

毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

はじめに：次世代シーケンス(NGS)で得られた網羅的な発現解析データから、特定の遺伝子に絞った機能解析を行う場合、その遺伝子を特異的に制御するシステムを用いることで、機能解析や関連遺伝子との相互作用などを調べる事が可能となります。

今回の「クロンテック通信」は、コンディショナルな標的遺伝子のノックアウトで使われるCre-loxPシステムとCREリコンビナーゼ酵素の直接導入法『CRE Recombinase Gesicles』について関連文献情報を交えてご紹介します。

網羅的な発現解析

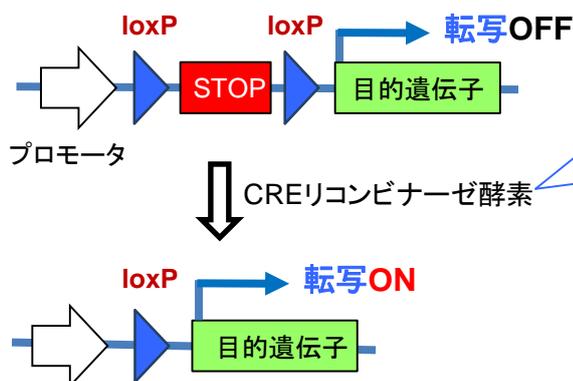
近年の技術の進歩は著しく、特に、次世代シーケンスや質量分析装置(LC-MS)等によるオミックス分野への貢献は絶大であり、細胞内分子の網羅的なデータの蓄積が生命現象の包括的な理解につながると期待されています。このようなオミックスによる包括的な生命現象の理解には、個々の遺伝子の詳細な解析が必要です(『クロンテック通信』機能解析①より)。

タカラバイオの発現制御システム



Cre-loxP部位特異的組換え

CREリコンビナーゼ酵素は、ゲノム上やプラスミド上でタンデムに並んだ2カ所のloxPサイト(34塩基)に挟まれた配列を除去し欠失変異を起こしたり、loxPサイトを1カ所含むプラスミドを用いてゲノムDNA上のloxPサイトに部位特異的にプラスミド配列を挿入することが可能です。下図は、2カ所のloxPサイト間での組換えの例です。



CRE Recombinase Gesicles (エキソソーム様小胞)

哺乳類細胞にCREリコンビナーゼ酵素を直接導入可能なシステム



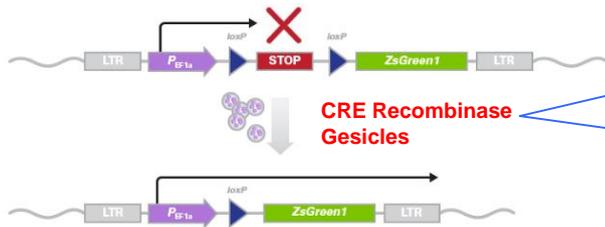
『CRE Recombinase Gesicles』は、増殖・非増殖細胞や初代細胞などにCreリコンビナーゼ酵素を直接導入し、導入直後から高い酵素活性を一過性に誘導するシステムです(裏面)。

CRE Recombinase Gesicles

(製品コード 631449)

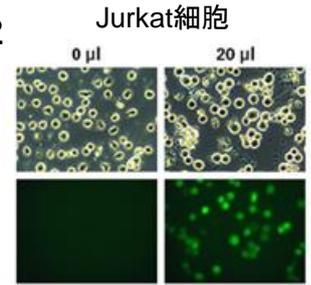
◆ ZsGreen1 レポーターアッセイの実験例

図1



Gesicles添加32°Cで30分間1,000×gで遠心後、37°Cで3時間培養。培地交換し48時間培養

図2



2つのloxPで挟まれたストップコドンカセットにより、EF1αプロモーターとZsGreen1蛍光遺伝子が分断され、ZsGreen1発現は抑えられています(図1の上段)。Creリコンビナーゼ酵素によって、ストップコドンカセットが除去されると、ZsGreen1の発現がONになります(図1の下段)。その顕微鏡観察結果(図2)。下表は、CRE Recombinase Gesiclesによる様々な細胞株由来のLoxP-ZsGreen1発現をフローサイトメトリーで解析した結果です。

