

IKMC で開発した基本アレルと派生アレルの構造図

訳・編集： 浜松医科大学 動物実験施設 加藤秀樹

国際ノックアウトマウスコンソーシアム(International Knockout Mouse Consortium、以下IKMCと呼ぶ)の最終目標は、C57BL/6N由来のES細胞を用いて遺伝子トラッピングやターゲティングを使ってすべてのタンパクをコードしている遺伝子の変異を得ることである。本書はマウスの変異遺伝子のサブセットの対立遺伝子の命名規約に特化するので、遺伝子、対立遺伝子、および変異遺伝子の命名に関する完全なガイドラインについては [Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat](#)を見てほしい。

IKMC では 5 つの基本的な変異アレルが作られており、加えて EUCOMM tool プロジェクトも IKMC と連携して標的 cre ノックイン対立遺伝子を作製している。

[1. Gene Trapped Alleles](#)

[2. Targeted Reporter-tagged Deletion Alleles](#)

[3. Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion with Conditional Potential \(conditional-ready\)](#)

[4. Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion NON-conditional](#)

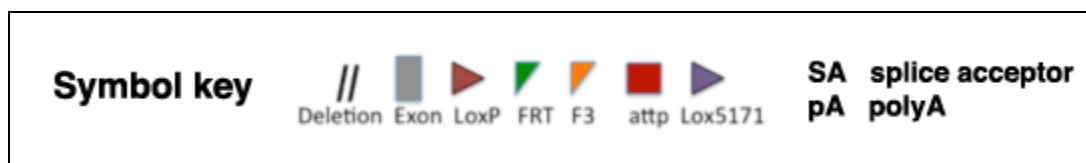
[5. Targeted Knockout First Alleles with Artificial Introns](#)

In conjunction with IKMC by the EUCOMMtools project

[6. Targeted cre Knockin Alleles](#)

[References](#)

図では下記のシンボルが使われている。



Project 記号	Project 名	施設記号(LabCode)
KOMP	<u>K</u> nockout <u>M</u> ouse <u>P</u> roject (USA)	Mbp, Wtsi, Vlcg
EUCOMM	<u>E</u> uropean <u>C</u> onditional <u>M</u> ouse <u>M</u> utagenesis (Europe)	
NCOM	<u>N</u> orth American <u>C</u> onditional <u>M</u> ouse <u>M</u> utagenesis (NorCOMM) (Canada)	Cmhd, Mfgc
TIGM	<u>T</u> exas A & M <u>I</u> nstitute for <u>G</u> enomic <u>M</u> edicine (TIGM) (USA)	Tigm

1. Gene Trapped Alleles

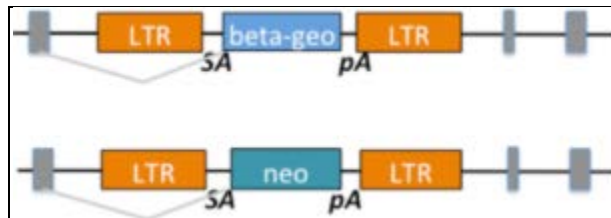
対立遺伝子記号の右肩 (superscript) は下記の 3 つの部分で構成される。

Gt	gene trap の略記号
()	括弧内に変異 ES 細胞株の ID を記入
Labcode	対立遺伝子を作製している研究室または研究者を記号で表す

対立遺伝子の記号: $\text{Gene-symbol}^{\text{Gt}(\text{mutant cell line ID})\text{Labcode}}$

1.1 Texas A&M Institute for Genomic Medicine が作製している gene trapped allele

beta-geo を持つタイプと neo cassette を持つタイプがある。



アリの例: $\text{Rnd3}^{\text{Gt}(\text{IST12405G10})\text{Tigm}}$

[例の説明: Rho family GTPase 3; gene trap IST12405G10, Texas A&M Institute for Genomic Medicine]

