オートファジーの誘導：Tat-D11とは、Tat-Beclin 1よりも優れた活性を有する、非常に強力かつ特異的なオートファジー誘導性ペプチド

要約

オートファジーを誘導するための多くの標準的手法は、望ましい特異性に欠ける。飢餓、及び MTORC1 のアロステリック阻害剤であるラパマイシンの両者は、オートファジー以外にも生物学的プロセスを調節することが知られている。これらの手法の非特異的性質は、データ解釈を複雑化し、オートファジーを解析するための機能欠損型オートファジー変異体が好まれる傾向を推進してきた。2013年に、工学的に作成された Tat-Beclin 1 の発見が、他の経路を非特異的に調節することなくオートファジーを誘導する初めての手法を提供した。HIV-Tat タンパク質に融合させられた Beclin 1 のオートファジー誘導性領域から成るペプチドが、オートファゴソーム及びオートリソソーム数、並びにタンパク質分解を上昇させることが論証された。それ以来、Tat-Beclin 1 ペプチドは、in vitro 及び in vivo の両方でオートファジーを問題なく誘発するために広く使用されてきた。ここでは、我々は、より短い Tat-Beclin 1ペプチドが、オートファジーを誘導する強化された能力を有することを論証する。このより短いペプチド Tat-D11は、より長いペプチド Tat-Beclin 1 と比較して、5 倍ほど大きく、オートファゴソーム及びオートリソソームの誘発を上昇させる。これらの結果は、Tat-Beclin 1よりも Tat-D11の能力がより優れていることを証明する。

背景

オートファジーは、細胞の成分やバルクタンパク質が分解されることによっての（主に、飢餓時やストレス下、リサイクル中）厳密に制御された生物学的プロセスの組立である。細胞質の成分は隔離され、リソソームまたは液胞内腔中へと移動させられ、そこでその基本成分へと分解され、再利用のために細胞質へと戻される。ユビキチン－プロテアソーム系（UPS）に並び、オートファジーは、タンパク質の恒常性のための重要なメカニズムである。これにより、品質制御プロセスの一環として、機能が損なわれた長命のタンパク質及び細胞小器官が分解される［1, 2］。

マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの 3 つのタイプのオートファジーがこれまでに報告されています［8］。マクロオートファジーには、細胞質積荷をリソソームへと輸送するためのオートファゴソームである、二重膜小胞が関与する。このプロセスの間に、オートファゴソームはリソソームと融合し、オートリソソームの形成をもたらす。ミクロオートファジーは、細胞質積荷がリソソームへの直接輸送に関与している。シャペロン介在性オートファジーは、細胞質タンパク質が、LAMP-2A（リソソーム関連膜タンパク質 2A）受容体を介してリソソーム膜を横切るように輸送される際に起こる。

細胞及び組織の恒常性におけるオートファジーの非常に重要な役割ゆえ、オートファジーの妨害は、疾患的、及び病態生理学的状態を促進しうる。オートファジーの欠損は、マウスにおいてはミスフォールドされたタンパク質の蓄積を引き起こし［3-5］、またユビキチン化されたタンパク質及び封入体を生じ、神経においては神経変性、また心臓肥大を引き起こすことが示されてきた［6, 7］。

ラパマイシン、飢餓、カルバマゼピンを含むオートファジーを誘導する一般的な手法は、オフターゲット効果を誘発し、オートファジー単独ではなく、細胞プロセスを非特異的に制御する。これらの手法を用いて作成されたデータは、これらの化合物が他の無関係な生物学的プロセスをどのように制御するかの理解を伴って、注意深く解釈されなければならない。

強力で特異的なオートファジー誘導剤が作成された詳細については、2013年Natureの論文に記述されております[9]。Shoji-Kawata らは、オートファジー誘発性タンパク質 Beclin 1 の一領域に位置づけられたペプチドを設計し、細胞中へのトランスダクションを容易にするためにそのペプチドを HIV-1 Tat タンパク質に連結させた。その Tat-Beclin 1ペプチドは、オートファジーの負の調節因子 GAPR-1（GLIPR2 としても知られる）と相互作用することにより、オートファジーを誘発した。Tat-Beclin 1 ペプチドは、小さなポリグルタミン伸長タンパク質凝集体を除去し、いくつものプラス鎖 RNA ウィルスの力価を低下させ、またヒトマクロファージにおける HIV 複製を阻害した。

