

光誘導型 Cre リコンビナーゼを活用した コンディショナルノックイン細胞作製

遺伝子の機能解析や病態の機序解明には、コンディショナルノックアウト (cKO) やコンディショナルノックイン (cKI) モデル細胞が広く利用されています。しかし、従来の薬剤による誘導では、時間・空間特異的な制御が十分に行えない場合があります。近年、光スイッチタンパク質 Magnet System® と Cre リコンビナーゼ を組み合わせた光誘導型 Cre リコンビナーゼ (Photoactivatable Cre: PA-Cre) が開発され、光誘導によって遺伝子の働きを時間・空間特異的に制御できるようになりました。

本アプリケーションノートでは、PA-Cre を用いた cKI 細胞の樹立例を紹介し、光による遺伝子制御の実現方法と応用可能性について解説します。

PA-Cre cKI 細胞の樹立と光誘導による cKI のスキーム

- 光誘導型 cKI を実現するため、loxP-STOP-loxP (LSL) 配列を含む RFP 融合ターゲット遺伝子 (Target-RFP) 発現カセットと、PA-Cre 発現カセットを、同一ベクターに収めたドナーベクターを設計します (図 1. ゲノム編集ノックイン配列)。
- このドナーベクターを、セツロテック独自のゲノム編集技術である VIKING 法 (※1) を用いて培養細胞のセーフハーバー領域へノックインします。
- 照射前の細胞では、STOP 配列により Target-RFP の転写が阻害されており、RFP 発現は観察されません (図 1. 上段 光誘導前)。
- Blue light 照射により PA-Cre が活性型になり、STOP 配列の除去が起こることで、Target-RFP が発現可能な状態へと切り替わります。
- 光照射した細胞のみで Target-RFP の発現が誘導され RFP の発現が観察されます (図 1. 下段 光誘導後)。
- PA-Cre により、光誘導による時間・空間特異的な遺伝子発現が可能となります。

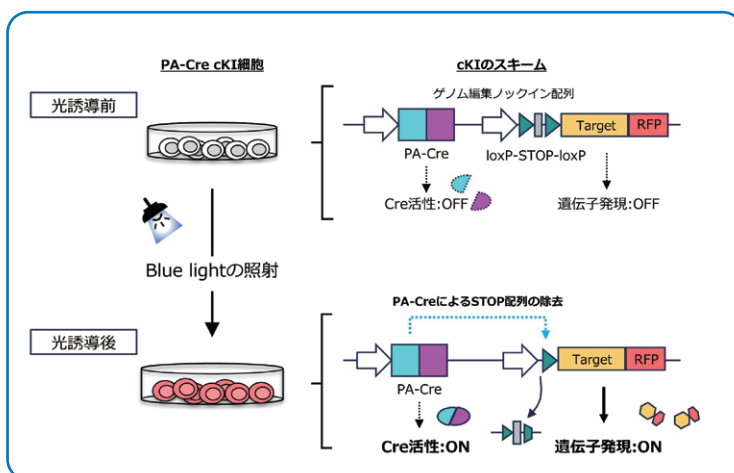


図1. 光誘導によるcKIのスキーム

実施例 PA-Cre cKI 細胞の遺伝子発現確認

- 実際に作製された細胞において光誘導による cKI のスキームが可能かを検証しました。
- PA-Cre の仕様に準じて、Blue light を照射し光誘導を実施しました (図左 実験条件、※2)。
- 照射前の細胞では、一部の細胞で弱い RFP シグナルが検出されるものの、リークしている細胞は極僅かであり、殆どの細胞で LSL による転写抑制が維持されていることが確認されました (図 2. 左 光誘導前、矢印)。
- Blue light 照射後には、PA-Cre 活性化に伴う STOP 配列の除去により、多数の細胞で明瞭な RFP シグナルが誘導されることを確認しました (図 2. 右 光誘導後)。
- これらの結果から、PA-Cre を用いた光誘導による cKI が実現可能であることが示されました。

