

毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

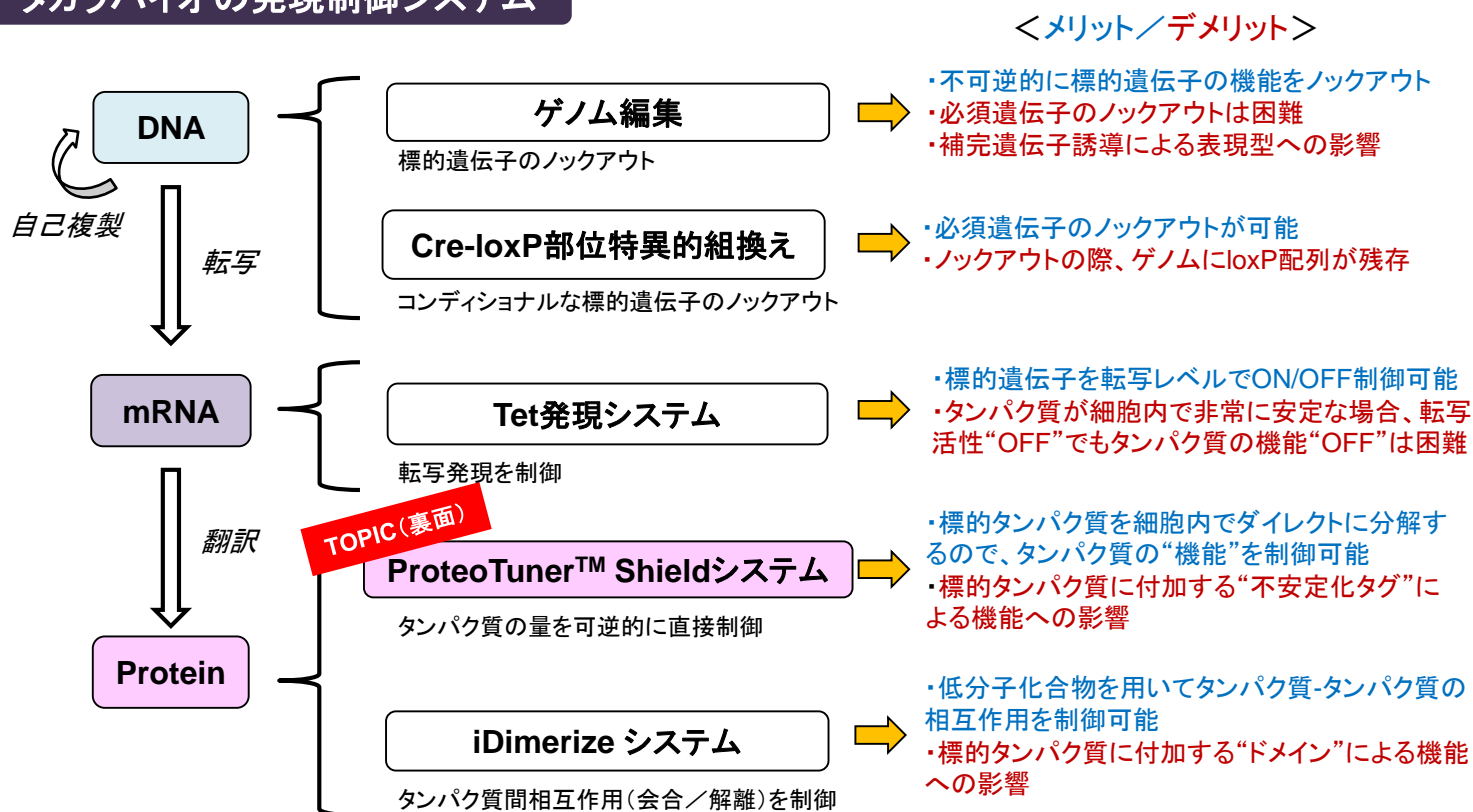
はじめに：次世代シーケンスで得られた網羅的な発現解析データから、特定の遺伝子に絞った機能解析を行う場合、その遺伝子を特異的に制御するシステムを用いることで、機能解析や関連遺伝子との相互作用などを調べることが可能となります。

