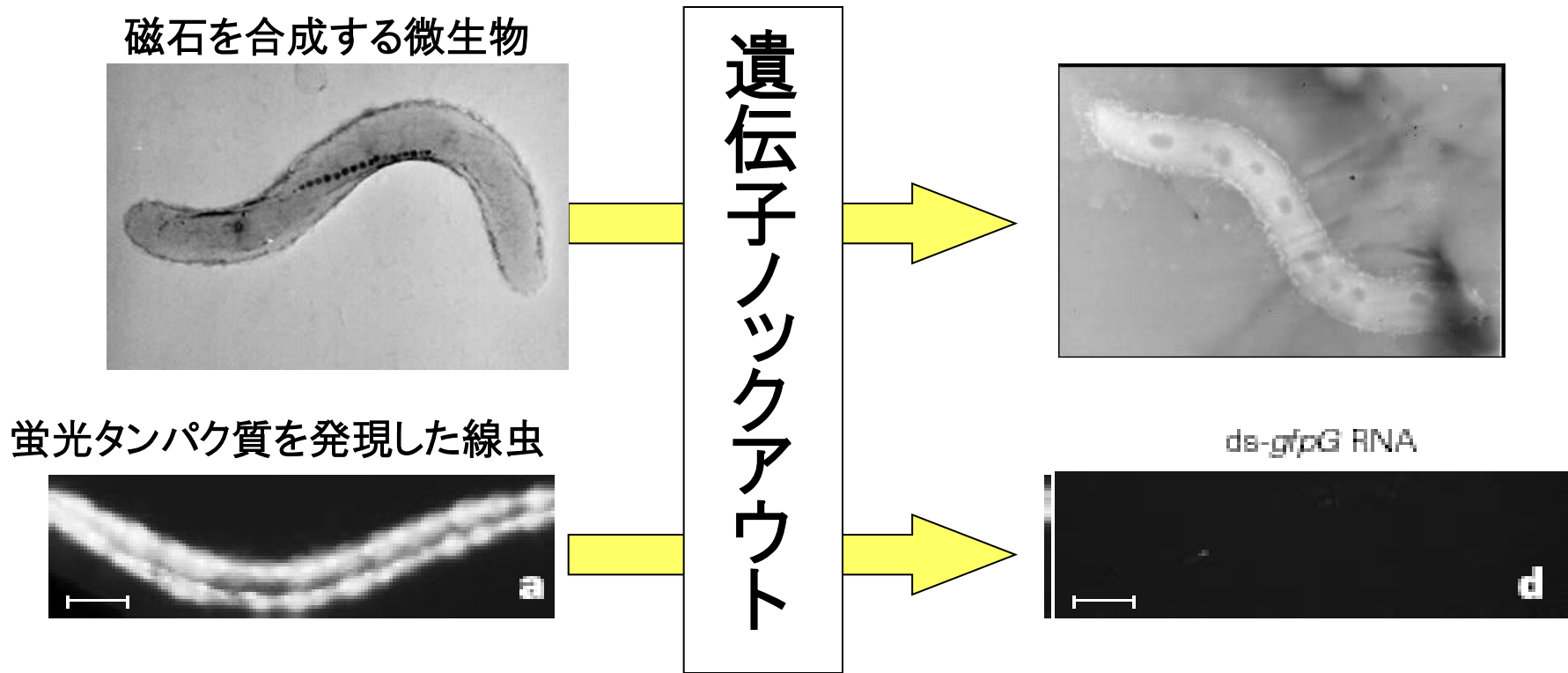


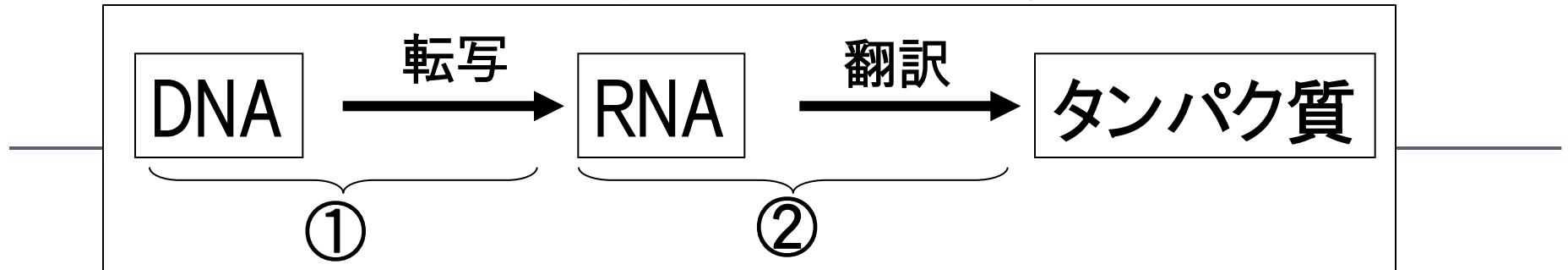
分子生物学の研究技術: 遺伝子ノックアウト



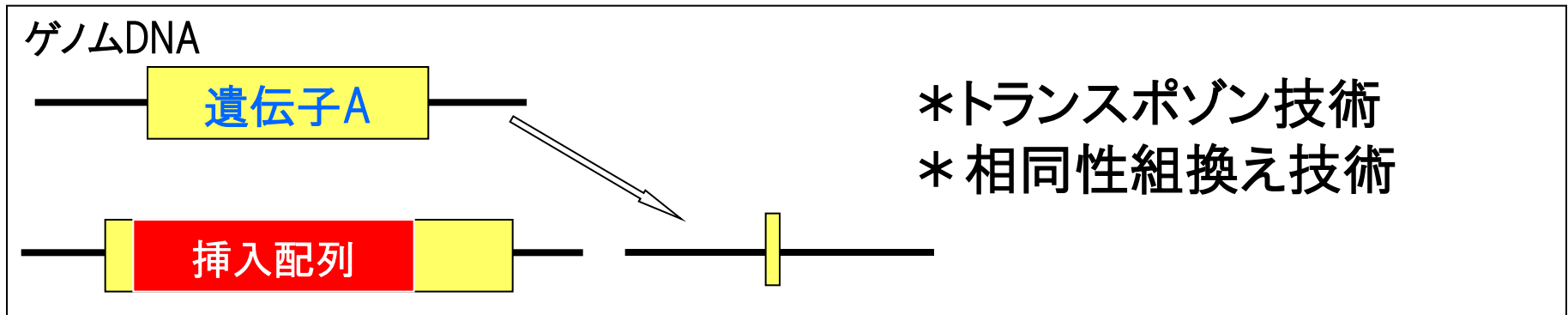
ノックアウト技術

ある特定の遺伝子(またはその発現)をつぶして、生体全体の働きの変化を観察することによりその を解析する手法

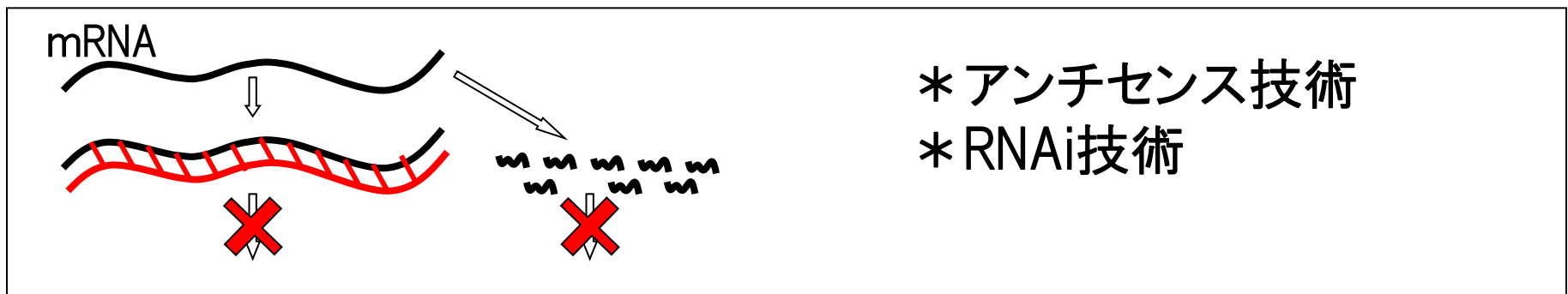
どこをノックアウトするか



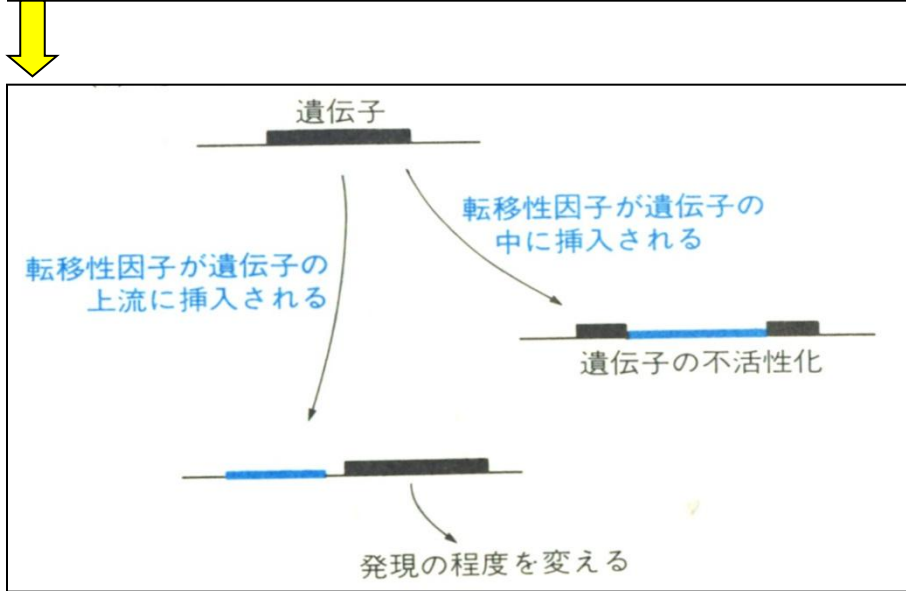
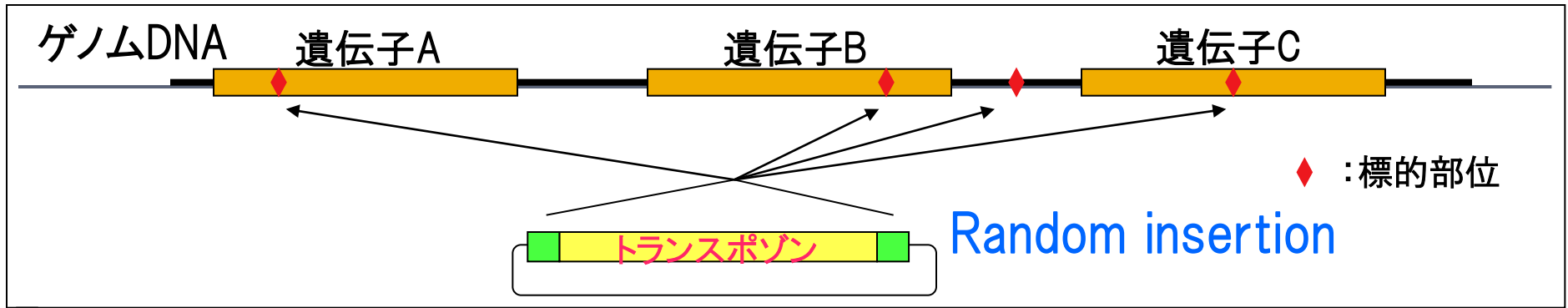
①DNA(遺伝子)を標的



