

SUMMARY :

REVIEW

Mitochondrial DNA in innate immunity and autophagy

PRODUCTS

Autophagy Reporter Cells

- HeLa-DiFluo™ cells
- RAW-DiFluo™ cells
- THP1-DiFluo™ cells

Autophagy Inducers & Inhibitors

Antimicrobial Agent for Primary Cells

- Primocin™

Mitochondrial DNA in innate immunity and autophagy

ミトコンドリアは、エネルギーを作り出す哺乳類固有の細胞小器官であり、好気性細菌から進化したものと考えられています。ミトコンドリアは細胞代謝やアポトーシスにとって重要であり、さらには、自然免疫において中心的な役割を果たすことや、炎症性疾患に関与していることを示した論文が数多く出てきています。感染やストレスを受けると、損傷を受けたミトコンドリアがミトコンドリア DNA (mtDNA) などの成分を放出します。これが、強力な危険関連分子パターン (DAMP) として機能し、様々なパターン認識受容体 (PRR) によって媒介される炎症反応を誘発します。mtDNA 認識に関与する主な PRR は、① Toll-like receptor 9 (TLR9)、② Nod-like 受容体ファミリー、pyrin domain containing 3 (NLRP3)、③ サイクリック GMP-AMP (cGAMP) シンターゼ (cGAS) です。

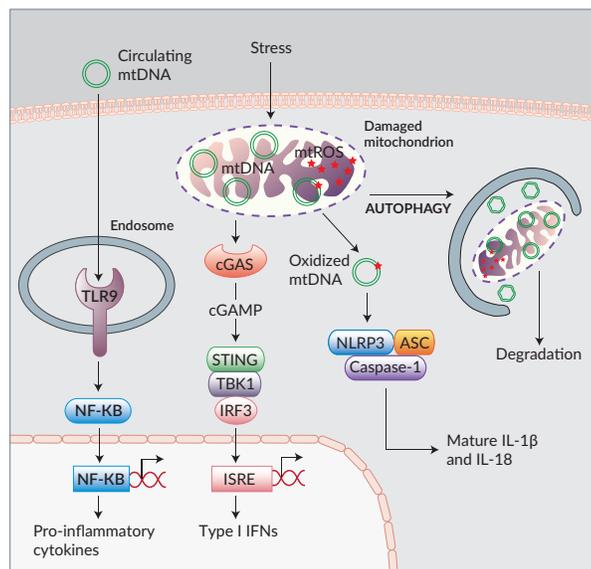
ミトコンドリアの DNA は、メチル化されていない CpG ジヌクレオチド反復を含み、バクテリア DNA に類似しており、エンドソームの受容体である TLR9 によって認識されます。損傷後に循環血中に放出された mtDNA が直接 TLR9 を活性化し、NF- κ B の活性化と、TNF- α や IL-6 のような炎症誘発性サイトカインの産生を引き起こすことが、いくつかの研究で明らかになっています¹⁻³。TLR9 を阻害する ODN^{1,2} や Tlr9 遺伝子の欠失⁴ によって TLR9 を遮断することで、炎症応答を減弱することが示されているため、mtDNA の認識における TLR9 の関与が確認されています。

mtDNA によって活性化されるもう一つの炎症経路は、NLRP3 インフラマソームの形成によって引き起こされるもので、caspase-1 経路で炎症性サイトカイン IL-1 β および IL-18 の分泌が起こります。最近の研究によれば、サイトソル中に放出された mtDNA が NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導することが示唆されています。mtDNA が無くなると、インフラマソーム誘発剤によって刺激された細胞内での IL-1 β と IL-18 の分泌が抑制されます。さらに、酸化した mtDNA は、NLRP3 と直接結合して活性化することが知られています⁶。

ミトコンドリア DNA は、cGAS-STING 経路による炎症反応にも関与しており、I 型インターフェロン (IFN) の産生を促します。最近の研究では、アポトーシスを起こしている細胞のサイトソル中に放出された mtDNA が cGAS を活性化し、cGAMP を介して、STING タンパク質 (stimulator of interferon genes) をリクルートすることが示されました^{7,8}。STING は、TBK1-IRF3 シグナル伝達経路を介して、I 型 IFN 転写を誘導します。さらに近年、ヘルペスウイルス感染によって引き起こされる mtDNA ストレスにตอบสนองして、この経路が活性化されることが確認されました⁹。

