3 mlずつ細胞を戻した。2 well中 1 wellはドキシサイクリン (+) で培養するため 1 μ g/mlドキシサイクリンを添加した。もう一方はドキシサイクリン (-) で培養するためそのまま培養を開始した。培養開始から 4 時間後にドキシサイクリン (-) は再度回収し、新しい 0.5mg/ml G418, 2 μ g/ml ピューロマイシンを含む培養液と交換した。これは細胞表面にドキシサイクリンが残存し、培養液中に遊離してくるため、それを除く目的で行った。培養開始から 48 時間後にドキシサイクリン (+)、(-) で培養した細胞を回収し、カウントした。カウント後、ペレットにしてから -80°C のフリーザーで一旦保存した。ペレットは細胞可溶化液で可溶化後、一次抗体の抗FLAG M2抗体 (Stratagene) および二次抗体のhorseradishperoxidase (HRP) 標識 Goat抗mouse Ig κ 鎖抗体を用いてウエスタンブロットを行い、耐性株のFLAG mouse TRAF3の発現量を比較した。その結果、C''-1とC''-2がドキシサイクリン高反応性株として得られた。得られた 2 クローンを限界希釈法により選別し、ピューロマイシン耐性であるドキシサイクリン高反応性の単クロン株C''-1'を得た (図: 10)。

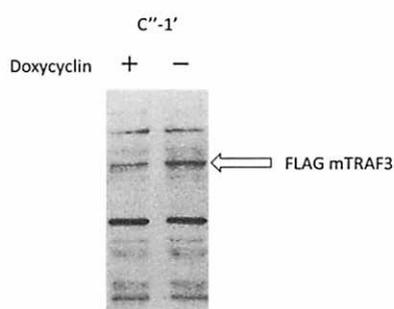


図: 10 樹立したM12-Tet-Off pTRE2pur FLAG mTRAF3

IV. 考 察

Tet-Offシステムは細胞の種類によって、目的遺伝子発現を誘導的に調節できる細胞株の樹立が困難な場合も存在するがM12細胞にはTet-Offシ

ステムを適応できることが明らかとなった。樹立に当たり培養した多数のクロンは細胞の増殖スピードや顕微鏡下観察における形態にクロン間の差があった。特に増殖スピードに関しては早いものよりも比較的遅いクロンの方が安定したドキシサイクリン高反応性を示した。実際、M12-Tet-Off細胞株ではM12細胞にTet-Off vectorを導入後に得られたクロンをルシフェラーゼアッセイを用いてドキシサイクリン高反応性を調べたところ、最終的に 2 回の限界希釈法により選別された細胞株は増殖スピードが遅いC'であった。さらに樹立したC''-1'の増殖スピードも遅いものだった。これまでTRAF3の過剰発現は細胞にとって致命的であり多くのTRAF3機能解析はTRAF3 KOが一般的であった。しかし、今回樹立したC''-1'はドキシサイクリン存在下では細胞の生存には不備を来さず、かつドキシサイクリン除去による十分なTRAF3発現を誘導できることから、今まで明らかとされていなかったTRAF3の機能解析が可能となり、さらにTRAF3が過剰の場合NF- κ B Alternative pathwayに与える影響も解析が可能となる。さらに今後、この樹立した細胞株を用いIgEクラススイッチにおけるTRAF3とIL-4レセプターの関係、 α 4やCaMK IIがどのように制御に関わっているかなどTRAF3のK48ユビキチン化を指標とし解析していく予定である。TRAF3の機能にはまだ明らかにされていない点が多くこの研究により新しいIgEクラススイッチのシグナル伝達解析のみならずTRAF3を制御する分子を同定することが可能となることが期待される。

V 引用文献

- [1] Gossen M and Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 5547-5551.
- [2] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W and Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science 268: 1766-1769.

- [3] Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL. 1988. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2: 718-729.
- [4] 2004. Tet-On & Tet-Off 誘導発現システムによる有毒遺伝子の発現. クロンテクニーク. 春号. 18-19
- [5] Chao C and Chasin LA. 1988. Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 24: 249-256
- [6] Rennel E and Gerwins P. 2003. Ensuring Induction in the Tet-Off Expression System. クロンテクニーク. 4. 12-13. Technical Note. Clontech
- [7] Gould HJ and Sutton BJ. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* 8: 205-217
- [8] Geha RS, Jabara HH and Brodeur SR. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews Immunology* 3: 721-732
- [9] Miyazaki T et al. 1994. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits *Science* 266: 1045-47.
- [10] Russell, SM et al. 1994. Interaction of IL-2R beta and gamma-c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 266: 1042-45.
- [11] Gilmore TD. 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6 680-6684.
- [12] Brasier AR. 2006. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* 6: 111-30.
- [13] Perkins ND. 2007. Integrating cell-signaling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 4962.
- [14] Gilmore TD. 1999. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844.
- [15] Tian B et al. 2003. Identification of a nuclear factor κ B-dependent gene network. *Recent Prog. Horm. Res.* 58: 95-130.
- [16] Li Q et al. 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2: 725-734
- [17] Karin M et al. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Reviews Immunology* 18: 621-663.
- [18] Senftleben U et al. 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293: 1495-1499.
- [19] Hayden MS et al. 2008. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132: 344-362.
- [20] Häcker H., Tseng PH and Karin M. 2011. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature Reviews Immunology* 11: 457-468.
- [21] Bishop GA. 2004. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nature Reviews*