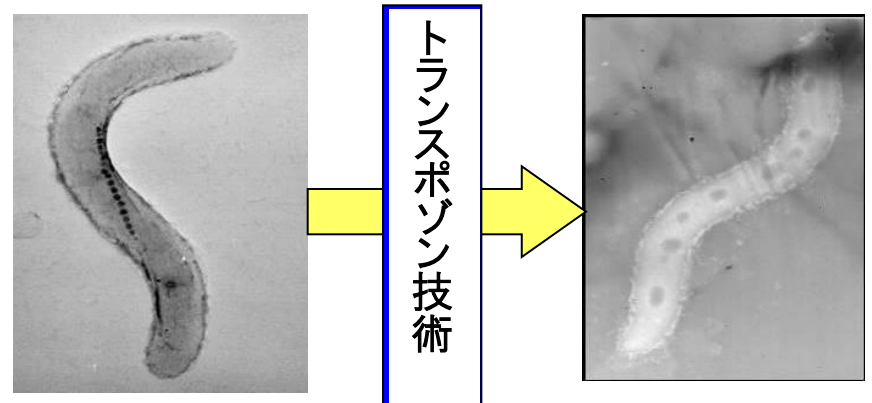
②mRNAを標的



トランスポゾン技術による遺伝子ノックアウト



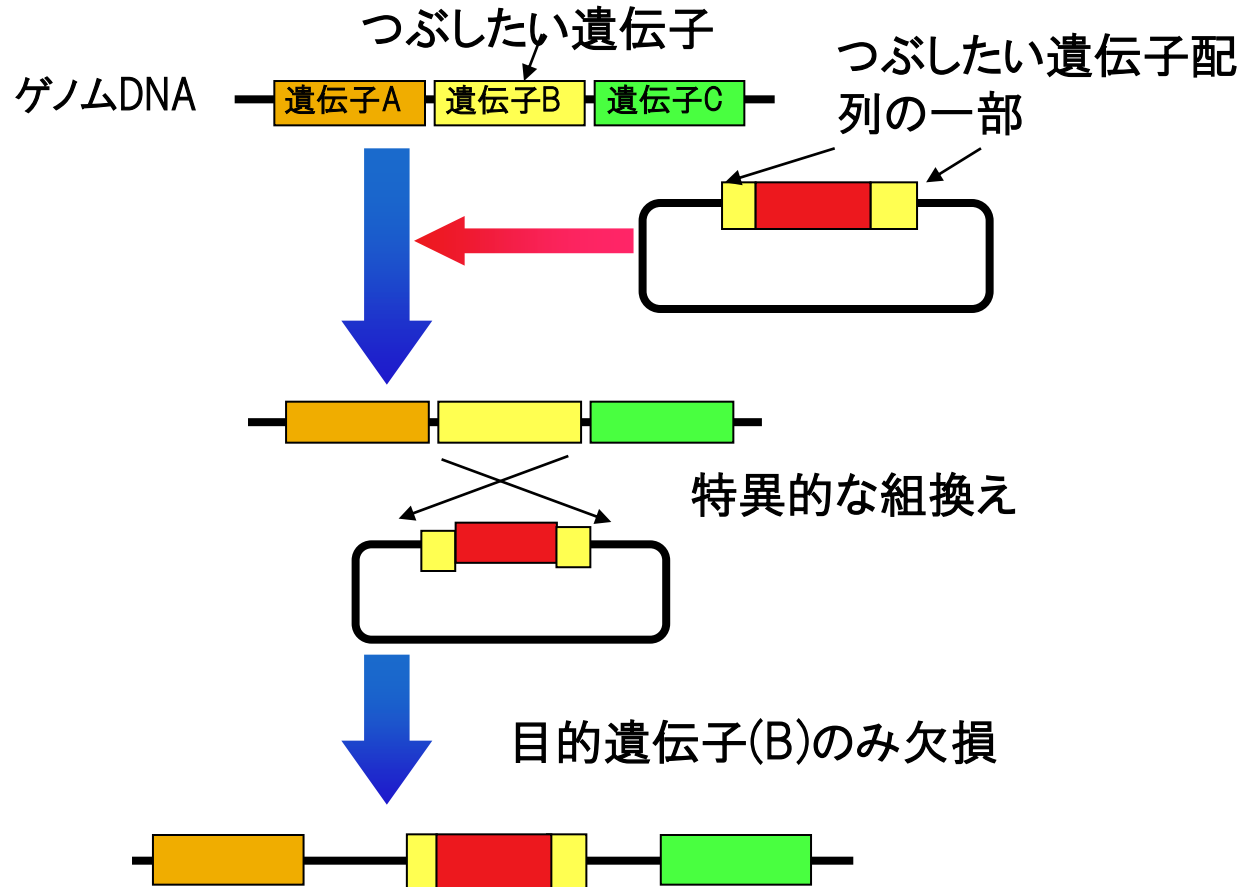
例: 磁性細菌の磁性粒子合成関連遺伝子の単離



表現系がわかりやすいターゲット(磁性粒子合成)に対しては有効

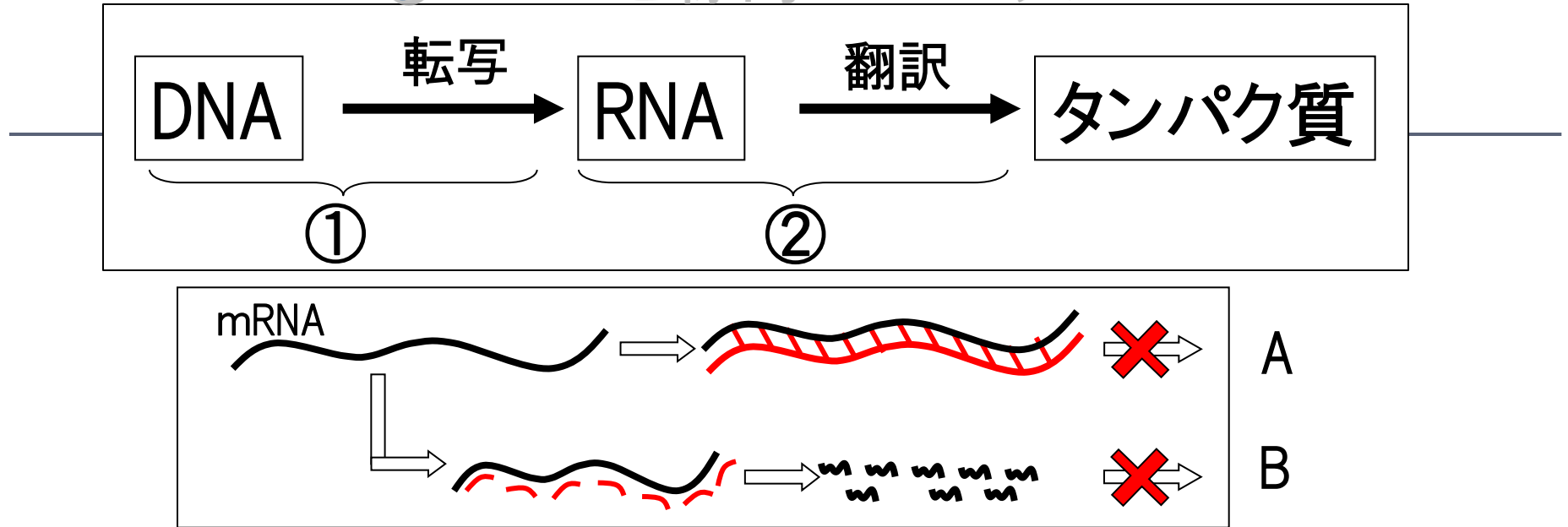
問題点→ の遺伝子を欠損させることができない

相同性組換え技術による遺伝子ノックアウト



問題点→技術・時間がかかる