mtDNA によって引き起こされる炎症反応は、オートファジーと密接に関連しています。オートファジーは、ストレス誘発性の損傷から細胞を守るためのシステム機構です。オートファジーは、①二重膜の空胞による細胞質成分の取込み、②オートファゴソーム形成、③リソソームとの融合、④細胞質成分の分解、によって、不必要な細胞質成分 (例: DNA、タンパク質、ミトコンドリア、細胞内病原体) を取り除きます。また、オートファジーは、NF- κ B¹⁰ や STING¹¹ などの主要な免疫メディエーターの活性を調節することによって、過剰な炎症反応を抑制することができます。しかしながら、微生物感染や主要な外傷といった病理学的状態においては、機能不全になったミトコンドリアや、損傷を受けた mtDNA は、オートファジーの分解能を超えるレベルまでサイトソル中に蓄積するため、その負の調節機能を失います。そして、TLR9^{2,12}、NLRP3^{5,10}、および / または cGAS-STING シグナル伝達¹³ の調節が異常になることで、多くの場合は、慢性的炎症を伴い、炎症反応が増大します。がんのほか、感染性および自己免疫性疾患を含むミトコンドリア関連疾患における mtDNA の役割についてより良く理解するため、更なる研究が求められます。

1. Zhang Q. et al., 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 464(7285):104-7.
2. Oka T. et al., 2012. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*. 485(7397):251-5.
3. Garcia-Martinez I. et al., 2016. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest*. 126(3):859-64.
4. Wei X. et al., 2015. Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na(+)/K(+)-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Res*. 25(2):237-53.
5. Nakahira K. et al., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 12(3):222-30.
6. Shimada K. et al., 2012. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 36(3):401-14.
7. White MJ. et al., 2014. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*. 159(7):1549-62.
8. Rongvaux A. et al., 2014. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*. 159(7):1563-77.
9. West AP. et al., 2015. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature*. 520(7548):533-7.
10. Zhong Z. et al., 2016. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell*. 164(5):896-910.
11. Saitoh T. et al., 2009. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *PNAS*;106(49):20842-6.
12. De Leo MG. et al., 2016. Autophagosome-lysosome fusion triggers a lysosomal response mediated by TLR9 and controlled by OCRL. *Nat Cell Biol*. 18(8):839-50.
13. Lan YY. et al., 2014. Dnase2a deficiency uncovers lysosomal clearance of damaged nuclear DNA via autophagy. *Cell Rep*. 9(1):180-92.



Autophagy Reporter Cells

オートファジーは、細胞質成分がリソソーム中で分解されるという重要な恒常性プロセスです。オートファジーは、① 膜内のカーゴ隔離、② オートファゴソームの形成、③ リソソームとの融合、④ カーゴ内容物の分解およびリサイクル、という多段階のプロセスで構成されています。LC3 (微小管関連タンパク質 1 軽鎖 3) は、「オートファジーフラックス」を研究するために使用される重要なタンパク質の一つです。このタンパク質は、サイトソルから単離膜へリクルートされます。この LC3 タンパク質の局在化は、オートファジーでの膜のマーカーとなり、また、その発生過程を観察する際のマーカーになります。緑色蛍光タンパク質 (GFP) および赤色蛍光タンパク質 (RFP) に融合した LC3B から成るキメラ型タンパク質を使うことで、オートファジーの過程を簡単に観察できます。RFP-GFP-LC3 で標識されたオートファゴソームは、RFP および GFP の両方のシグナルを示します。リソソームとの融合後、その酸性条件により、GFP シグナルは著しく減衰しますが、RFP シグナルは比較的安定性を保ちます。

HeLa-DiFluo™ hLC3 Cells

RAW-DiFluo™ mLC3 Cells

THP1-DiFluo™ hLC3 Cells

HeLa-DiFluo™ hLC3 細胞はヒト HeLa 上皮癌細胞株、RAW-DiFluo™ mLC3 細胞はマウス RAW 264.7 マクロファージ細胞株、THP1-DiFluo™ hLC3 細胞はヒト THP-1 単球細胞株にそれぞれ由来する、オートファジーレポーター細胞です。これらは、RFP-GFP-LC3 から成る RFP::GFP::LC3 融合タンパク質を発現します。このヒトまたはマウス由来の LC3 は、その N 末端に RFP (酸安定性) および GFP (酸感受性) という 2 つの蛍光レポータータンパク質が融合しています。これらの細胞に RFP-GFP という対が含まれることから、緑色 GFP-LC3 および / または赤色 RFP-LC3 の光点の発現を蛍光顕微鏡で検出することによって、リアルタイムでオートファジーフラックスを観察できます。オートファジーの初期には、RFP と GFP の両方のシグナルが検出されます。そして、オートファゴソームとリソソームとの融合が進むにつれて、GFP の発光は減少し、RFP の発光のみが可視化できるようになります。また、GFP-LC3/RFP-LC3 陽性細胞および RFP-LC3 陽性細胞の割合を決定することが可能です。これらの値に基づき、先行研究で示された方法¹²を用いて、オートファジーフラックスを測定することができます。

