

TrueSTABLE Cell ～ HAC を用いた安定発現細胞作製～

概要

- かずさ DNA 研究所の HAC および新規 loxP テクノロジーを利用した新しい安定発現細胞 TrueSTABLE Cell 作成サービスを開始
- ゲノムを傷つけない人工染色体 (HAC) 技術でコピー数、発現量もコントロール可、新規組換え技術によるシステムチックな構築作業
- プロメガのルシフェラーゼ & タグ技術を導入でき、セルベース解析も受託可能

これまで一般的に作成されていた安定性発現細胞は、用時トランスフェクションの問題点を解決するものの、宿主ゲノム DNA に傷をつけ、また取り込まれる宿主 DNA の部位、個数が多種多様で、さまざまなクローンが作られ、同じものを作ることは困難です。かずさゲノムテクノロジーでは、HAC にかずさ DNA 研究所の新規部位特異的組換え酵素システム (VloxP-SloxP テクノロジー) およびプロメガの HiBIT 技術を応用して、これらの問題を解決しました。

真の安定発現細胞を求めて

これまでの安定発現細胞

遺伝子組換え安定発現細胞はタンパク質の大量生産、長期的なタンパク質の機能解析、薬理学的研究、遺伝子治療の道具として、生命科学において非常に高い需要があります。従来の安定発現細胞株の作製には①目的遺伝子のトランスフェクション、②薬剤選別、③クローニング、④増殖、⑤発現解析といったステップを要し、多大な時間と労力を要します。従来法のうち代表的な手法である Random integration 法は、宿主のゲノム DNA を傷つけることによるアーティファクトが懸念される上、導入コピー数の厳密な制御は不可能です。さらに長期培養により発現量が減少するなど、発現量のコントロールは困難を極めます。そのため同一クローンを用いた解析でも培養を重ねることで再現性が低下する場合や、クローン間の表現型の比較 (例えば目的遺伝子の野生型と変異型) が単に発現量の差を反映した結果であることなどが懸念されます。

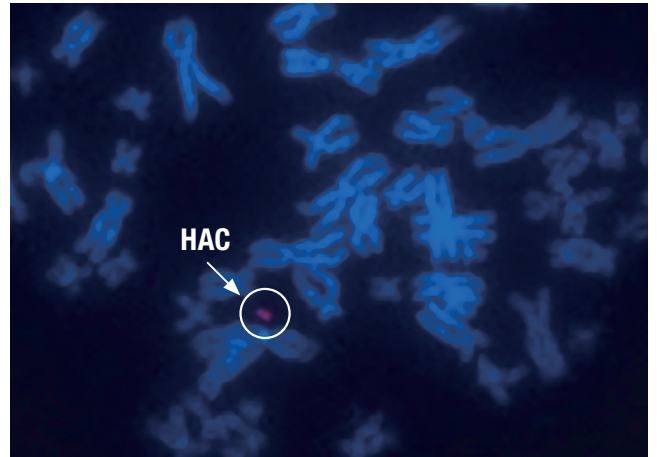
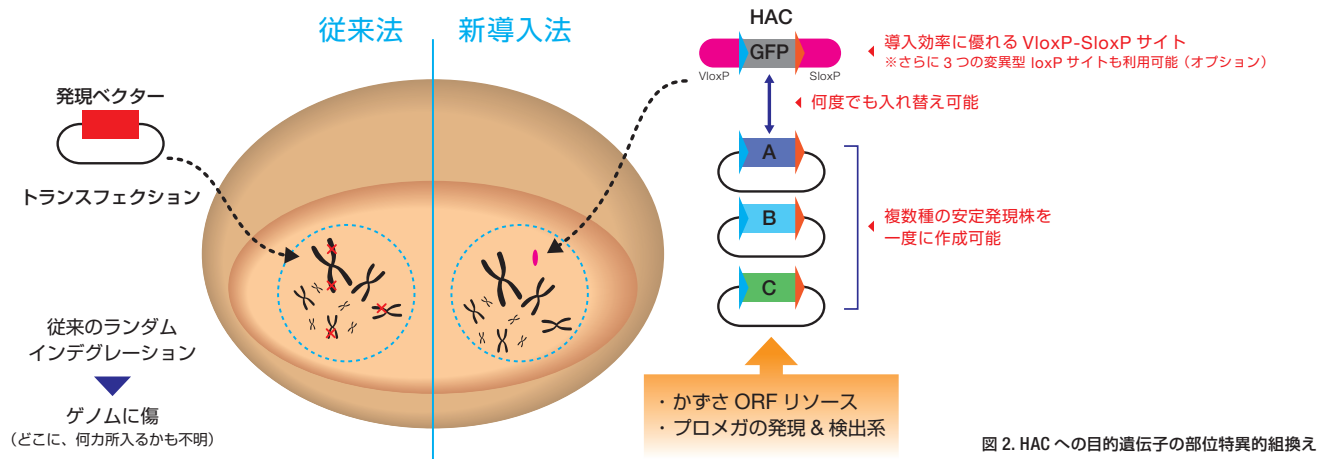


