

設計図の書き方

1. 設計図の重要性

KO マウスを無駄なく迅速に作製するには、計画性のある設計図が必要不可欠である。不十分な計画のままコンストラクションを進め、Targeting

Vector の作り直しといったことが起こらないようにするためにも、十分な計画をもとに設計図を作成することが重要である。

2. 破壊する方法

破壊する方法は単純 Null(conventional)、レポーター遺伝子を挿入する方法 (knock-in)、Conditional などがあり、どの方法を選択するかは研究目的に応じて頂きたい。当方では単純 Null、レポーター遺伝子を挿入する方法、Conditional を主に行っているため、他の方法については省略させて頂く。

1) 単純 Null

標的 exon を Neo 遺伝子で置き換える単純な破壊方法である。基本的には開始コドンのある exon や重要な機能ドメインの exon がターゲットとなる。ここで注意が必要なのは Alternative Splicing の存在である。破壊した exon が Alternative Splicing によって読み飛ばされ、タンパク質がつかられないことがないように、できるだけ調査が必要である。調査する方法はデータベースに頼るのが簡単で、ある程度の信頼性がある。確実性を求めるのであれば、どの exon を破壊するのが効果的であるかの予備実験をすることが最も良いと思われる。

置換により削ることのできるゲノムの長さは経験上 0~6kbp であるが、同じローカスで考えるのであれば、短ければ短い程、相同組み換え効率が高い傾向があり、できるだけ短くする方がよい。

Neo を挿入する場所は exon の 5'側(Splicing Acceptor となる領域)を 100b 程度残しておいて、Splicing を受けるようにしておくのが当方の定石である。この効果があるかは不明であるが mRNA が Neo の pA で止まり、トランケートされた mRNA が生じないようにする狙いがある。

2) LacZ や GFP などのレポーター遺伝子挿入による破壊方法

この場合、我々は IRES を付加したカセットを所有していないので、挿入する場所は 1st Mt のある

exon に限定される。そのため先に説明したように Alternative Splicing の有無を事前に調査する必要がある。また挿入する場所は、1st Mt のある exon で、さらに 5'UTR が残るように 1st Mt の手前に挿入しなければならない。これにより標的遺伝子の転写活性に従いレポーター遺伝子の発現が保証される。また 1st Mt のある exon と近傍にある exon をまとめて削り、置換することも可能である。しかし、この場合は削る intron に enhancer が存在するとレポーター遺伝子の発現が異所的になる可能性もあることを留意する必要がある。

3) Conditional

標的とする exon を選択するときは Alternative Splicing には十分に注意しなくてはならない。基本的には重要な機能ドメイン、Splicing Variants が多数存在するのであれば共通の exon を標的とする。

● Flox する領域の長さ

Cre は数 Mbp も飛ばすことも可能であるが、KO マウスを作製するとなると Targeting Vector 内に収めなくてはならないので長くても 6kb が限界であり、さらに Neo 遺伝子より離れた loxP 配列は、その距離が長くなると挿入されにくい傾向があるので、1kb 以下が良いと思われる。また挿入されているかを ES 細胞の段階で PCR あるいはサザン解析により確認する必要がある。

● 挿入部位について

loxP 配列を挿入する部位は intron の内部であるので場合によっては Splicing への影響を及ぼし兼ねない。しかし、これに関しては今のところ避ける方法はないので、当方ではできるだけ中央は避けて、exon から 200bp 程度の場所にしている。

3. 設計図に必要なこと

1) Targeting Vector

原則として Long arm は 6~8kb で Short arm は 3~4kb は必要である。Short arm は 5'側と 3'側のどちらでも構わないが、5'側はプロモーター領域である場合が多く、GC rich であることがよくある。そのため 3'側の PCR を行うのが定石である。3'側の PCR による増幅が困難な場合は 5'側で行うこともある。

2) Neo により置換する場合

基本的に exon の 5'側を 100bp 程度残しておく。また exon 内部に挿入する方法でも構わない。

3) LacZ を挿入する場合

LacZ の 1st Met を標的遺伝子の 1st Met より先に認識させなければならぬため、1st Met のある exon で 1st Met より 5'上流へ 5'UTR が残るように挿入する。

4) Control Vector

PCR 条件検討のとき ES 細胞ヘランダムインテグレーションさせるため DT-A は付加しない。Arm 配列が確実に挿入させるため pBluescript などの余分な配列は arm 側に付加すること。

5) サザン解析

5'側プローブ、3'側プローブと Neo プローブの 3 種類について行う。設計図の段階でどの制限酵素を使うか、またその酵素がゲノムに対して完全消化できる酵素であるかを把握しておくことが重要である。サザン解析に有用な制限酵素について

はリスト(ホームページよりダウンロードできる)を参考にして頂きたい。PCR によるスクリーニングまでは順調に進んでもサザン解析で手間取るケースがよくあるので注意が必要である。またプローブもあらかじめ決めておく必要がある。実際にサザン解析してプローブを決めるのが最も良いが、場合によっては変更することもあるので、設計図の時点では Blast Search を <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> で行い、他の染色体と相同性の低い領域があればほとんど問題ない。プローブの長さは 500~1kb ほどでよい(RI 標識の場合)。検出する断片の長さは 5~25kb の範囲が一般的である。10kb までは 1kb 前後の分離は容易であるが、10kb 以上になると 2kb ぐらいの差が必要である。しかし、電気泳動をかなり長く流せば 20kb 以上でも 1kb 前後の分離も可能である。

始めに作成する設計図はあくまでも概要であり完璧である必要はない。しかし、計画性がないと変更も効かなくなるため、十分にディスカッションを行い作成して頂きたい。

迅速に KO マウスを作製するには、設計図を作成したらまず Control Vector を作製し PCR 条件を決定すべきである。Targeting Vector の作製は PCR 条件検討と並行し行うのが効率よい様に思われるが、最も重要なことは PCR によりスクリーニングが行えるか否かである。Targeting Vector の作製は PCR 条件が決まりしだい始める方が、PCR が上手く行かないなどでコンストラクションの変更がスムーズに行える。