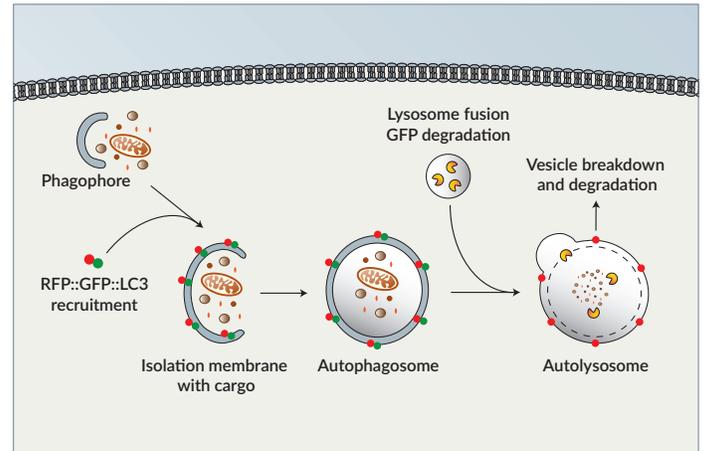
HeLa-DiFluo™ hLC3細胞、RAW-DiFluo™ mLC3細胞、およびTHP1-DiFluo™ hLC3細胞は、Zeocin™ に耐性を示します。

1. Loos B. *et al.* 2014. Defining and measuring autophagosome flux- concept and reality. *Autophagy*. 2014;10(11):2087-96. 2. Kimura S. *et al.*, 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescently tagged LC3. *Autophagy*. 3(5):452-60.

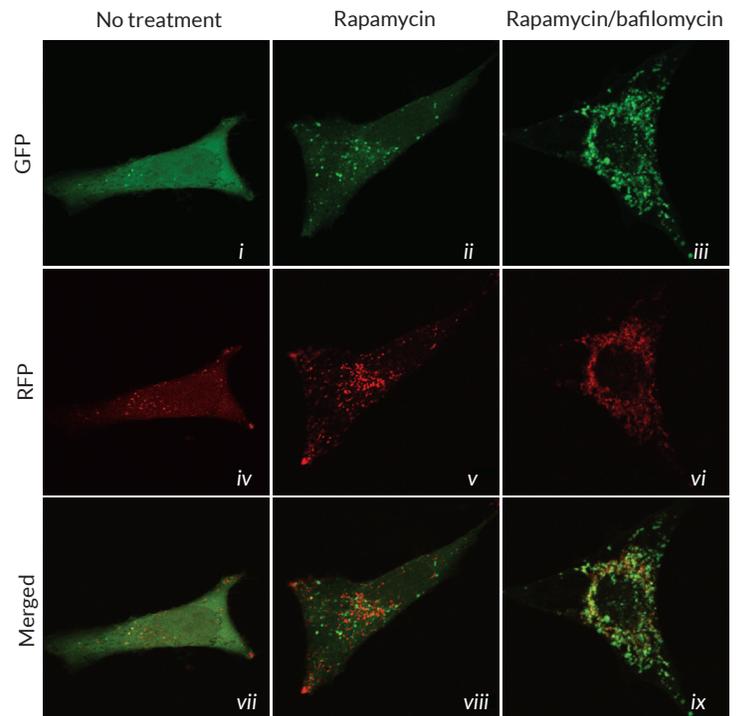
PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
HeLa-DiFluo™ hLC3 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	heldf-hlc3
RAW-DiFluo™ mLC3 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	rawdf-mlc3
THP1-DiFluo™ hLC3 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thpdf-hlc3

RELATED PRODUCTS

PRODUCTS	DESCRIPTION	CAT. CODE
Zeocin™	Selective antibiotic	ant-zn
pSELECT-GFP-hLC3	Expression plasmid	psetz-gfplc3
pSELECT-GFP-mLC3	Expression plasmid	psetz-gfpmc3