図 1. HEK293 細胞に導入した HAC

HAC とは

HAC とは人工的に作られた 47 本目のヒト染色体です (図 1)。HAC は、細胞分裂時に宿主細胞の染色体と同様に複製、分配され、長期に渡り細胞内で安定に保持されます。宿主細胞の染色体とは独立に存在するため、宿主細胞のゲノム DNA を傷つけることはありません (図 2、表 1)。



特長	従来法 (プラスミドベクターを使用する場合)	新導入法 (TrueSTABLE Cell)
導入先	ゲノム (ランダムに挿入される)	HAC (HAC 上の定位位置に挿入 [挿入カセット])
導入	導入コピー数 (細胞あたり 1 種類の遺伝子について) コピー数の制御は困難 (各クローンによりバラバラ) ※過剰発現で細胞毒性を持つタンパク質の場合、発現株が得られない可能性もある。	1 コピー
導入可能サイズ	10 Kb 程度	数 100 kb 程度 (移動元に依存: プラスミド・BAC クローン)
作業効率	形質転換効率が低い (薬剤選択、大量のスクリーニングが必要)	新規 loxP によりシステムチック (複数種の安定発現株作成も容易)
発現量	コピー数・挿入部位に依存	一定 (プロモーターに依存)
発現の安定性	低い (低下する場合あり) ※クロマチン構造変化による発現抑制を受ける場合がある	安定 (プロモーターの性質を維持) ※ HAC が宿主染色体と同程度に細胞中で安定である。
樹立に要する時間	3 ~ 4 ヶ月程度	1.5 ヶ月程度

表 1. TrueSTABLE Cell と従来の安定発現細胞株との比較

新規安定発現細胞 TrueSTABLE Cell 作成システムの利点

弊社がご提供する HAC を用いた TrueSTABLE Cell では、従来の安定発現細胞と比較して以下の利点があります。かずさ DNA 研究所が開発した部位特異的相同組換え手法を用いることで、①宿主のゲノム DNA を傷つけない、②1細胞当たり1コピーの遺伝子を決まった位置に挿入することが可能、③HAC 上の決まった位置に遺伝子が挿入されるため、同じプロモーターを用いた場合発現量をほぼ一定に調節することが可能、④サイレンシング等の影響を受けにくく、長期に安定した発現が可能、⑤単一 HAC 内の複数の異なる部位特異的組換え領域を用いることで、複数の遺伝子を発現する細胞株の樹立も可能。以上の特徴により、長期に渡る表現型解析やクローン間の比較を常に一定の発現量の下で行うことができます。また、HAC では挿入可能な DNA の長さにはほぼ制限がないため、転写調節領域等の非翻訳領域を含めた配列やポリシストロニックな配列を導入し、その影響を解析することもできます。加えて、薬剤選別も不要であり、薬剤耐性株単離に要する時間や選別によるバイアスを回避できます。