生命現象に の遺伝子には適応できない

②mRNAを標的としてノックアウト



A. アンチセンス技術

mRNAと選択的に結合する核酸(DNAまたはRNA)を用いてタンパク質への
する技術。

B. RNAi(RNA interference)技術

二本鎖RNAが相補的な標的mRNAの を促進することにより、標的タンパク質の発現を抑制する技術。

アンチセンス技術

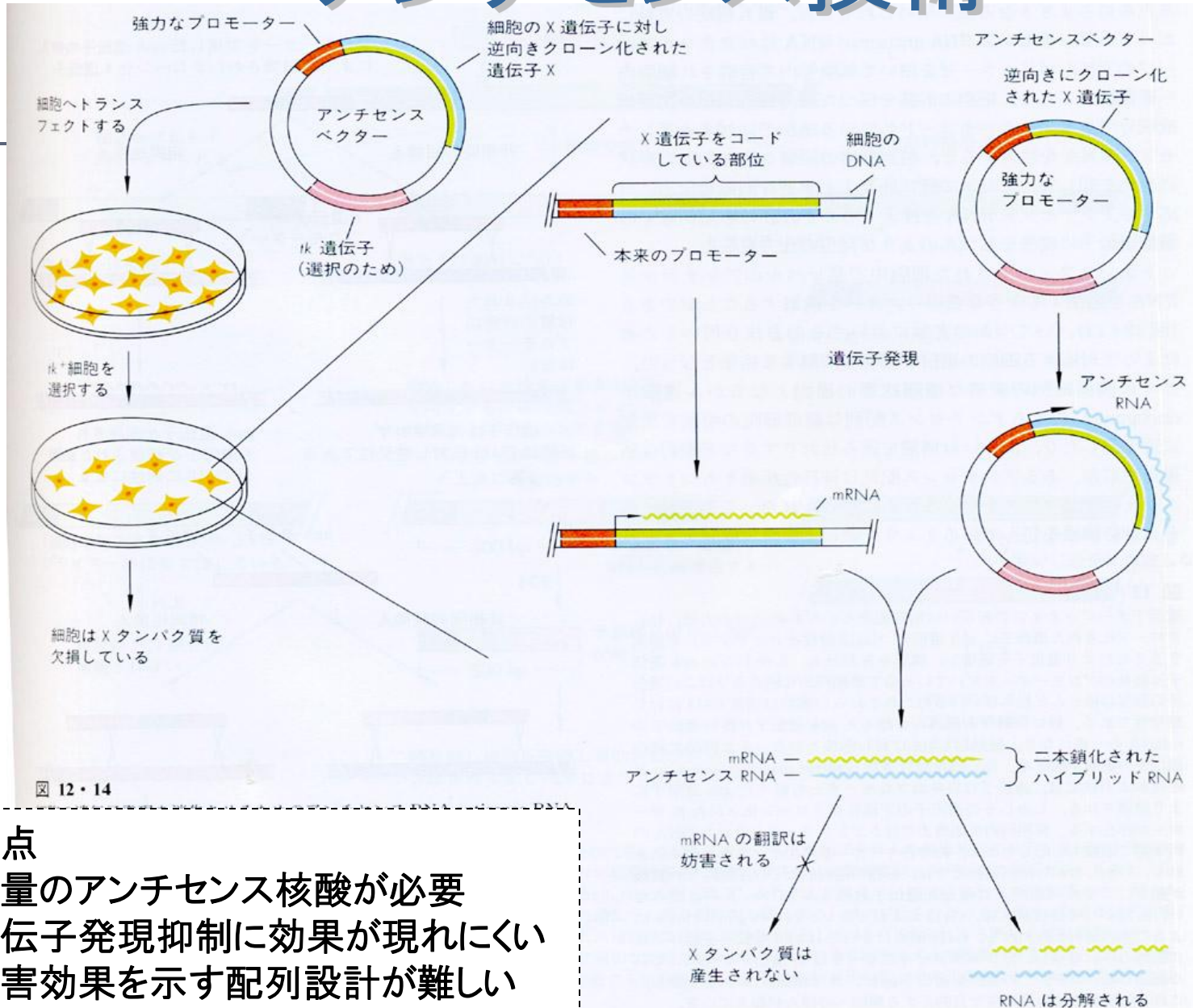
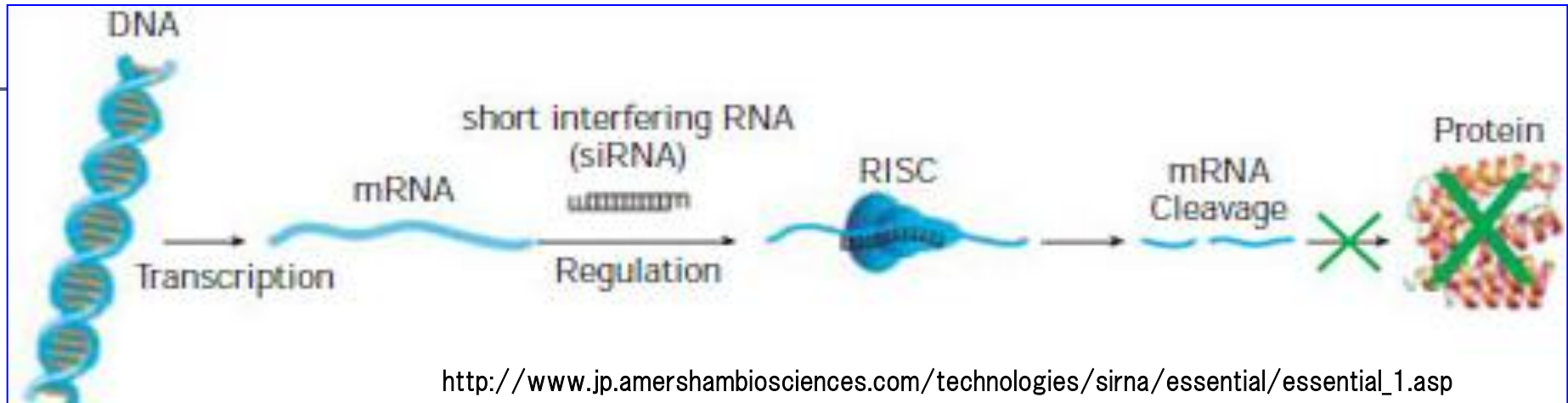