1.2 EUCOMM で作製された Gene trapped alleles

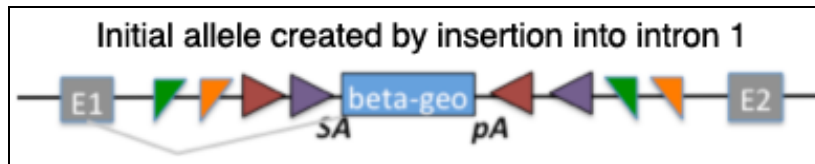
multiple FRT と loxP sites を含んでいて、いくつかの派生対立遺伝子を作ることが可能になっている。



アリの例: $\text{Nmnat2}^{\text{Gt}(\text{EUCE0262a08})\text{Hmgu}}$

[例の説明: nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2; gene trap EUCE0262a08, Helmholtz Zentrum Muenchen GmbH]

イントロン1に挿入することで以下の最初のアリルが作製される。



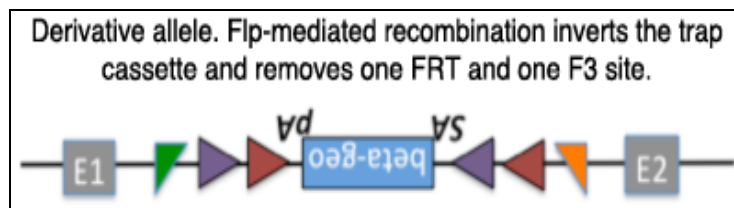
派生アリルについて

派生アリルは EUCOMM gene trap から作製され、FRT と loxP sites の利点がある。Flp 触媒組換えを使って得られる派生遺伝子の一つが、cre を使って内在性遺伝子の conditional targeting を起こさせる trap cassette を invert する。

派生アリルの例: [Nmnat2^{Gt\(EUCE0262a08\)1.1Hmgu}](#)

[例の説明: nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2; gene trap EUCE0262a08, 1.1, Helmholtz Zentrum Muenchen GmbH]

派生アリル。Flp 触媒組換えが trap cassette を逆向き (invert) にし、一つの FRT と一つの F3 site を除去する。

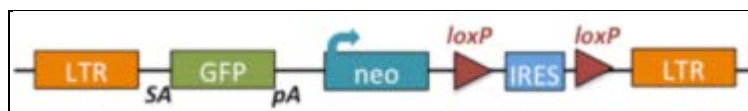


1.3 NorCOMM (NCOM) が作製した Gene trapped alleles

さまざまな vectors を使用し、その一つは以下に示した UPA である。

アリルの例: [Fgfr2^{Gt\(PST17605\)Mfgc}](#)

[例の説明: fibroblast growth factor receptor 2; gene trap PST17605, Mammalian Functional Genomics Centre]

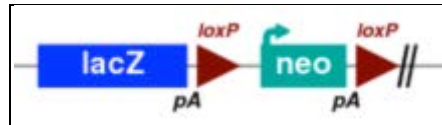


loxP and FRT sites の inclusion に依存して種々の派生対立遺伝子が作成される。

2. Targeted Reporter-tagged Deletion Alleles

2.1 Regeneron, Inc が開発した Reporter-tagged deletion alleles

Velocigene technology を使って作製されている。ほとんどの場合、これらのアレルでは coding 領域を欠失していて、LacZ, loxP, neo, loxP カセット(下図)で置き換わっている。



アレルの例: [Arrb2^{tm1\(KOMP\)Vlg}](#)

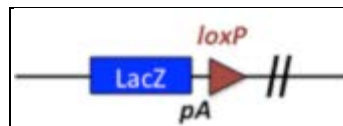
[例の説明 : arrestin, beta 2; targeted mutation 1, Velocigene]

派生アレルについて

Velocigene alleles を素にして cre 切出し欠失 (cre-excised deletion) を通して neomycin cassette を除去することにより派生対立遺伝子を作製できる。cre 切出し欠失アレルの表記は tm# を tm#.1 へ書き換える。

派生アレルの例: [Arrb2^{tm1.1\(KOMP\)Vlg}](#)

[例の説明 : arrestin, beta 2; targeted mutation 1.1, Velocigene]