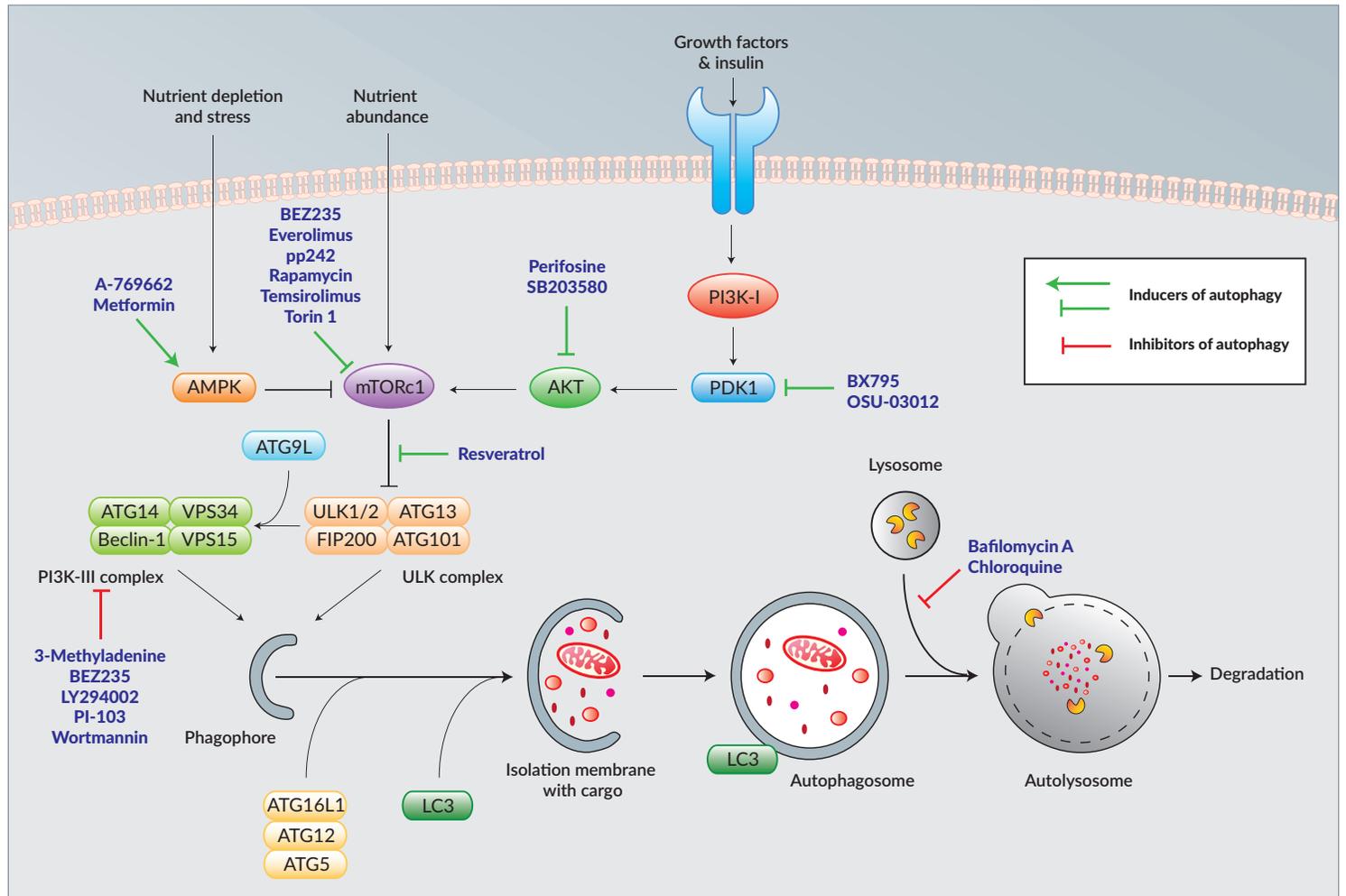
Detection of fluorescent puncta in HeLa-DiFluo hLC3 cells



HeLa-DiFluo™ cells were treated with 25 μM rapamycin alone or with 25 μM rapamycin and 500 nM bafilomycin A1 (to inhibit autophagosome/lysosome fusion). After 24 hour incubation, the cells were fixed with 2% PFA and analyzed by confocal microscopy. Note that both yellow (autophagosome) and red (autolysosome) puncta increase in panel viii, whereas most puncta in panel ix are yellow (autophagosome).