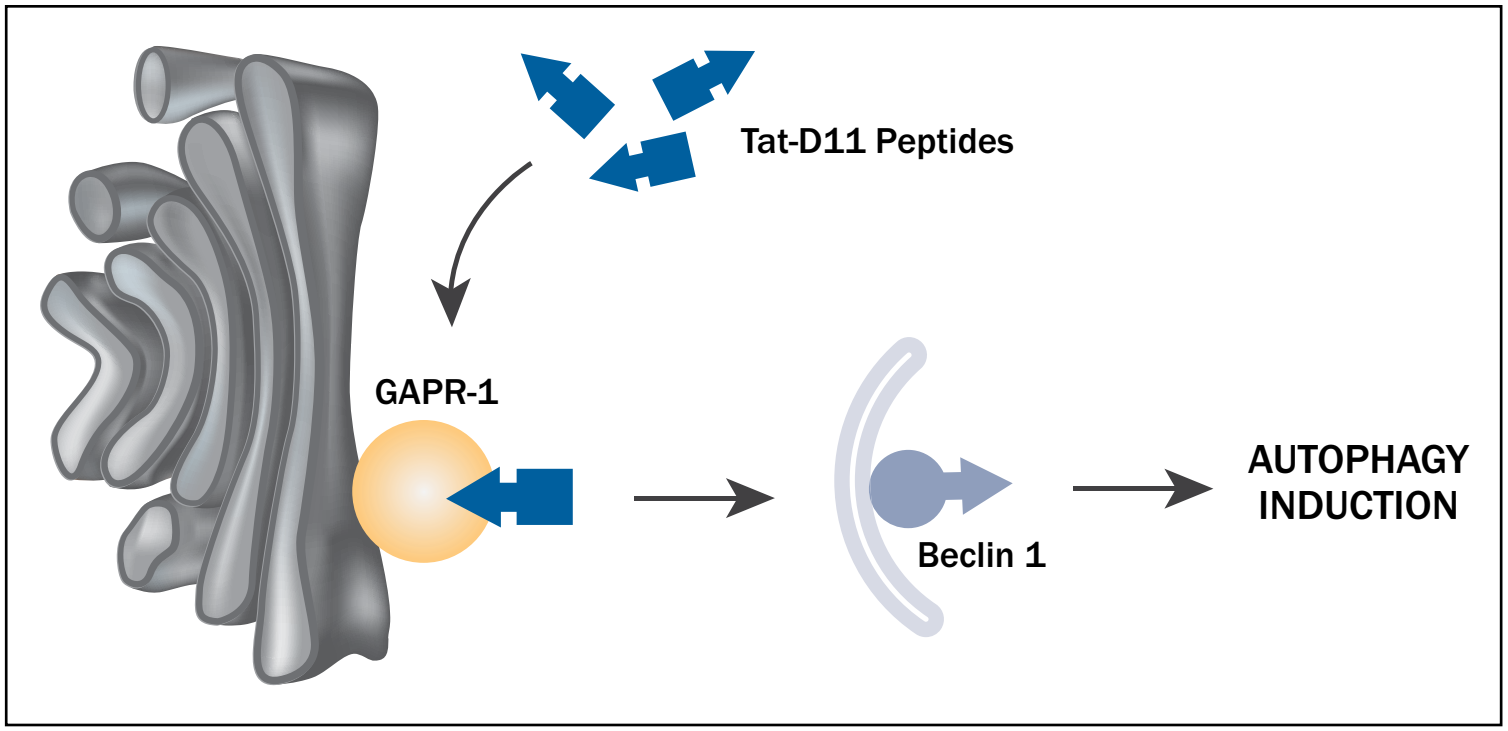
ここで我々は、より短い Tat-Beclin 1 ペプチドである Tat-D11 のオートファジーを誘導する能力が大いに改善されたことを論証する。それは、Tat-Beclin 1 と比較して上昇したオートファゴソーム及びオートリソソーム数が証拠となる。より短い Tat-D11 ペプチドは、元の Tat-Beclin 1 ペプチドと比較して 5 倍より大きく、オートファジー誘発を向上させた。

ペプチド

Tat-D11 [NBP2-49888]: Tat-11 の D アミノ酸レトロインベルソ型。Tat-D11 は、より優れたオートファジー誘発物質である。

Tat-L11 [NBP2-49886]: 可溶性を上昇させるために HIV Tat タンパク質に連結させられた、オートファジー誘発物質 Beclin 1 に由来するアミノ酸１１個を有するペプチド。