今回の「クロンテック通信」は、転写発現制御で利用可能な『ProteoTuner™ Shieldシステム』および最近の関連文献をご紹介します。

網羅的な発現解析

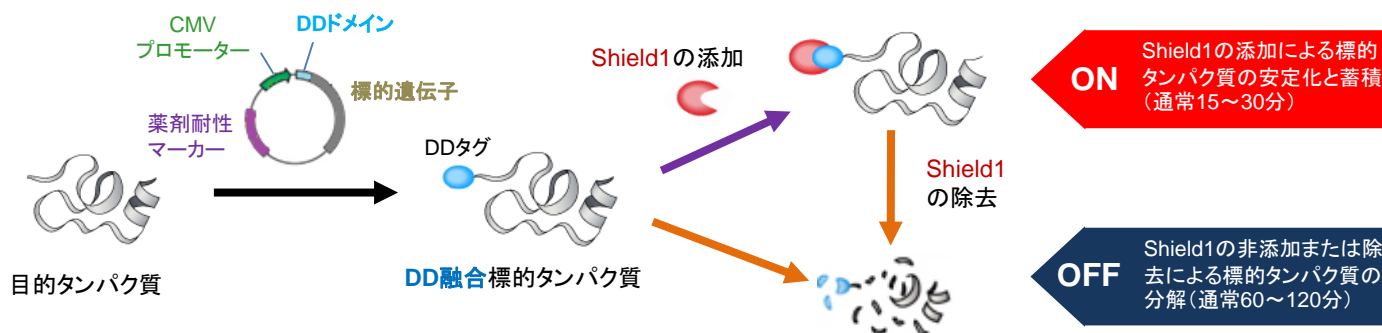
近年の技術の進歩は著しく、特に次世代シーケンスや質量分析装置(LC-MS)等によるオミックス分野への貢献は絶大であり、細胞内分子の網羅的データの蓄積が生命現象の包括的な理解につながると期待されています。このようなオミックスによる包括的な生命現象の理解には、個々の遺伝子の詳細な解析が必要です。【参照:『クロンテック通信』機能解析①】

タカラバイオの発現制御システム



ProteoTuner™ Shield システム概要

『ProteoTuner Shieldシステム』は、標的とする目的タンパク質の安定化(ON)と不安定化(OFF)をコントロールし、細胞内での目的タンパク質量を直接、迅速に制御できるシステムです。

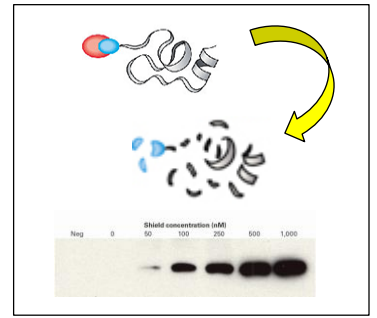


DD: 12 kDaの不安定化ドメイン、融合発現した標的タンパク質のプロテアソームによるタンパク質分解を促進する。

Shield1: 750 Daの細胞膜透過性低分子リガンド、DD融合標的タンパク質をプロテアソームによる分解から保護する。

ProteoTuner™の特長

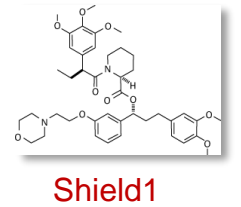
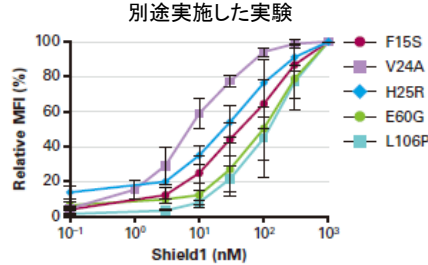
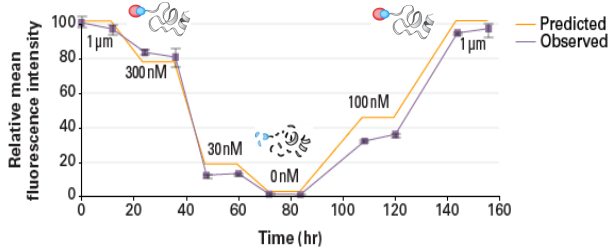
製品コード 632172/632173 他