2.2 Chori/Sanger/Davis collaboration が開発した Reporter-tagged deletion alleles

これらのアレルでは、「critical exon」が「FRT, LacZ, loxP, neo, FRT, loxP カセット」で置き換えられ、欠失している。

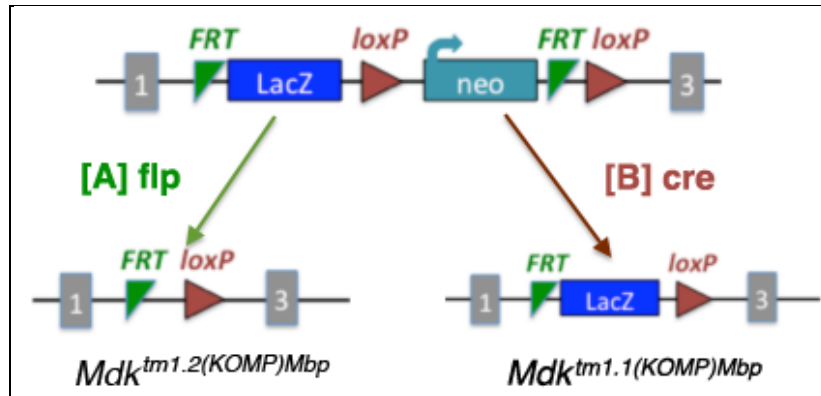
アレルの例: [Mdk^{tm1\(KOMP\)Mbp}](#)

[例の説明 : midkine; targeted mutation 1, Mouse Biology Program, UC Davis]

下の図では、exon 2 が targeting cassette で置き換わっている。

派生アレルの例 (下図右): [Mdk^{tm1.1\(KOMP\)Mbp}](#)

派生アレルの例 (下図左): [Mdk^{tm1.2\(KOMP\)Mbp}](#)



[A] flp で tm1 allele を削除し、tm1.2 allele を作製した。この場合、LacZ と neo が除去されている。

[B] cre で tm1 allele を削除し、tm1.2 allele を作製した。この場合、neo が除去されている。

2.3 NorCOMM (NCOM) project が開発した Reporter-tagged deletion alleles

Centre for Modeling Human Disease and the Mammalian Functional Genomics Centre が開発を行った。

2種類のわずかに異なる targeting cassette が使われた。それぞれ、critical exon を欠失している Lac tagged, conditional-ready allele である。Critical exon は att docking site を使って再導入できる。

アレルの例: [Itpr3^{tm1\(NCOM\)Mfgc}](#)

[例の説明: inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3; targeted mutation 1, Mammalian Functional Genomics Centre]



派生アレルの例: *Otud7b*^{tm1(NCOM)Cmhd}

[例の説明: OTU domain containing 7B; targeted mutation 1, Centre for Modelling Human Disease]



3. Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion with Conditional Potential (conditional-ready)

これらの遺伝子では promoter を含むか、あるいは、promoterless である。

備考: ここでは promoter がある version だけ図式化してある。critical exon is は loxP sites で flank されており、critical exon の上流に [FRT, LacZ, loxP, promoter, neo, and FRT] エレメントを持つ。派生遺伝子は cre または flp を使って作製する。