Tat-L11S [NBP2-49887]: Tat-L11 に由来する、不活性のスクランブルされた対照ペプチド。



GAPR-1/GLIPR2はオートファジーの負の調節因子であり、Beclin 1に結合してオートファジーを抑制します。Tat-D11ペプチドの存在下でGAPR-1に結合されたBeclin 1が遊離され、Beclin 1がオートファゴソーム形成及びオートファジーの誘導を媒介させることができます。

結果と方法

図 1 及び 2 は、現在使用されている長い Tat-Beclin 1 ペプチドに比べ、Tat-D11による非常により優れたオートファジー誘導を描写する。細胞が、96 ウェル培養プレート（黒色）中に 1.5 x 10^6 細胞／mL で蒔かれ、集密度 ~80% になるまで 3 7 ℃にて 5% CO_2 で一晩育てられた。ペプチドは、1mM になるように無菌の超純水中に溶解させられ、それから 0.15% 6N HCl で酸性化した Opti-MEM へと添加された。Tat-Beclin 1 、Tat-D11、及びそのペプチドのスクランブルされたバージョンである Tat-L11Sのペプチドを用い、最適な誘発濃度を見つけるために、20uM で始まる 1:2 連続希釈が使用された。細胞は、37℃にて 5% CO_2 で 1.5時間インキュベーションされた。ペプチドが除去され、細胞は 4% パラホルムアルデヒドで室温にて 20 分間固定された。細胞は無菌の 1X PBS (pH 7.0) で洗浄され、それからブロッキングバッファー (1X PBS、0.1% Triton-X、及び 5% BSA) で、室温にて 1 時間ブロッキングされた。細胞を対比染色するには、1X PBS 中に 1:10,000 希釈された DAPI に加え、1:200 希釈されたNeuroTrace Red (Invitrogen) が使用された。解析のため、プレートはホイルで封をされた。解析は、Operetta ハイコンテンツイメージングプラットフォーム上で実施され、各ウェル内の 11 のスポットからの GFP 斑点は 40X で数えられた (n=33) 。

Tat-D11 ペプチドによる LC3B の誘導及び p62 の減少を示すウェスタンブロットが、図 3 に示される。12 ウェルプレートがペプチドで 1.5 時間にわたり上記のように処理された。細胞溶解は、ウェルあたり、150uL の M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo 78501)、これと共に 1:00 の HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo 78442) を使用して行われた。プレートは、室温にて 10 分間インキュベーションされ、穏やかに揺さぶられた。細胞がプレートから擦り剥がされ、4 ℃にて 10 分間 13500rpm で遠心沈殿された。細胞片は除外され、30uL の 6X Lamelli Reducing SDS ローディングバファーが 150uL の上清に加えられた。その溶液は 95°C にて 5 分間煮沸”しそ”れからローディングする前に室温まで冷却された。5-20% 勾配ゲルが、10uL の還元された試料でローディングされ、1 時間にわたり 130Vにて流された。ゲルは、1 時間かけて 100V にてニトロセルロース膜に転写された。膜は、PierceTM Protein-Free (PBS) Blocking Buffer (Thermo 37584)中で、室温にて 1-2 時間かけてブロッキングされた。細胞はそれから、Pierce Protein-Free Blocking Buffer 中で、各抗体で一晩かけて染色された。