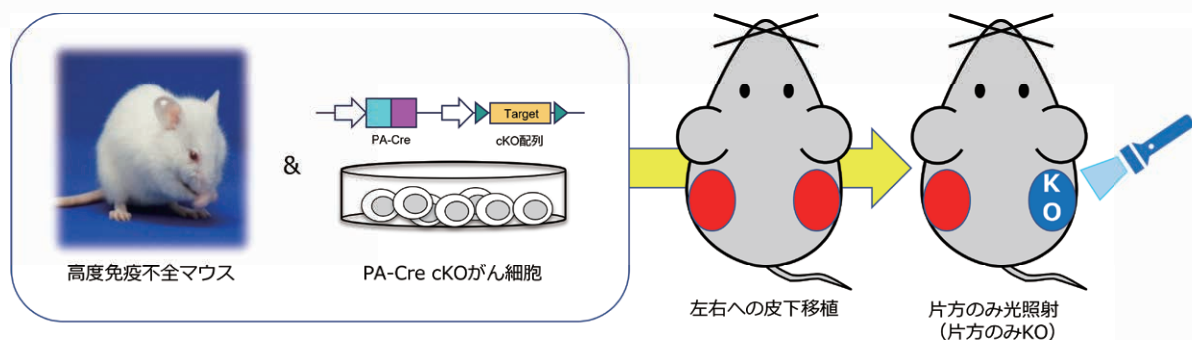
実験条件		光誘導前	光誘導後
細胞種	歯肉上皮細胞 (※3)		
光照射の条件	Blue light: 470 ± 20nm 照射時間: 1.5時間		
観察対象	観察: Blue light照射後24時間後 tagRFP		

図 2. PA-Cre cKI 細胞を用いた光誘導による cKI 発現確認

PA-Creは光誘導により遺伝子発現を開始できるため、薬剤の影響を避けたい実験系や時間・空間特異性を必要とする解析に有効であると考えられます。細胞集団内の局所的なシグナル伝播や相互作用解析に応用可能です。

PA-Cre-cKO/cKI 細胞の応用可能性

光誘導型 cKO 細胞の場合でも時間・空間特異的制御が可能であることから、担癌モデル (Xenograft) を用いた試験系への応用が期待されます。抗がん剤評価試験では、いくつかの重要な課題を解決する可能性があります。



- ・ 同一個体で PA-Cre cKO 細胞を移植し、同じサイズ (8 mm) の Xenograft が形成され、片方を光誘導する事でバックグラウンドの統一した試験が実施出来ます。
- ・ 薬剤誘導型 Cre で懸念となる薬剤毒性の影響がありません。
- ・ cKO 細胞を用いる事で細胞生着率が改善されるため、従来の KO 細胞では生着しなかった試験でも評価が可能になります。
- ・ 従来実施出来なかった遺伝子の Xenograft による抗がん剤評価試験が可能となります。

その他に下記の試験系でも活用が期待されます。

- PA-Cre cKO 細胞もしくは cKI 細胞を用いた合成致死スクリーニング
- PA-Cre cKI 細胞を用いたタンパク質相互作用解析
- PA-Cre cKI (蛍光タンパク質) 細胞を用いたバイオイメージング

関連製品情報

受託サービス

- ・ VIKING ノックイン細胞作製サービス

PA-Cre 細胞関連商品

- ・ ベクター：PA-Cre with Magnet-System®
- ・ 培養細胞研究用 LED パネル制御電源：IS-mini 専用制御電源
- ・ 培養細胞研究用 LED パネル：IS-mini:LED パネル (ISL-150X150-HBB)

PA-Cre マウス関連商品

- ・ PA-Cre マウス with Magnet System
- ・ スポット LED 照明光源：HLV3-22BL-4-NR
- ・ スポット LED 照明マイクロファイバヘッド：HFS-14-500
- ・ スポット LED 照明専用制御電源：PJ2-1505-2CA-PE

※1：セツロテックの独自特許 特許第 6956995 号

※2：Nature Chemical Biology, 12, 1059-1064 (2016),

※3：本研究で使用した細胞は大阪大学大学院歯学研究科 久保庭 雅恵 教授・竹内 洋輝 講師のご厚意によりご提供いただきました



<https://www.setsurotech.com>

編集・発行元：株式会社セツロテック
徳島県徳島市蔵本町 3 丁目 18 番地の 15 藤井節郎記念医科学センター
お問い合わせ Email: sales@setsurotech.com まで