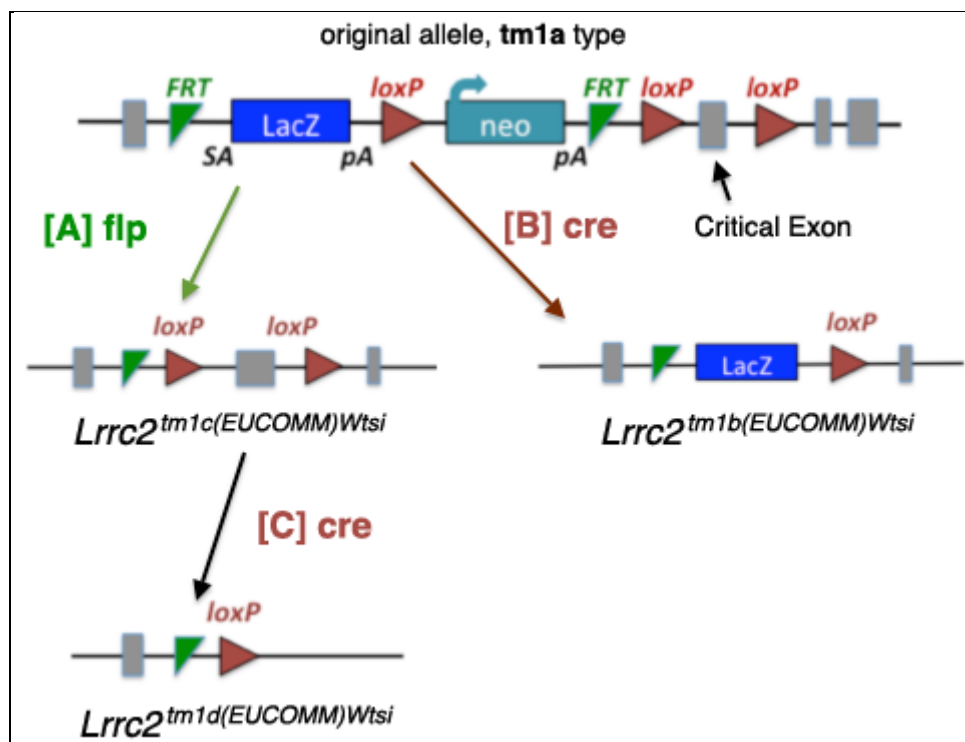
Example allele: *Lrrc2^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}*

[例の説明: leucine rich repeat containing 2; targeted mutation 1a, Wellcome Trust Sanger Institute]

派生アレルの例 (下図右): *Lrrc2^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}*

派生アレルの例 (下図左): *Lrrc2^{tm1c(EUCOMM)Wtsi}*

派生アレルの例 (下図左下): *Lrrc2^{tm1d(EUCOMM)Wtsi}*



例の説明: [A] flp で tm1a allele を削除して tm1c allele を作製する。LacZ と neo が除去されている。遺伝子はそのままで、critical exon に flank している loxP が conditional mutagenesis でアレルを作るのに適している。

[B] cre で tm1a allele を削除して Neo と critical exon が除去され、tm1b allele が作製される。遺伝子はそのままで、critical exon に flank している loxP が conditional mutagenesis でアレルを作るのに適している。Reporter を持つ null allele と定義づけられる。

[C] cre で tm1c allele を削除することにより critical exon を除去し、FRT と loxP を含む tm1d allele が作られる。

4. Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion

NON-conditional

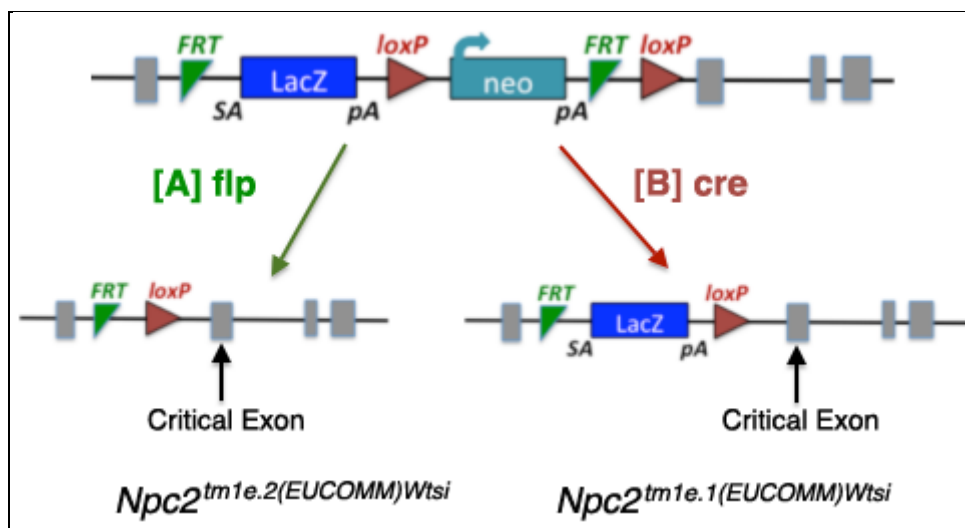
これらにアリルは *tm1a* で述べたことと同じである。ただし、critical exon (CE)の下流にある *LoxP* を失っている。したがって、それらはもはや conditional ではない。派生アリルは *cre* あるいは *flp* を使って作製される。