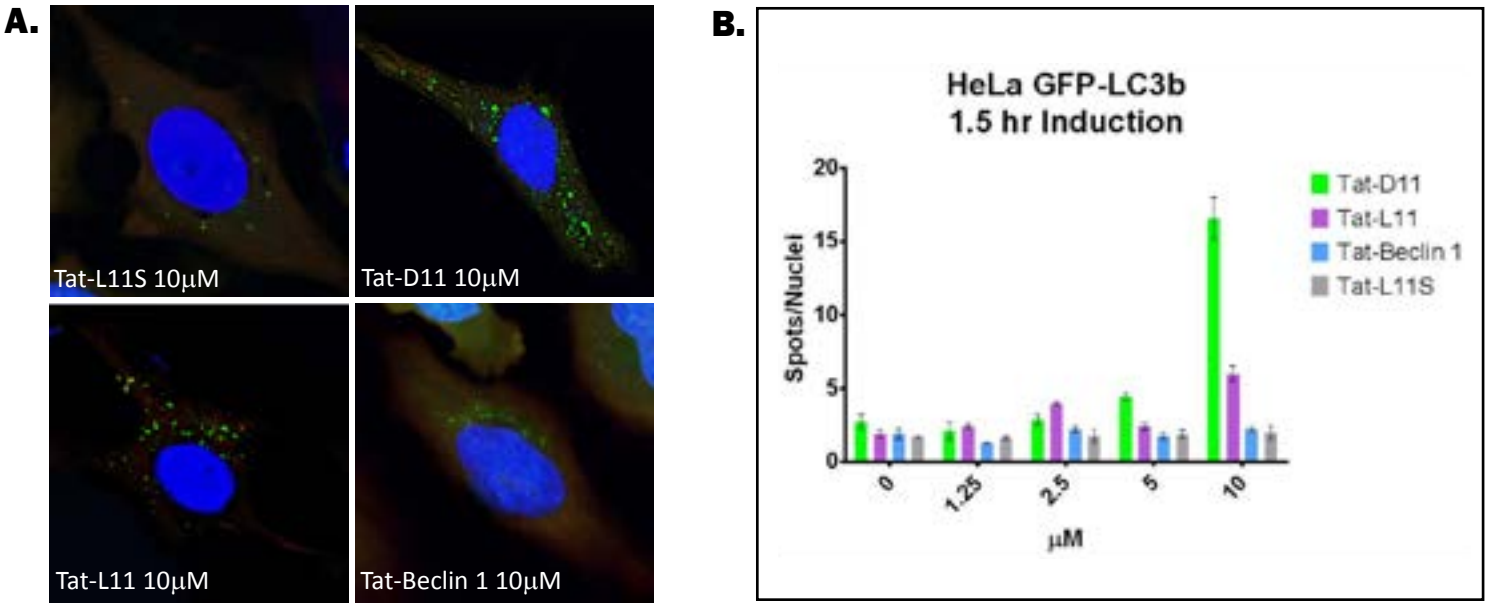


図 1 Tat-Beclin 1 に比べ、Tat-D11 はより強力なオートファジー誘導物質である。HeLa GFP-LC3Bが、Tat-D11、Tat-L11、または Tat-Beclin で1.5 時間にわたり処理され、(A) オートファゴソーム数が蛍光顕微鏡法により評価され、(B) GFP+ / LC3B+ スポット数が定量化された。

使用した抗体：LC3B (Novus Biologicals社 NB100-2220；2 μg/mL)、SQSTM1/p62 (Novus Biologicals社 MAB8028；2 μg/mL)、Actin (Novus Biologicals社 AF4000)。翌日、膜は 脱イオン水で濯がれ、室温にて 1時間かけて 1X TBSTで洗浄された。膜は、室温にて 1 時間かけて各抗体で対比染色された。使用した二次抗体：Goat anti-Rabbit IgG HRP (Novus Biologicals社 HAF008；1:1000)、Donkey anti-Mouse IgG HRP (Novus Biologicals社 HAF018；1:1000)、Donkey anti-Sheep IgG HRP (Novus Biologicals社 HAF016；1:1000)。膜は 1X TBST 中で 2 時間かけて洗浄され、それから WesternGlo A 及び B の1:1 溶液を使用し、露出時間 1 分で、Kodak Chemiluminescent イメージャー上に現像された。

結論

Tat-D11 は、より長いペプチドである Tat-Beclin 1 よりも優れた活性を有する、非常に特異的かつ強力なオートファジー誘導物質である。Tat-D11 は、オートファジーの負の調節因子である GAPR-1/GLIPR2 への結合に関して、Beclin 1 と競合する。Tat-D11 の GAPR-1 への結合は、Beclin-1 を GAPR-1 から遊離させ、Beclin-1 媒介性オートファジー誘導をもたらす。Tat-D11 は、他の生物学的プロセスの限定されたオフターゲット制御と伴に、in vitroやin vivo実験でオートファジーを誘導するための特異的な手法として役立ちます。

