

資料

コオロギにおける遺伝子ノックアウト概要

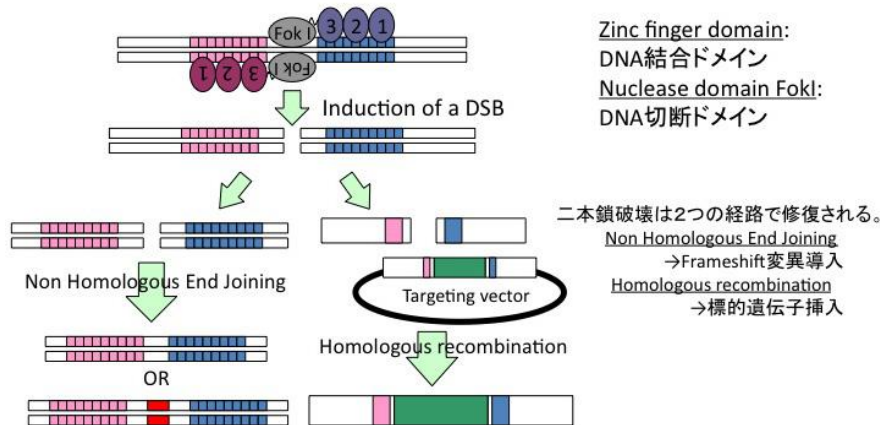


図1) 人工制限酵素 (人工ヌクレアーゼ) ZFNs によるゲノム編集 (TALENs の場合も原理は同じ). 人工ヌクレアーゼは DNA 結合ドメインと DNA 切断ドメイン (FokI) を有している. DNA 結合ドメインをデザインすることで標的配列に特異的に結合するヌクレアーゼを構築することができる. ZFNs, TALENs ともに二量体で機能する. 標的部位が酵素により切断されると (Double-strand break; DSB), 修復経路が働くが, このとき Non Homologous End Joining の経路で修復されると一定の割合で塩基の挿入/欠失が生じ, 遺伝子破壊が起こる. ターゲティングベクターを導入すると Homologous recombination により外来配列が標的部位に挿入される.

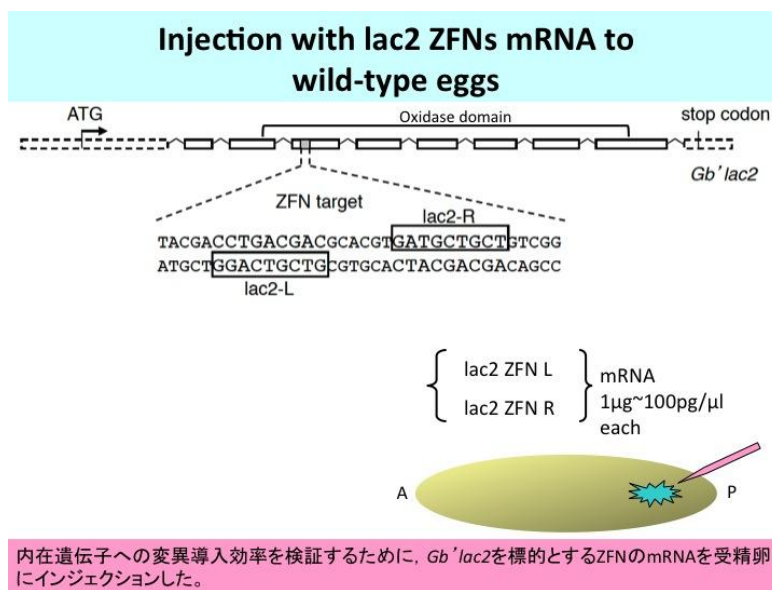
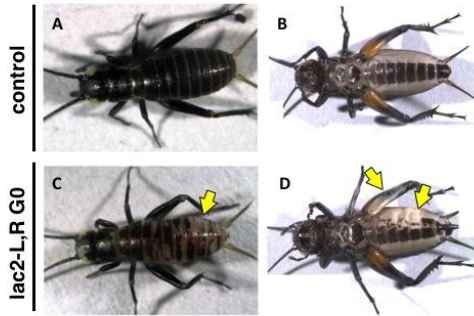


図2) コオロギへの人工制限酵素の導入. 表皮の黒化に関わる Laccase2 遺伝子を標的とする人工制限酵素の mRNA をコオロギの卵に顕微注入した.