図 12・14

問題点

- 多量のアンチセンス核酸が必要
- 遺伝子発現抑制に効果が現れにくい
- 阻害効果を示す配列設計が難しい

RNAiのメカニズム(復習)

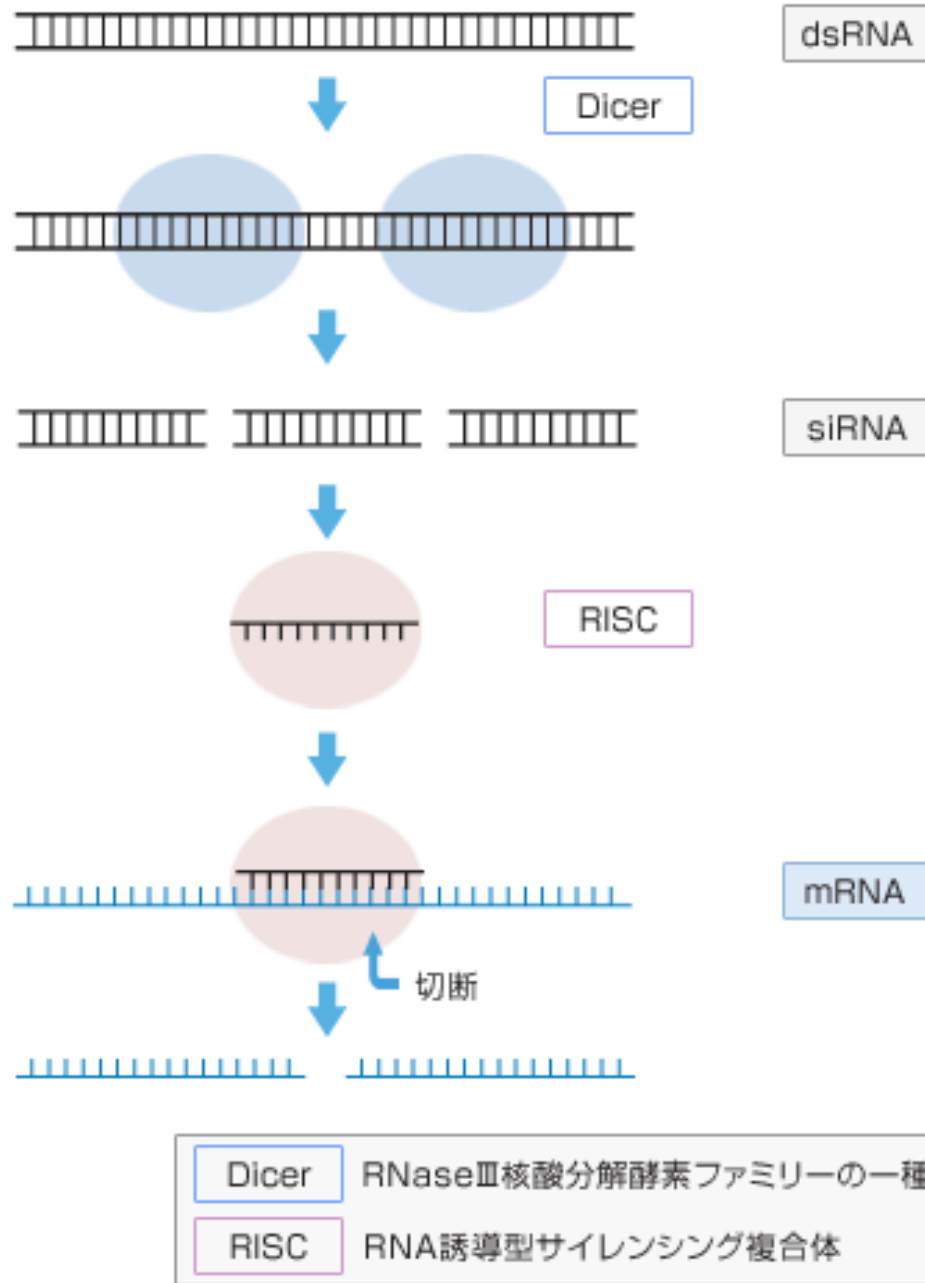


- ・目的の遺伝子配列に対応する二本鎖RNA (double-stranded RNA; dsRNA)を体内に導入すると、特異的な配列が分解され、遺伝子の発現が抑制される現象
- ・線虫(*C. elegance*)で初めて見出された (1998年)
- ・菌類、酵母、テトラヒメナ、ショウジョウバエおよび植物、ほ乳類まで保存

生理学的役割(仮説)

- ・ウイルスやトランスポゾンなどの外来性因子に対する防御機構
- ・生体内で生成された“異常な”mRNAの排除機構
- ・生物が内在的に持っている遺伝子発現の転写後制御機構

RNAiの原理



長い二本鎖RNA(dsRNA)は、さまざまな生物や細胞種におけるターゲット遺伝子の発現抑制に利用されている。取り込みの際に、長いdsRNAはRNA干渉(RNAi)経路と呼ばれる細胞内経路に入る。まずdsRNAが、RNase IIIに似たDicerと呼ばれる酵素に切断され、20~25塩基のsiRNA (small interfering RNA) になる。続いて、siRNAはRISC (RNA-induced silencing complex) として知られている、エンドリボヌクレアーゼを含む複合体に取り込まれ、取り込まれた二本鎖siRNAは一本鎖になる。そのsiRNA鎖が、相補的なRNA分子にRISCを導き、そのRNAを切断する。siRNA鎖が結合した領域の中間辺りでRNAの切断は起こる。