ここで示されるデータは、Tat-D11 が Tat-L11 よりも優れたオートファジー誘導物質としてふるまうことを示唆する。Tat-D11 のより高い作用強度は、Tat-L11と比べて長い持続性及び半減期によるかもしれない。一般的に、L －アミノ酸は自然界に存在し、D －アミノ酸は存在しないと報告されています。このため Tat-L11 は、特に in vivo で、より迅速な分解を受けることができます。タンパク質分解酵素は一般的に、非天然型の D 立体配置よりも天然型の L 立体配置を好むためである。HeLa 細胞におけるデータが Tat-D11 の優位性を示唆しているにもかかわらず、選別されたデータは、in vitro での選別された細胞株において、Tat-L11 がより強力なオートファジー誘導物質としてふるまいうることを示唆しています。

結論として、Tat-D11 とTat-L11は、Tat-Beclin 1ペプチドや他のオートファジー誘導法よりも大きな利益をもたらす、特異的な誘導物質であると、我々は考えています。そのより高い作用強度ゆえ、Tat-D11 は、元の Tat-Beclin 1 ペプチドよりも低い用量でオートファジーを活性化させ、またペプチドインキュベーション時間の短縮により合計プロトコール時間を著しく短縮させる。

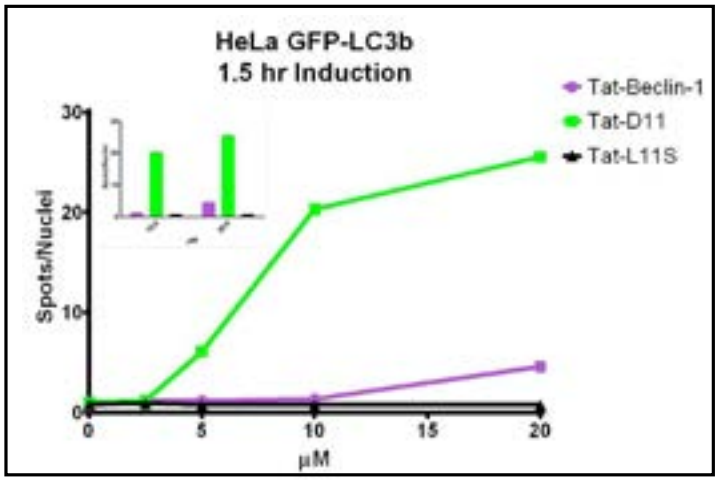


図 2 Tat-D11による、HeLa細胞における GFP-LC3Bの用量反応の誘導。挿入図は、Tat-Beclin 1 ペプチドに比べ、Tat-D11 がより強力なオートファジー誘導物質であることを示す。

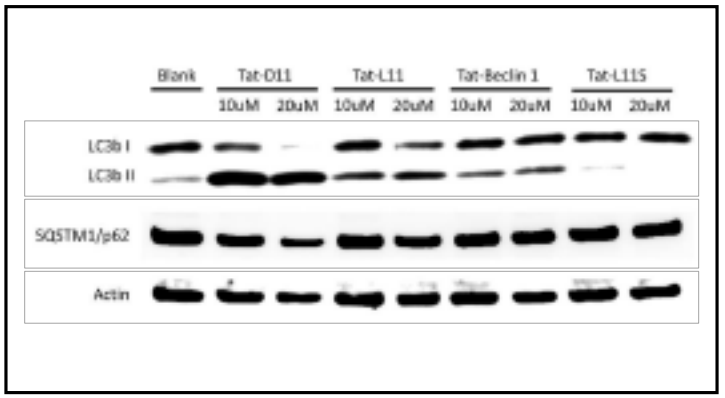


図 3 Tat-D11による、HeLa細胞におけるLC3Bの誘導とp62の減少。

参考文献

1. Mizushima, N. and D.J. Klionsky, Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. Annu Rev Nutr, 2007. 27: p. 19-40.
2. Stolz, A., A. Ernst, and I. Dikic, Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. Nat Cell Biol, 2014. 16(6): p. 495-501.
3. Kuma, A., et al., The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature, 2004. 432(7020): p. 1032-6.
4. Komatsu, M., et al., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature, 2006. 441(7095): p.880-4.
5. Hara, T., et al., Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature, 2006. 441(7095): p. 885-9.
6. Nakai, A., et al., The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nat Med, 2007. 13(5): p.619-24.
7. Masiero, E., et al., Autophagy is required to maintain muscle mass. Cell Metab, 2009. 10(6): p. 507-15.
8. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol, 2010. 221(1): p. 3-12.
9. Shoji-Kawata, S., et al., Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. Nature, 2013. 494(7436): p. 201-6.