

Pax6 は中枢神経系, 眼, 鼻, 膵臓, 脳下垂体の発生に重要な転写因子の一つである. Pax6 は他の転写因子と相互作用することで, 胚発生における複雑な時空間の遺伝子発現を制御していると考えられている. しかし, Pax6 と相互作用する転写因子, またその制御標的となるゲノム配列はわかっている事例が少ない. 本研究は, これらの問題を解明するため, ゼブラフィッシュの内在 Pax6 にタグ配列を導入し, 効率的にクロマチン免疫沈降(ChIP)によって分析することを目指した. 本研究により得られる情報によって Pax6 が関わる疾患機構の解明と再生医療の発展が期待される.

最初に, FLAG, HA, PA, Ty1, V5 のいずれかのタグに加えて HiBiT タグを C 末に付加した Pax6 をコードする mRNA を合成し, ゼブラフィッシュ胚に顕微注入した. 受精後 10 時間において, HiBiT タグを利用して発現を調べたところ, FLAG, PA, Ty1 を付加した Pax6 が確認できた. 続いて, 免疫沈降に使用可能な抗体を探索したところ, FLAG タグ抗体に加えて GeneTex 社 Pax6 抗体が利用可能であることを見いだした. 次に, 先行研究によって Pax6 の標的配列である可能性が指摘されていた *pax6a*, *prox1a*, *sox2*, *tcf7l2*, *tfap2a* 遺伝子の制御配列が ChIP-qPCR の陽性コントロールとして利用可能かを調べた. 受精後 10 時間および 24 時間胚の内在 Pax6 に対して, Pax6 抗体による ChIP-qPCR を行ったところ, これらの制御配列に Pax6 が発生段階に依存して相互作用していることがわかった. また, C 末に FLAG タグを付加した Pax6 は全長より短いポリペプチドが多く発現していたため, N 末に FLAG タグを付加したが, 全長 Pax6 の発現量の増加は見込めなかった. 最後に, C 末および N 末に FLAG タグを付加した Pax6 を発現させた受精後 10 時間の胚を用いて ChIP-qPCR を行ったところ, 内在 Pax6 とは制御配列への作用程度は異なるが, 陽性コントロール配列への結合が見られた.