まとめ

遺伝子ノックアウト

DNA

転写

RNA

翻訳

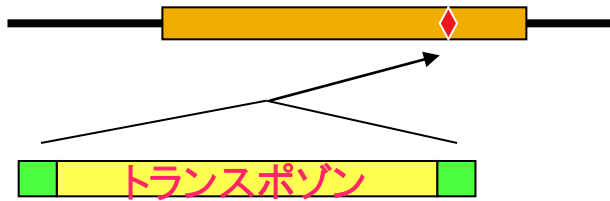
タンパク質

①

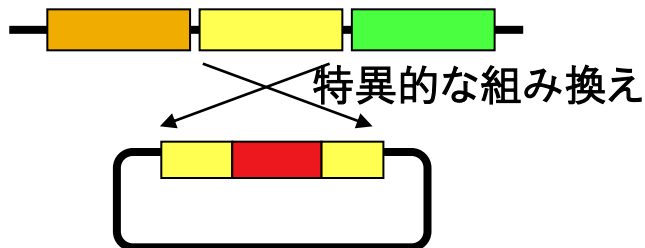
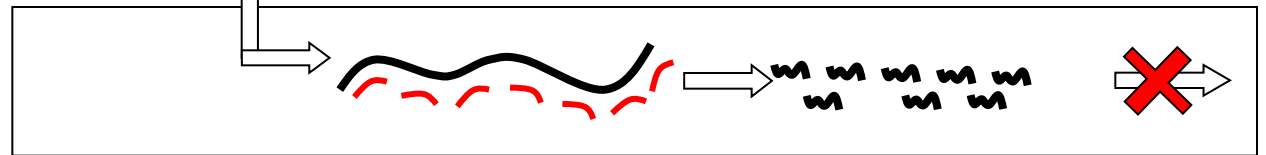
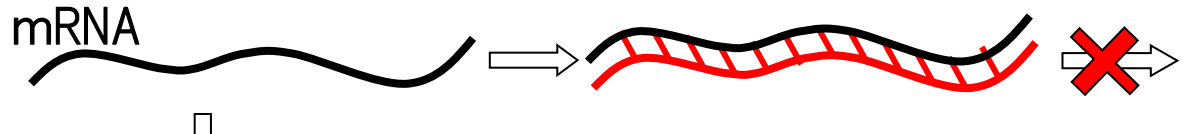
- *トランスポゾン技術
- *相同性組換え技術

②

- *アンチセンス技術
- *RNAi技術



mRNA



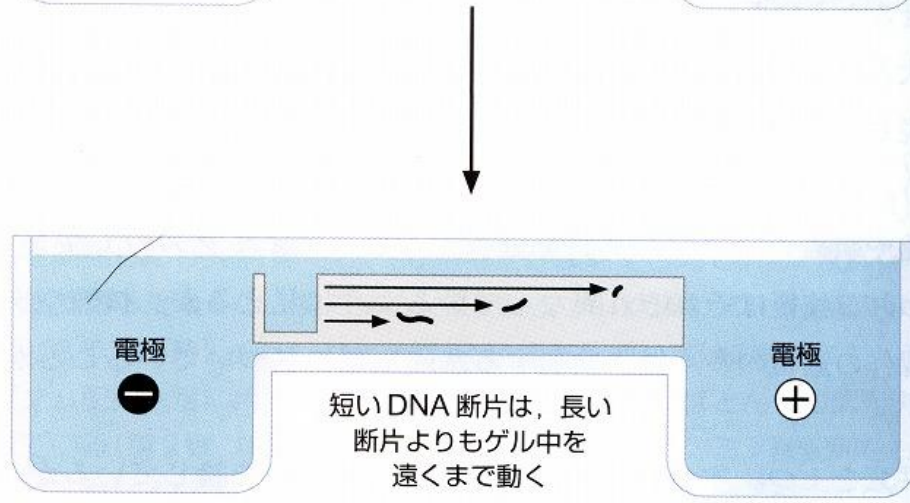
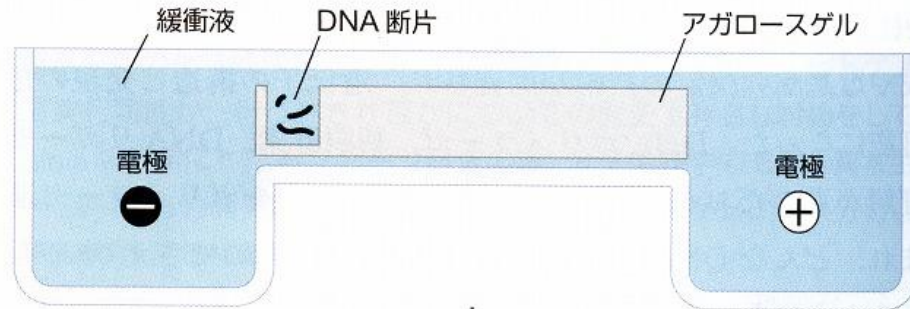
遺伝子機能解析

核酸の電気泳動(1)

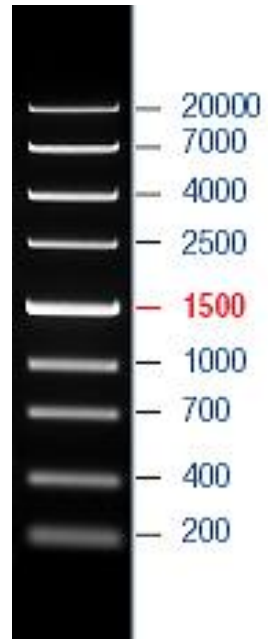
■ ゲル電気泳動

- ゲルに電場をかけると、線状のDNA分子は大きさに従って分離する。DNAは に荷電しているので、 に向かって移動する。

電気泳動槽



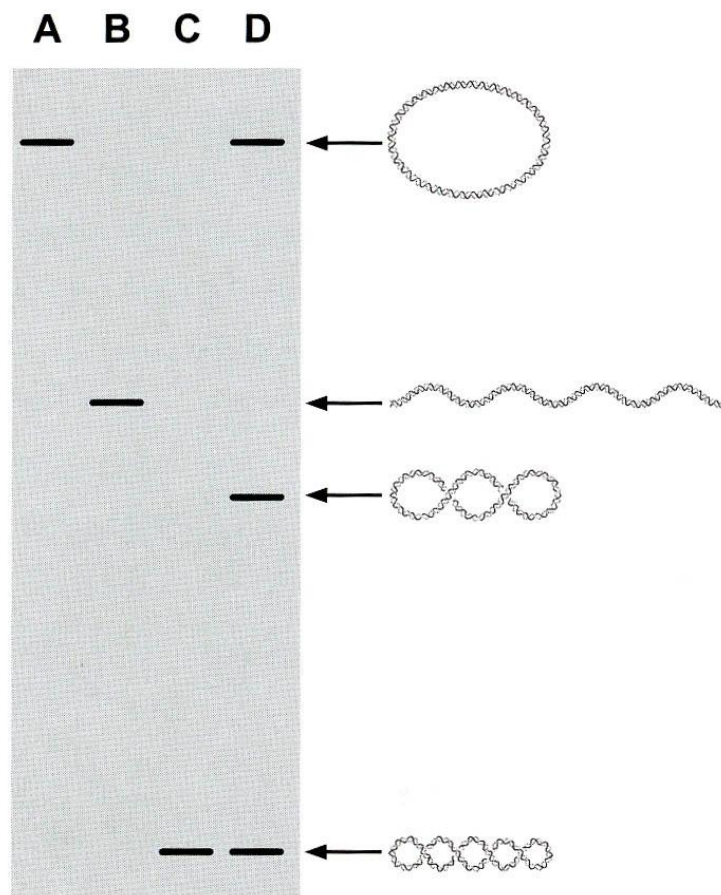
(bp)



