



NewsLetter

自治医科大学 地域医療オープン・ラボ

2022
DEC
特別号

ナノボディを用いて RFP 依存的に機能する Cre リコンビナーゼを開発

自治医科大学生理学講座神経脳生理学部門の犬束歩助教と尾仲達史教授を中心とした研究チームは、名古屋大学の溝口博之准教授、大阪大学の金子涼輔准教授、岡山大学の坂本浩隆准教授との共同研究により、赤色蛍光タンパク質依存的に DNA 組み換え酵素活性を発揮する Cre リコンビナーゼ (Cre-DOR: Cre recombinase dependent on RFP) の開発に成功しました。本研究成果は、科学雑誌「Communications Biology」にて公開されました。

論文名： Nanobody-based RFP-dependent Cre recombinase for selective anterograde tracing in RFP-expressing transgenic animals

著者名： Inutsuka A, Maejima S, Mizoguchi H, Kaneko R, Nomura R, Takanami K, Sakamoto H, Onaka T.

掲載誌： Communications Biology. 2022 Sep 16;5(1):979.

解説記事： Cre recombinase dependent on protein X: GFP, RFP, and then?

<https://bioengineeringcommunity.nature.com/posts/cre-recombinase-dependent-on-protein-x-gfp-rfp-and-then>

Q1. 今回の研究の背景について教えてください

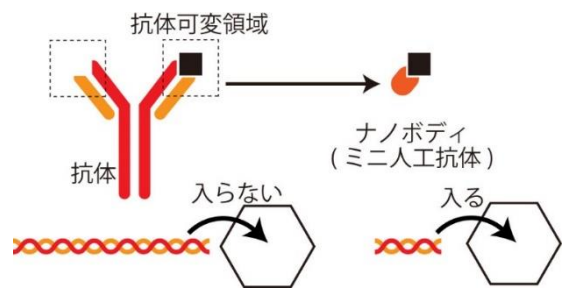
近年、神経科学分野では行動制御の神経メカニズム解明について大きな進捗がみられますが、その多くは特定の神経細胞に限定した遺伝子発現制御を利用しています。こうした細胞種特異的な遺伝子発現制御を実現するため、Cre リコンビナーゼなどの DNA の組み換え酵素が幅広く使われています。しかし、マウスでは特定の細胞のみ Cre を発現する多種多様な Cre ドライバーマウスが整備されている一方で、サルなどの大型動物では依然として Cre ドライバー動物を作成することは困難です。また、臨床展開の面からも、遺伝子改変動物に依存しないウイルスベクターを用いた遺伝子発現制御は重要な課題です。細胞種特異的プロモーターは非常に有用ですが、ウイルスベクターに搭載できるゲノムサイズでは十分な特異性を発揮できない場合があります。特定のタンパク質を発現する細胞に限定して Cre リコンビナーゼ発現させるウイルスベクター技術の開発が望まれていました。

Q2. Cre リコンビナーゼとは何ですか？

Cre リコンビナーゼとは、loxP と呼ばれる特定の塩基配列を認識して組換えを起こす DNA 組み換え酵素です。Cre リコンビナーゼには、Split-Cre と呼ばれる分割が知られており、N 末断片(N-Cre)と C 末断片(C-Cre)に分割すると組換え酵素活性が失われる一方で、N 末断片と C 末断片の再会合によって組み換え酵素活性が発揮されます。Cre 依存的に遺伝子発現がオン・オフする FLEX スイッチと呼ばれるツールも広く使われています。