アリルの例: *Npc2^{tm1e(EUCOMM)Hmgu}*

[例の説明: Niemann-Pick type C2; targeted mutation 1e, Helmholtz Zentrum Muenchen GmbH]

派生アリルの例(右): *Npc2^{tm1e.1(EUCOMM)Hmgu}*

派生アリルの例(左): *Npc2^{tm1e.2(EUCOMM)Hmgu}*



例の説明: [A] *flp* が *tm1e* allele を削除し、*tm1e.2* allele を作製する。LacZ と neo が除去されている。

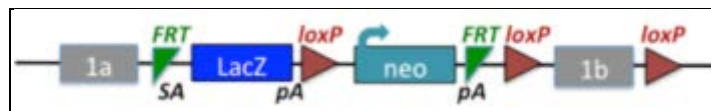
[B] *cre* が *tm1e* allele を削除し、*tm1e.1* allele を作製する。Neo が除去されている。

5. Targeted Knockout First Alleles with Artificial Introns.

いくつかの遺伝子は、大変小さいか、あるいは 1 個のエクソンしかなく、vector は conditional -ready alleles を失敗させる (critical exon を要求する)。そうした遺伝子の conditional knockout first alleles は、intron に埋め込んだ targeting cassette で人工 intron を導入することによって作製される。2 番目の exon (図では 1b) は critical exon として使われる。

アレルの例: *Cd68^{tm1a}(EUCOMM)Hmgu*

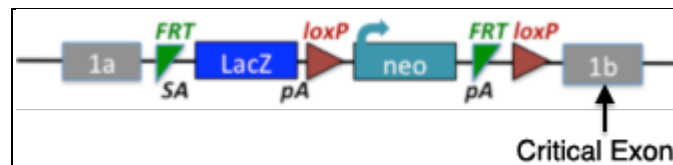
[例の説明: CD68 antigen; targeted mutation 1a, Helmholtz Zentrum Muenchen GmbH]



“knockout first” のアレルは、reporter-tagged insertion NON-conditional であり、critical exon の下流の loxP サイトが失われた場合に生じるのが tm1e alleles である。

アレルの例: *Cd68^{tm1e}(EUCOMM)Hmgu*

[例の説明: CD68 antigen; targeted mutation 1e, Helmholtz Zentrum Muenchen GmbH]



これらのアレルの派生アレルは上述の平行した構造で作製することができる。

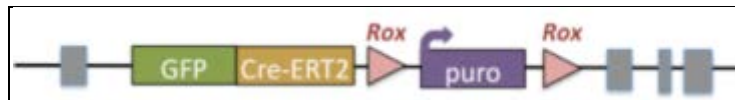
3. [Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion with Conditional Potential \(conditional-ready\)](#)
4. [Targeted Knockout First, Reporter-tagged Insertion NON-conditional](#)

6. Targeted cre Knockin Alleles.

EUCOMMtools プロジェクトでは、世界中で入手可能な cre 資源を広めるために targeted cre knockin アリルを作製している。selection cassette は Rox sites が傍に置かれていて、dre リコンビナーゼを使って除去できる。

アリの例: *Hprt*^{*tm1(Cbx1-cre/ERT2)*}*Hmgu*

Hprt 遺伝子の理論的な targeted knockin で、knockin 部分は cre/ERT2 の Cbx1 に由来するプロモーターシーケンスを含んでいる。



References

TIGM gene traps: Hansen GM, et al. 2008. Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Res* 18: 1670-1679. [PubMed ID: 18799693](#)

EUCOMM gene traps: Schnutgen F, et al. 2005. Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *PNAS* 102: 7221-7226. [PubMed ID: 15870191](#)

Velocigene Reporter-Tagged Deletion Alleles: Valenzuela DM, et al. 2003. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 21: 652-659. [PubMed ID: 12730667](#)

Knockout first, reporter-tagged insertion with conditional potential (conditional-ready): Skarnes WC, et al 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474: 337-432. [PubMed ID: 21677750](#)

Overall Review: Bradley A, et al. 2012. The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm Genome* 9-10: 580-586. [PubMed ID: 22968824](#)