**Results of injection
with ZFNs mRNA after hatching**



ZFNをインジェクションした個体で白い斑点が観察された。

図 3) 人工制限酵素を導入した世代では遺伝子破壊が部分的に生じた.

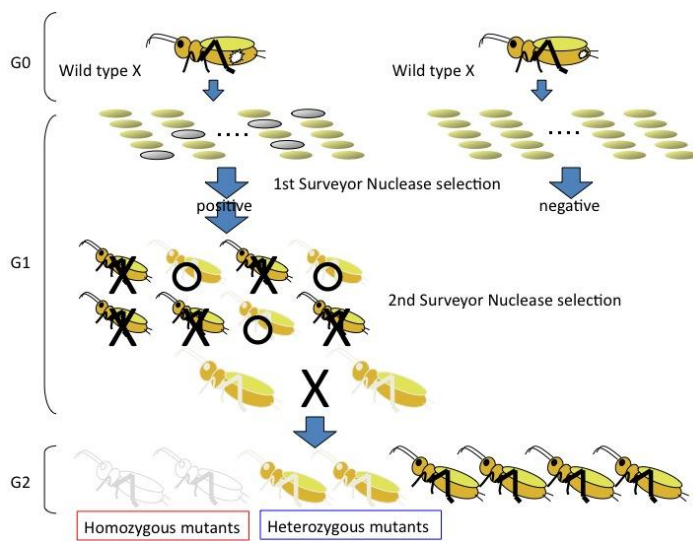


図 4) 交配と変異体スクリーニングを経て父方, 母方両方の染色体の遺伝子が破壊された完全なノックアウト個体 (ホモ変異体) を得る.

Phenotypes at G1 and G2

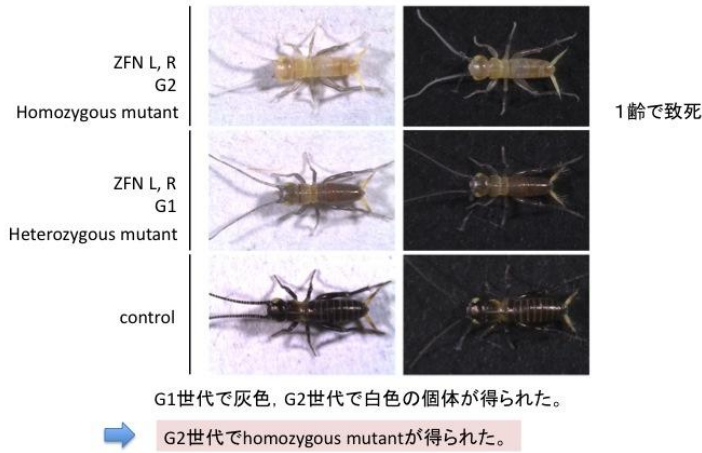


図5) 人工制限酵素導入後の第2世代で、白色の、Laccase2 遺伝子のホモ変異体（最上段）が得られた。

Genotyping at G1 and G2

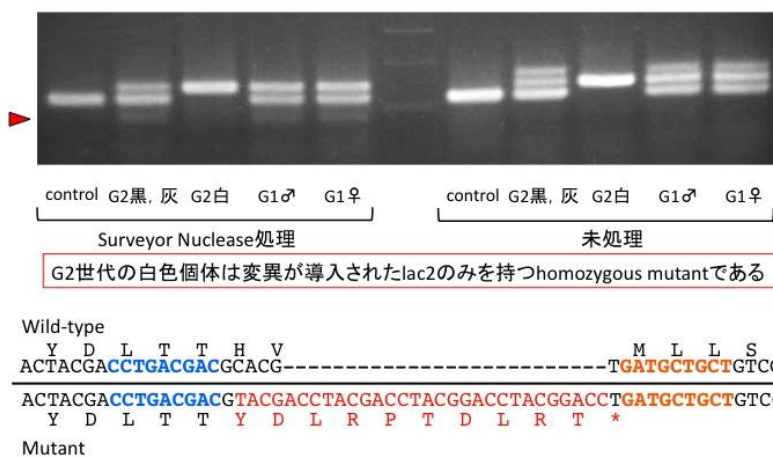


図6) 人工制限酵素により、標的部配列に変異が入り、遺伝子破壊が起こっている。