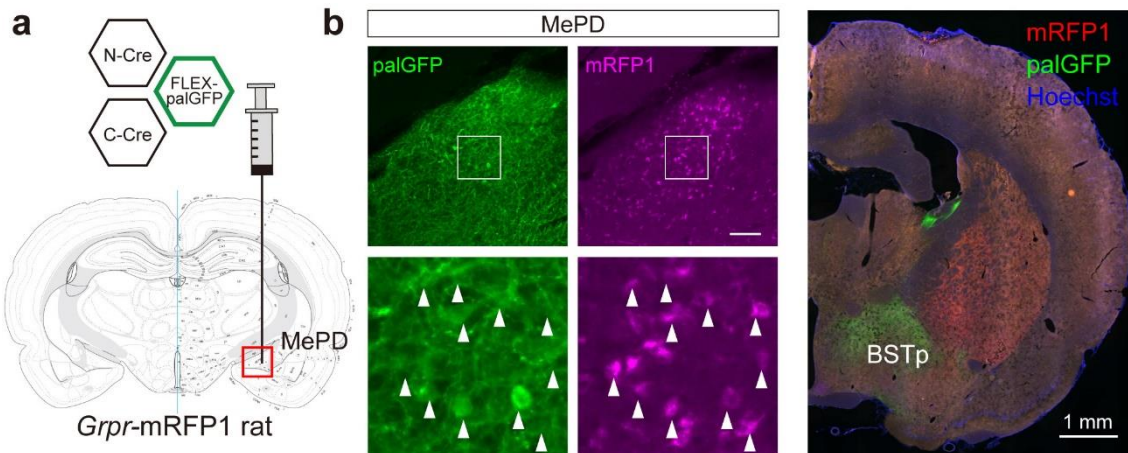
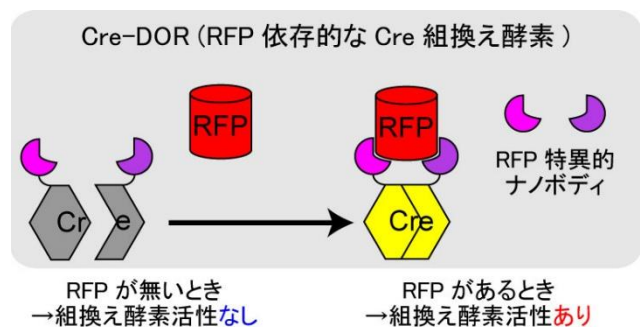
Q3. ナノボディとは何ですか？

標的タンパク質に特異的に結合する抗体のようなミニタンパク質です。ヒトやマウスの抗体は重鎖と軽鎖からなる複合体ですが、アルパカやサメは重鎖のみから構成される抗体を産生します。この重鎖抗体の抗原と結合するドメインをナノボディと呼びます。ナノボディはそれをコードする塩基配列が 300~400 塩基対程度と小さく、標的タンパク質に特異的に結合する結合ユニットとして有用です。この特徴は、搭載するゲノムサイズに制限が大きいアデノ随伴ウイルスベクターの場合には特に重要となります(図1)。



Q4. 今回の研究成果について教えてください

標的タンパク質として今回はサンゴ由来の赤色蛍光タンパク質(RFP)を選択し、赤色蛍光タンパク質依存的に組み換え酵素活性を発揮するCreリコンビナーゼ(Cre-DOR)を開発しました。Cre-DORはRFP特異的に結合するナノボディを利用したSplit-Creの再会合により、その組み換え酵素活性を発揮します(図2)。また、Cre-DORを搭載したウイルスベクターとCreがあると緑色蛍光トレーサーを発現するウイルスベクターをRFP発現トランスジェニックラットの脳内に局所投与することで、ラットの扁桃体内側核後背部に存在するガストリン放出ペプチド受容体発現ニューロンが分界条床核に投射していることを明らかにしました(図3)。



Q5. 今後はどのような展開・応用が期待されますか？

本研究は赤色蛍光タンパク質を標的とした遺伝子改変技術の開発でしたが、今後の発展として内在性のタンパク質を標的とすることを予定しています。公益財団法人栃木県産業振興センターの「世界一を目指す研究開発助成事業」に採択され、現在開発中です。

【発行】

自治医科大学大学院医学研究科広報委員会

自治医科大学地域医療オープン・ラボ