Autophagy Inducers & Inhibitors

オートファジーは、栄養素やエネルギーの窮乏などの細胞性ストレスによって活性化される主要な異化プログラムです。オートファジーは、まず VPS34 複合体の III 型ホスファチジルイノシトール (PI) 3- キナーゼを含む一連のタンパク質により制御される段階である、オートファゴソームの生成から始まります。それに続いて、リソソームとの融合後にオートファゴソームの酸性化が起こります。したがって、オートファジーは、オートファジーによる隔離を抑制する III 型 PI3- キナーゼの阻害剤、またはオートリソソームの形成およびオートファジーによる分解を防ぐリソソーム酸性化の阻害剤を用いることによって、阻害することが可能となります。オートファジーは高度に調節されたプロセスであり、栄養素と成長因子に感受性のキナーゼである mTORC1 は、オートファジーの主要なリプレッサーです。そのため、mTORC1 の直接阻害剤、および mTORC1 活性化経路の阻害剤は、オートファジーを誘発します。



PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
3-Methyladenine	50 mg	tlrl-3ma
A-769662	10 mg	inh-a769
Bafilomycin A1	10 mg	tlrl-baf1
BEZ235	50 mg	inh-bez2
BX795	5 mg	tlrl-bx7
Chloroquine	250 mg	tlrl-chq
Everolimus (RAD001)	5 mg	tlrl-eve
LY294002	5 mg	tlrl-ly29
Metformin	1 mg	tlrl-metf
OSU-03012 (AR-12)	10 mg	inh-os03

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Perifosine	5 mg	tlrl-peri
PI-103	5 mg	inh-pi10
pp242	5 mg	inh-pp242
Rapamycin (Sirolimus)	5 mg	tlrl-rap
Resveratrol	100 mg	tlrl-resv
SB203580	5 mg	tlrl-sb20
Temsirolimus	10 mg	inh-tems
Torin 1	10 mg	inh-tor1
Wortmannin	5 mg	tlrl-wtm

Antimicrobial Agent for Primary Cells

Primocin™

初代細胞の培養は、それが細胞源そのもの(皮膚や腸管サンプルなど)か、周囲の環境(実験室、設備、スタッフなど)によるものかどうかに関わらず、破壊的な微生物汚染の脅威に絶えず晒されています。InvivoGen 社では、初代細胞を保護するため、InvivoGen 社が権利を所有する、広範に使用可能な抗生物質である Primocin™ を開発しました。

Description

Primocin™ は、DNA 合成とタンパク質合成の両方を遮断することで、マイコプラズマ、バクテリア、真菌を除去します。これは、3つの細菌標的(DNA ジャイレース、および原核生物性リボソームサブユニットの30Sと50S)と1つの真菌標的(真菌や酵母の細胞膜にしか存在しないエルゴステロール分子)という、微生物のみに存在する標的に対して作用します。Primocin™ は、この微生物特異的に作用する抗生物質により、*Pseudomonas aeruginosa*、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus* 種等の実験室環境に偏在する特定のバクテリアに対して、Normocin™ よりも優れた保護力を示します。なによりも、Primocin™ は、アムホテリシン B に比べ毒性が少なく安定性が高い抗真菌剤という特性により、初代細胞に対して毒性を示しません。

Applications and Efficacy

Primocin™ は初代細胞の単離と培養に関する文献に頻繁に引用されています。例えば、末梢血単核細胞(PBMC)から単離された初代ヒトナチュラルキラー(NK)細胞のサブクローニング¹、あるいは、マウス胚性脳組織からのアストロサイトおよびニューロンの単離²に使われています。さらに、最近の研究では、脆弱 X 症候群の状態を再現するようなヒト胚性幹細胞の神経細胞分化の実験において、Primocin™ の有効性が実証されています³。

実際、Wang らは、ヒト多能性幹細胞(hPSC)の長期培養の開発において、細菌性およびマイコプラズマ性汚染から細胞をさらに保護するために、Primocin™ と InvivoGen 社の抗マイコプラズマ剤 Plasmocin™ の両方を含む培地を使って細胞を処理しており、この一連の作業は、細胞分離および培養中の「必要不可欠なステップである」ということが論文に記載されています⁴。

いくつかの研究グループが、応用生物学の新興分野である3次元細胞培養・オルガノイドに Primocin™ を適用しました。例えば、Graham らは、マウス結腸オルガノイドにおける小胞体(ER)ストレス、炎症、およびアポトーシスに関する研究において、Primocin™ をすべてのオルガノイド培地に添加しました⁵。

