

## ゼブラフィッシュ母性因子の機能解明へ向けた複合タグのノックイン

1200182 青木 伽奈枝

Knock-in of composite tags to clarify the regulatory functions of maternal factors in zebrafish

Kanae Aoki

受精後の胚では、母性の mRNA やタンパク質が減少し胚自身のゲノムからの転写が増加するという胚性ゲノム活性化が起こるが、この現象の詳細は明らかになっていない。しかし、母性から胚性への移行期間に、胚の細胞の性質は全能性から多能性へと変化していくことから、胚性ゲノム活性化には全能性や多能性に関わる母性因子の働きが重要であると考えられる。ゼブラフィッシュ母性転写因子の中で Pou2 と Sox19b は、マウス初期胚の形成に重要な Oct4 と Sox2 のパラログに相当する。Oct4 と Sox2 は ES 細胞の幹細胞性の維持に中核的な役割を果たすと共に、iPS 細胞を誘導するための山中 4 因子の中の 2 つでもある。本研究は、Pou2 と Sox19b の胚性ゲノム活性化がおこる時期の胚における機能を調べることを目的にしているが、それにはこれらの因子に対する特異的な抗体が欠かせない。しかし、この目的に適した抗体がないため、第一段階の研究としてこれらの遺伝子へ複合タグをノックインすることを目指した。まず、複合タグを付加したタンパク質が安定して発現させるかを確かめるため、タグ付きの pou2 と sox19b の mRNA を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚にインジェクションし、初期胚における発現を調べた。いずれの因子でも N 末にタグを付加した場合より、C 末に付加した方が発現量が高かった。次に、ノックイン部位に二重鎖切断を誘導するための CRISPR の選定を行った。複数の crisprRNA を設計し、切断効率を調べたところ pou2 では CRISPR-Cas9 で効率の高いもの、sox19b では CRISPR-Cas12a で効率の高いものが得られた。今後は、ノックインに必要なドナー ssDNA を調製し、ノックイン系統を樹立するための実験を行う予定である。