◆ 特長

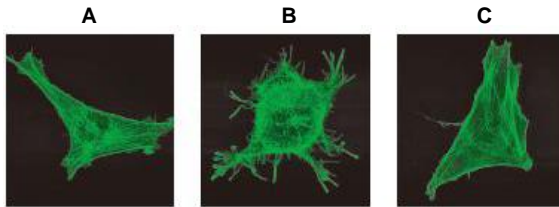
- ✓ 細胞内の標的タンパク質“量”を正確、迅速かつ可逆的に直接コントロール
- ✓ リガンドの添加／除去により、標的タンパク質をすばやく安定化／不安定化
- ✓ ひとつのベクター、ひとつのリガンドによるシンプルな制御
- ✓ 一過性にも安定株でも使用可能

◆ Shield1濃度依存的なタンパク質量の調節



DD-YFPを安定発現するNIH3T3細胞を種々の濃度のShield1存在下で、1週間にわたって培養した(左図)。Shield1添加とYFPタンパク質の蛍光強度値“Observed”(紫線)は、右図で別途実施したShield1濃度依存的な細胞内YFPタンパク質の蛍光強度値“Predicted”(オレンジ線)”と近似の発現パターンであり、ProteoTunerシステムはShield1濃度依存的かつ可逆的に目的タンパク質量を調節することができる。

◆ Shield1による細胞表現型制御



A: コントロール
B: 1 μM Shield1で24時間処理
C: 1 μM Shield1で24時間処理後、Shield1非存在下で48時間培養

低分子量Gタンパク質の発現は、細胞形態に特徴的な変化を起こすことが良く知られている。Cdc42(低分子量Gタンパク質の一つ)の活性型変異体Cdc42(Q61L)に不安定化ドメイン(DD)を融合させ、Shield1依存的な細胞表現型を調べた。

左図Aはmockコントロール条件、BはDD-Cdc42(Q61L)発現細胞のShield1添加条件、CはShield1除去条件で、Shield1で処理していない細胞と区別できないほどの線維芽細胞様の形態を示した。

※上記は、Cell. (2006) 126: 995. に掲載されたデータを許可を得て一部変更して掲載

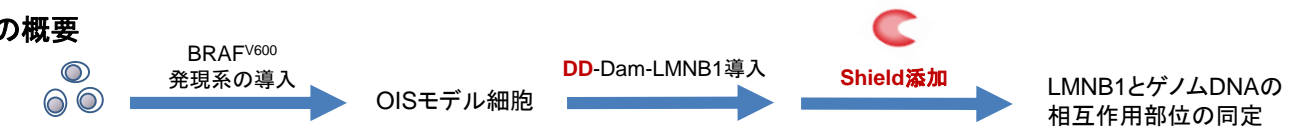
ProteoTuner™ システム使用文献

◆ 細胞老化と核ラミナに関する研究

Lenain C., et al. Massive reshaping of genome–nuclear lamina interactions during oncogene-induced senescence. *Genome Res.* (2017) 10:1634-1644.

がん遺伝子誘導性細胞老化(OIS: Oncogene-Induced Senescence)のモデル細胞を用いた、ゲノム-核ラミナ間の相互作用に関する研究に『ProteoTuner Shieldシステム』が使われています。不安定化ドメイン(DD)により細胞内のLMNB1量を迅速にON/OFFすることで、OIS細胞のLMNB1とゲノムDNAの相互作用について解析しています。

■ 実験の概要



Dam: DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ
LMNB1: ラミンとして核ラミナを構成する。細胞核内で構造の維持と転写の調節を行う。

◆ 造血細胞の分化とがん抑制因子の関わりについて研究

Humeniuk R., et al. The role of tumor suppressor p15Ink4b in the regulation of hematopoietic progenitor cell fate. *Blood Cancer J.* (2013) 3(1): e99.

腫瘍抑制因子であるp15Ink4b遺伝子をノックアウトしたマウス由来の骨髄細胞に『ProteoTuner Shieldシステム』で構築したDD-p15Ink4b発現系を導入することで、細胞内p15Ink4b量を自由に制御するシステムを構築した。これにより、p15Ink4bは(1)前駆細胞からの適切な分化系統決定や、(2)ストレス時の迅速な赤血球の補充に関わる機能を有することが分りました。

■ 実験の概要