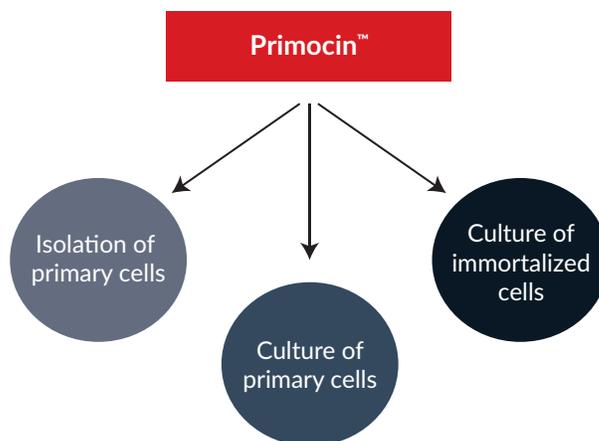
同様に、Weeber らのチームは、Primocin™ を使用して、結腸直腸癌(CRC)患者から採取した転移生検試料に由来する腫瘍オルガノイドの適切な増殖を確実にしました⁶。また、Nichols らは、成人肺性の初代細胞および小児肺性の足場(scaffold)から構築された肺オルガノイドの調製において、①供給源の肺組織の処理と、②採取した肺細胞と気管/気管支細胞の培養、の2つのステップで Primocin™ を使用しています⁷。

Primocin™ は多くの標準的な抗生物質と併用可能ですが、Primocin™ の最大の利点の一つに、他の抗生物質が不要であることがあげられます。実際、Primocin™ は、他の製品で殺傷できない微生物で汚染されている初代細胞培養物の処理に理想的な選択肢です。例えば、Cao & Poss は、ゼブラフィッシュの心臓外植体の培養に関するごく最近の論説で、Primocin™ によって、培養を始めて数日間で初代心外膜細胞の汚染が減少したのに対し、Pen/Strep および Fungizone™ (アンフォテリシン B) の併用ではそのような結果が確認されなかったと報告しています⁸。

最後に、Primocin™ は不活化細胞株も保護することができます。例えば、Pastrana らは、BK 型ポリオマウイルス感染性のスクリーニングを実行する前に、293TT、ART、SFT、および A549 細胞株を抗菌剤で処理しています⁹。

世界中の研究者が初代細胞を侵襲性のマイコプラズマ、バクテリア、そして真菌から守るため、Primocin™ を使用しています。InvivoGen 社が提供する、幅広いラインアップの抗菌剤については、「関連製品」の項目をご参照ください。

Applications of Primocin™



1. Garcia-Beltran et al., 2016. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1, Nat. Immunol., 17:1067-1074.
2. Grabner GF. et al., 2016. Deletion of Monoglyceride Lipase in Astrocytes Attenuates Lipopolysaccharide-induced Neuroinflammation. J Biol Chem., 291(2):913-23.
3. Telias M. et al., 2015. Functional Deficiencies in Fragile X Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. J. Neurosci., 35(46):15295-306.
4. Wang et al., 2016. Isolation and cultivation of naive-like human pluripotent stem cells based on HERVH expression, Nat. Prot., 11(2):327-346.
5. Graham et al., 2016. MEM258 Is a Component of the Oligosaccharyltransferase Complex Controlling ER Stress and Intestinal Inflammation, Cell Rep., 11(13):2955-2965.
6. Weeber et al., 2015. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases, PNAS, 112(43):13308-11.
7. Nichols et al., 2016. Giving new life to old lungs: methods to produce and assess whole human paediatric bioengineered lungs, J. Tiss. Eng. Reg., [Ahead of print].
8. Cao & Poss, 2016. Explant culture of adult zebrafish hearts for epicardial regeneration studies, Nat. Prot., 11:872-881.
9. Pastrana et al., 2013. BK Polyomavirus Genotypes Represent Distinct Serotypes with Distinct Entry Tropism, J Virol. 87(18):10105-10113.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Primocin™	500 mg (10x1 ml)	ant-pm-1

RELATED PRODUCTS

PRODUCTS	DESCRIPTION	CAT. CODE
Normocin™	Bacteria prevention	ant-nr
Normocure™	Bacteria elimination	ant-noc
Plasmocin™ prophylactic	Mycoplasma prevention	ant-mpp
Plasmocin™ treatment	Mycoplasma elimination	ant-mpt