迅速な構築

従来の安定発現細胞株作製では細胞を十分量増やしたのち qRT-PCR や western blotting 等による発現解析が行われています。弊社では発現解析にプロメガ株式会社が開発した高感度の検出系を用いることで、発現解析のための細胞増殖に要する時間を大幅に短縮することが可能になりました。さらに、弊社のシステムでは複数の遺伝子を同時に細胞にトランスフェクションした場合、1細胞当たり1種の遺伝子のみ挿入されるため、目的遺伝子が多種にわたる場合でも同時に作製が可能であり迅速に構築できます。

安定発現株細胞作製

受託サービス名	細胞	納期	参考価格 (¥)	
			アカデミア	企業
TrueSTABLE Cell 作成サービス (Target Insertion)	(A) HEK293	2 カ月～	600,000 ～	1,000,000 ～
	(B) お客様ご提供の細胞 (汎用培養細胞の場合)	3.5 カ月～	1,400,000 ～	1,800,000 ～
安定発現細胞作成サービス (Random integration : 従来の安定発現株作成法による)	(C) HEK293	3.5 カ月～	800,000 ～	1,200,000 ～
	(D) お客様ご提供の細胞 (汎用培養細胞の場合)	3.5 カ月～	お問い合わせ	お問い合わせ

オプション

受託サービス名	納期	参考価格 (¥)
セルベース解析 : プロメガの HiBit [®] 、NanoLuc [®] 、HaloTag [®] などのレポーターの定量、NanoBRET [®] および NanoBit [®] PPI 解析や pmirGLO を用いた miRNA 活性測定	お問い合わせ	お問い合わせ

受託内容例 : 上記 TrueSTABLE Cell 作製サービス (A) の場合

- 作業内容
 - ① 目的遺伝子の HEK293 (HAC を含む) への導入
 - ※目的遺伝子 (ORF) は材料としてご提供ください。Flexi[®] ORF Clone (18 ページ) より別途購入も可能です。
 - ② HEK293 (HAC を含む) での目的遺伝子発現の確認
 - ※ HiBit[®]、NanoLuc[®]、HaloTag[®] などプロメガの検出タグによる発現確認の場合は作業、試薬代は料金に含まれます。
 - [注意] 上記以外のタンパク質検出法による発現確認については別途お見積りいたします。
- 納品物 目的遺伝子を導入した HEK293 最低 3 クローン (各 10⁶ 個細胞)、発現確認データ

その他 (B) (C) (D) については別途お見積りいたします。

※ 納品された細胞に対する遺伝子改変はライセンス上不可となります。

※ お客様から提供物 (ベクター、細胞など) がある場合、それらを用いた実験受託の可否についてライセンス等を必ずご確認ください。

※ 本サービスで利用する HAC はクロモリサーチ社で開発されたものです。



株式会社かずさゲノム
テクノロジーズ (KGT)

KGT のご紹介

株式会社かずさゲノムテクノロジーズ (Kazusa Genome Technologies : KGT) は、2015 年に公益財団法人かずさ DNA 研究所 (KDRI) からスピンオフして設立された会社です。KDRI の所有する遺伝子資源に Promega Corporation の先端テクノロジーを融合した各種クローンをはじめ関連技術受託サービス提供などをコアビジネスとして、様々な連携機関との多方面への事業展開を行い、お客様の広いニーズにマッチしたサービス提供を行っています。

目的遺伝子の作製から発現解析までサポート

目的遺伝子を持つプラスミドベクターの構築に関して、かずさ DNA 研究所が持つ豊富な遺伝子資源をもとに、プロメガ株式会社が開発したフレキシクロニング技術を用いて迅速な構築が可能です。また、各種タグ、シグナル配列の融合などにも対応しております。さらに、安定発現細胞作製後の発現解析、タグに応じた解析も提供可能です。



本サービスの詳細、お問合せ、見積依頼は以下をご覧ください。

www.promega.co.jp/products/jutaku/truostablecell/