核酸の電気泳動(2):

■ 大きさ以外の分離

- 電気泳動によるDNA分子の分離には、分子量だけでなく、形や位相幾何学的な性質も影響する。→超らせんDNA、直鎖DNAなど



ゲルの材料

ポリアクリルアミド

分離能が高いが、分離可能なDNAの大きさの範囲が狭い

アガロース

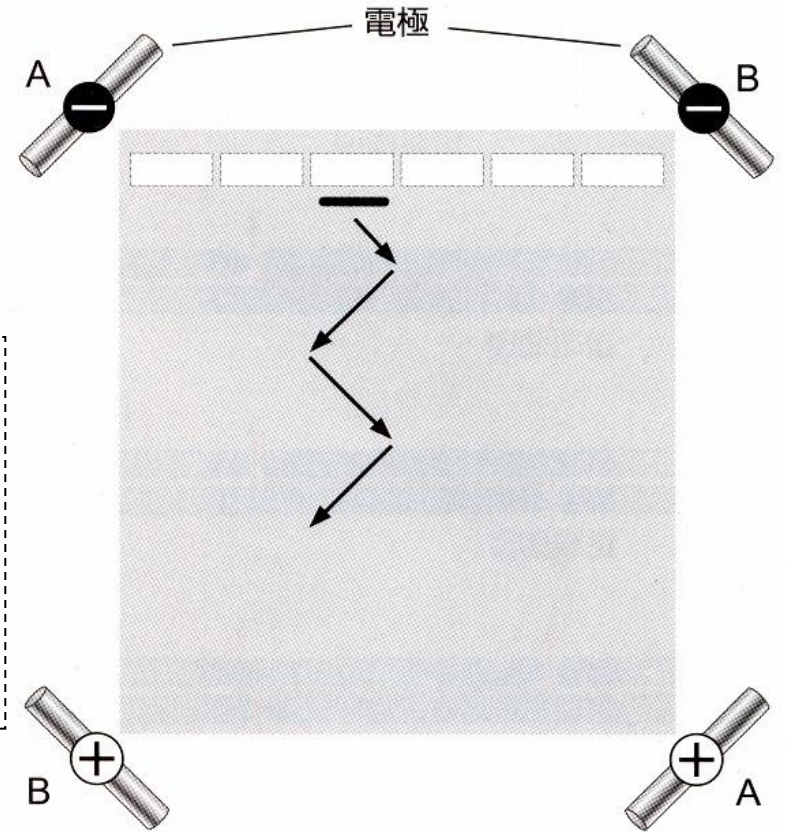
分離能は劣るが、数十から数百キロ塩基にも及ぶDNA分子も分離できる

核酸の電気泳動(3):パルスフィールド電気泳動

■ パルスフィールド電気泳動

- (30kb以上)の分離に用いる電気泳動技術。DNAに異なる角度の電場を特定の時間間隔(パルス)でかける。

アガロースゲルを電気泳動槽の上面から見た図。AとBは2組の電極を示し、直交した電場を交互にかける。Aがオンのときは、DNAはAの陽極がある右下の角に向かって動く。AがオフになりBがオンになると、DNAは左下の角に向かって動く。したがって電気泳動が進行すると、DNAは矢印のような道筋をたどることになる。



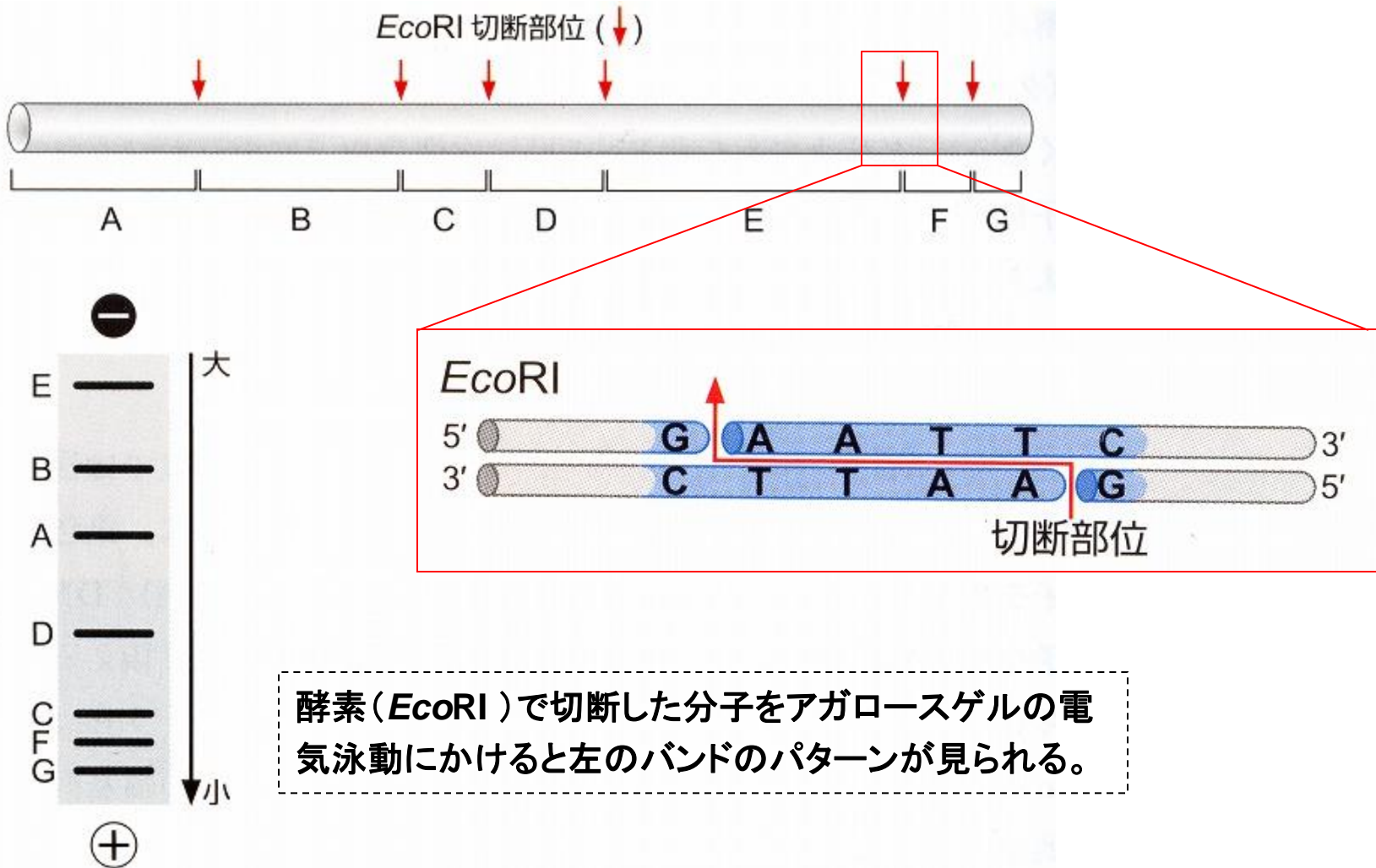
制限酵素(1)

■ 制限酵素

- DNAの特定の塩基配列を識別して特異的な部位で切断する

微生物	酵素の略語	塩基配列
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'
	<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'