Cell line	RPE	HepG2	CHOK1	NIH3T3	BJ	MCF-7	293	HeLa	HT1080	Jurkat	KBM-7	Raji
Vol (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
% Positive	95.9	86.6	97.7	95.1	79.8	21.6	81.4	64.1	65.3	77.4	30.3	72.6

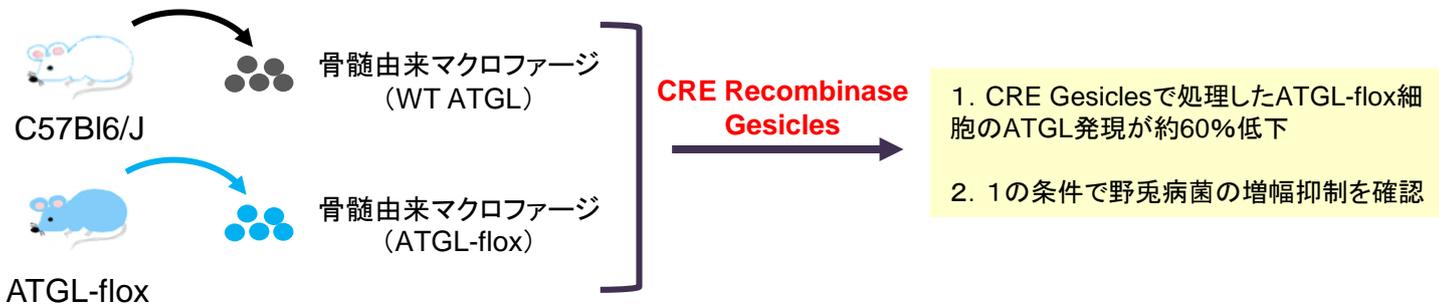
CRE Recombinase Gesicles使用文献

◆ 宿主細胞内で野兎病菌が増殖するのに必要な宿主代謝経路の研究

Defining the Metabolic Pathways and Host-Derived Carbon Substrates Required for *Francisella tularensis* Intracellular Growth. Lauren C., et al. *MBio*. (2018) e01471-01518

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は、動物から直接または間接的に人に感染する病原菌である。本論文では、脂肪分解経路に関わるAdipose Triglyceride Lipase (ATGL)の発現をCRE Recombinase Gesiclesによりノックダウンし、野兎病菌の増殖が抑えられることを示した。グリセロールが野兎病菌の宿主細胞内での増殖維持に重要な役割を担うことを示唆している。

■ 実験の概要

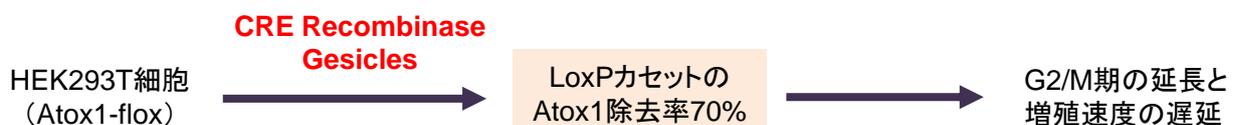


◆ 銅シャペロンAtox1と細胞周期関連タンパク質APCとの相互作用に関する研究

Copper Chaperone Atox1 Interacts with Cell Cycle Proteins. Matson Dzebo M., et al. *Comput Struct Biotechnol J*. (2018) 16:443-449.

銅シャペロンAtox1が細胞周期で必要な役割を持つAPC(Anaphase Promoting Complex:後期促進複合体)と相互作用することを、免疫沈降サンプルの質量分析により明らかにした。また、Atox1-floxカセットを導入した細胞を構築し、CRE Recombinase GesiclesでAtox1をノックアウトしたところ、G2/M期の延長と、増殖速度の遅延が見出された。

■ 実験の概要



◆ 関連キット AAVpro® Helper Free System (AAV-CRE Recombinase) (製品コード 6668 など)

Cre遺伝子を搭載した血清型1、2、5、6のAAVベクターを、ヘルパーウイルスを使用せずに安全に作製できます。調製したAAV-Cre recombinaseベクターは、トランスジェニックマウスの作成や様々なスクリーニング系で広く使用可能です。