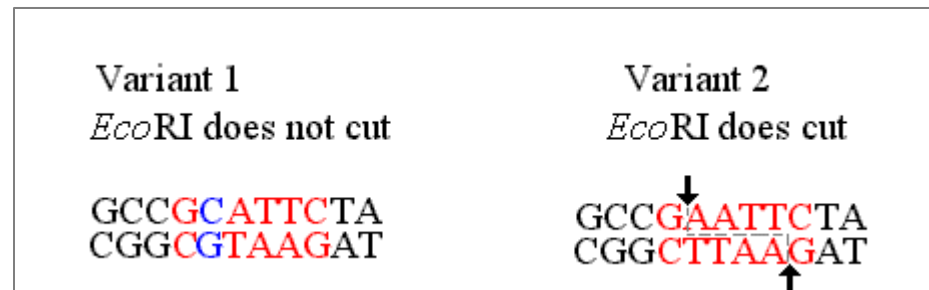
制限酵素(2): *EcoRI*によるDNA切断と電気泳動による分離



RFLP: restriction fragment length polymorphism

■ RFLP: 制限断片長多型

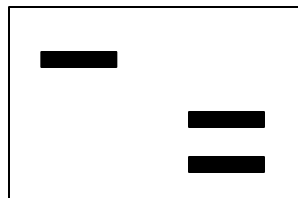
- 片方に多型をもつ制限酵素部位があるため、長さの異なる制限酵素切断断片が得られる
- SNP(一塩基多型)解析、種同定等に用いられている



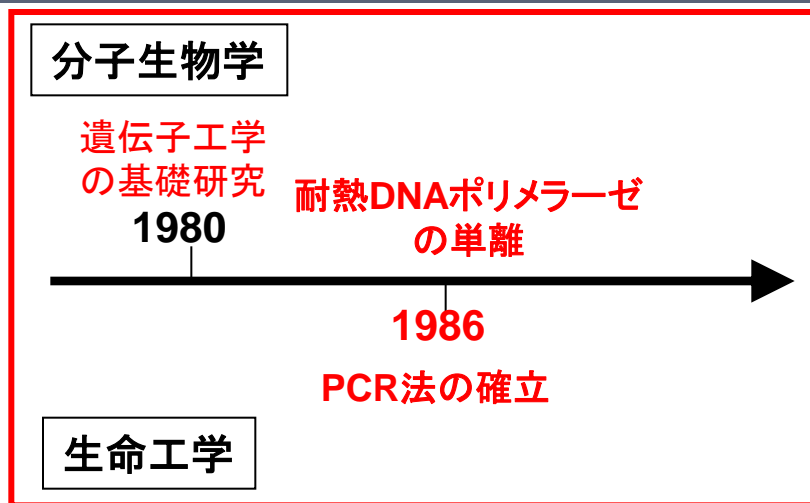
制限酵素消化



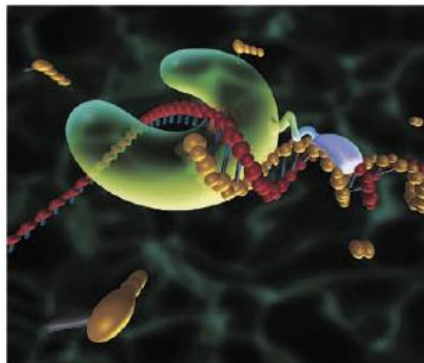
電気泳動



PCR(1): 耐熱DNAポリメラーゼの単離

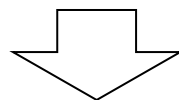


DNAポリメラーゼ



http://www.shiyaku-daiichi.jp/support/apps/finn_neb/img/p11middle.jpg

好熱性細菌からDNAポリメラーゼの単離

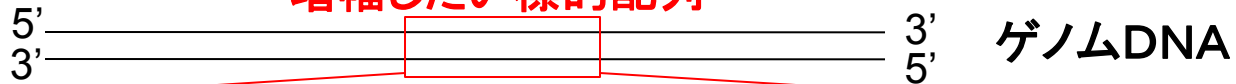


でも失活しないDNAポリメラーゼの獲得

- ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR)
 - DNAポリメラーゼを用いて連鎖反応的にDNA断片を増幅する方法

PCR(2):プライマー

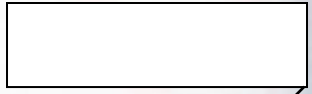
増幅したい標的配列



(a) 5' ... CTGACACAAC TGTGTTCACTAGCAA AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG ... 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'

加熱

(b) 5' ... CTGACACAAC TGTGTTCACTAGCAA AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG ... 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'



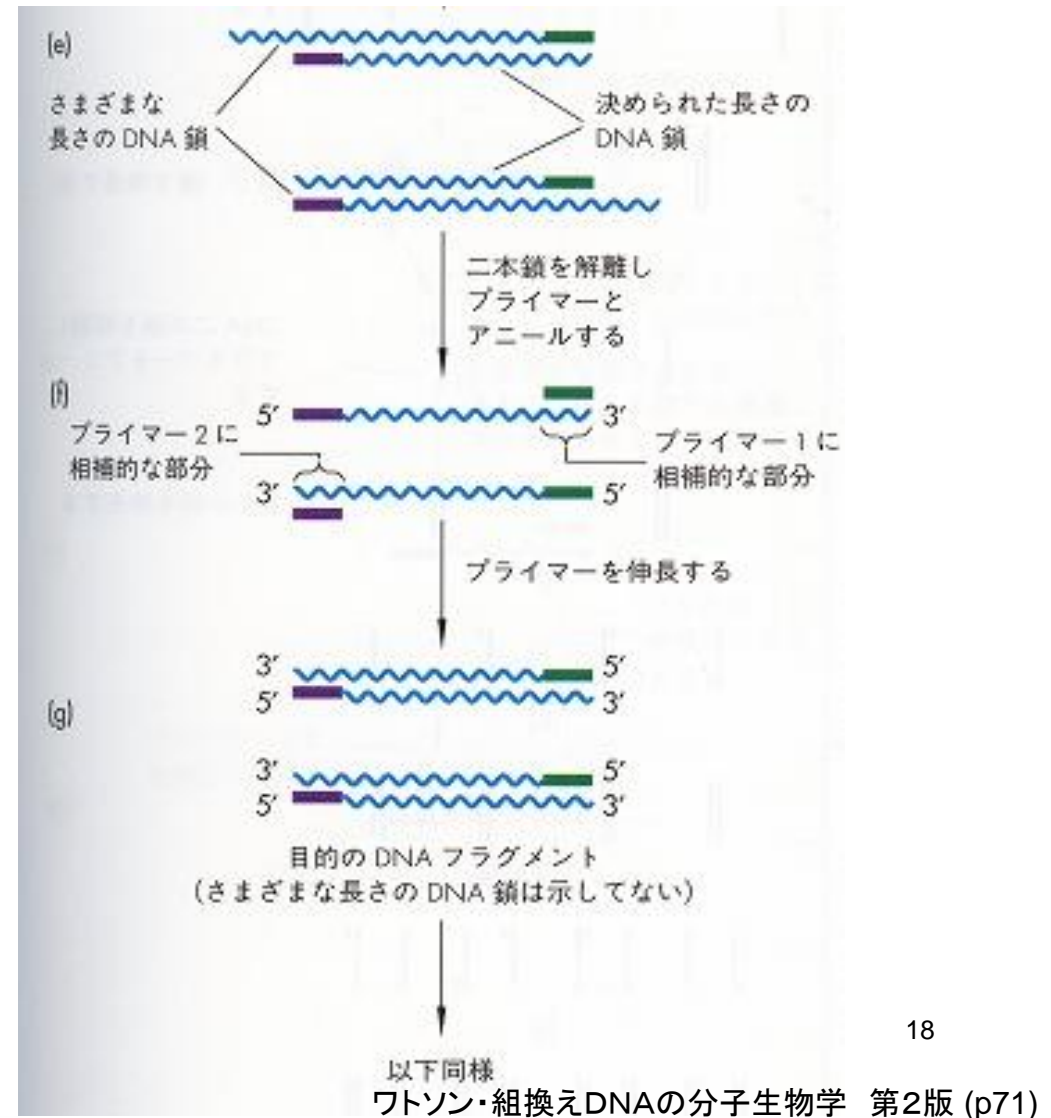
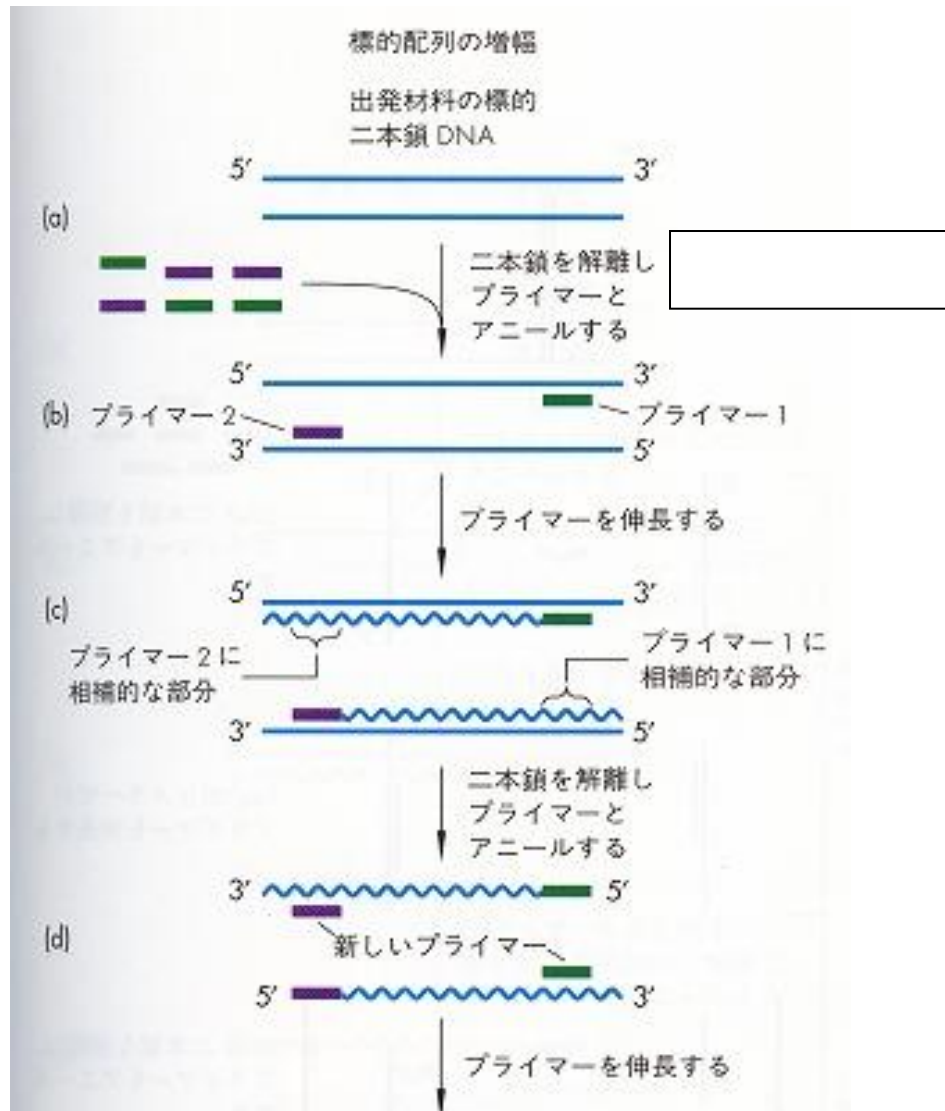
(c) 5' ... CTGACACAAC TGTGTTCACTAGCAA AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG ... 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'

5' ACACAAC TGTGTTCACTAGC 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'

(d) 5' ... CTGACACAAC TGTGTTCACTAGCAA AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG ... 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'

5' ACACAAC TGTGTTCACTAGCAA ... 3'
3' ... GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT TTCCA CTTGCACCTACTTCAACCAC ... 5'

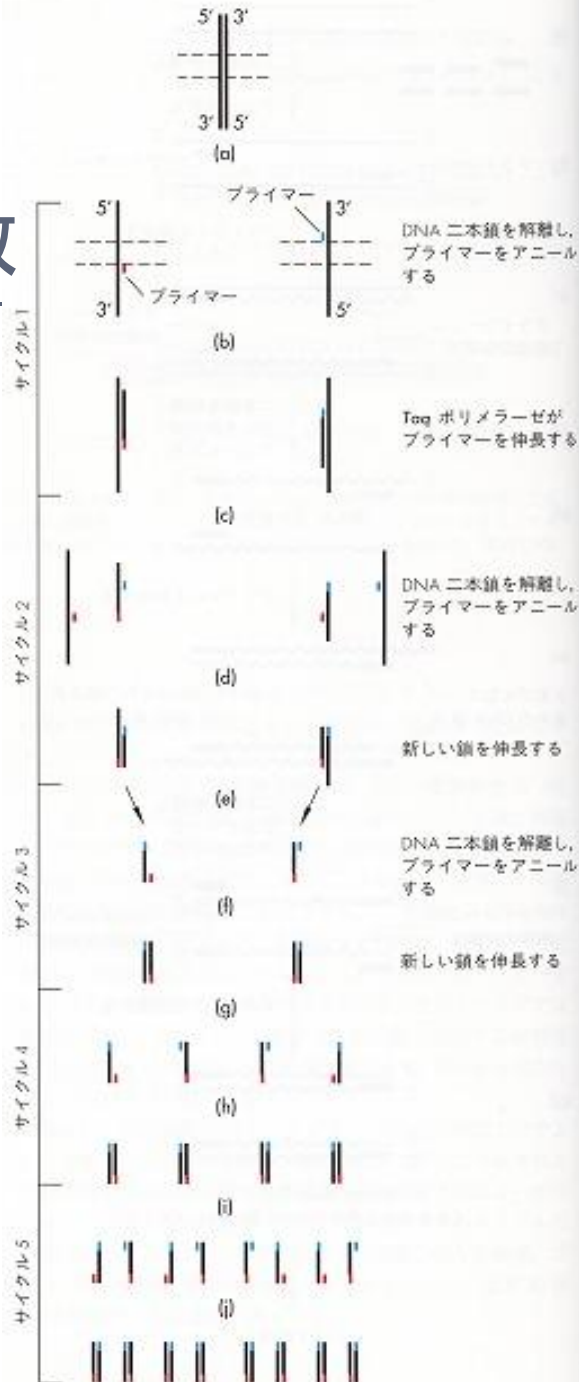
PCR (3) : 原理



PCR(4)

: PCRによるDNA断片の増幅数

サイクル数	二本鎖標的分子の数
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,544,432
28	67,108,864
29	134,217,728
30	268,435,456
31	536,870,912
32	1,073,741,824



まとめ (<http://www.tuat.ac.jp/~matunaga/tttt/012.pdf>)

■ 遺伝子ノックアウト

- トランスポゾン技術: DNAをターゲット、ランダムに遺伝子をノックアウト
- 相同性組換え技術: DNAをターゲット、特異的な遺伝子をノックアウト
- アンチセンス技術: RNAをターゲット、標的mRNAに結合・翻訳阻害によるノックアウト
- RNAi技術: RNAをターゲット、標的mRNAに結合・分解してノックアウト

■ 核酸の電気泳動

- ゲル(アガロース or ポリアクリルアミド)を用いたDNAの分離
- 分子量だけでなく、形や位相幾何学的な性質も影響
- パルスフィールド電気泳動

■ 制限酵素

- *EcoRI*, *TaqI* など
- RFLP: サザンハイブリダイゼーション、PCRにより検出

■ PCR法

- プライマー、dNTP、耐熱ポリメラーゼ
- 温度サイクル、指数関数的増幅