

Establishment of tagged *sox3* knock-in lines generated by genome
editing and functional analysis of Sox3 using the composite tags

胚の発生はゲノムから読み出された遺伝情報を基にして進行している。この遺伝情報の読み出しは、転写因子という転写レベルで遺伝子の発現を調節するタンパク質により厳密に制御されている。しかし、未だに機能が十分には解明されていない転写因子が多いため、それぞれの転写因子がどのような役割を持って発生を制御しているかについての研究が現在も行われている。そこで本研究は Sox 転写因子ファミリーの 1 つである Sox3 が発生においてどのような役割を果たしているかを理解するため、タグをゲノム上の *sox3* にノックインし、そのタグを利用した Sox3 タンパク質の解析を行なった。

本研究室の以前の研究で、ゼブラフィッシュの *sox3* 遺伝子に対して CRISPR-Cas9 システムを用いて複合タグ配列をノックインする操作を行い、F1 世代に目的としたノックインアレルを伝えるファウンダーF0 魚を得た。ファウンダーF0 魚と野生型の魚を交配し、得られた胚を飼育することで F1 世代の成魚を得た。F1 魚の遺伝型を調べることで、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚を得た。遺伝型を調べる方法としては、まず健康状態の良い F1 世代のゼブラフィッシュをランダムに選び、その個体の尾鰭を切断して採取後、プロテインアーゼ K 処理を行うことでゲノム DNA を抽出した。タグ配列を挿入した *sox3* 部位の上流と下流に設計したプライマーを用いて PCR を行い、その産物をアガロースゲル電気泳動した。PCR 産物のバンドの長さから遺伝型を同定した。ヘテロ接合型にノックインアレルを持つことがわかった F1 成魚のオスとメスを交配し、得られた胚を飼育し F2 世代の成魚を得、F1 魚同様に遺伝型を同定した。これによりノックインアレルをホモ接合型にもつ成魚を得ることができた。これらをさらに交配し、ノックインアレルをホモ接合型にもつ *sox3* ラインの確立を行なっている。

次に、複合タグがノックインされた Sox3 タンパク質が正常に発現されるのかを調べるために、ノックインした複合タグに含まれている FLAG、PA エピトープタグを利用してウエスタンブロットティングを行なった。野生型の成魚同士、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚同士、ノックインアレルをホモ接合型にもつ成魚同士を交配させて得られた胚を 70~80% エピボリー期まで培養し、それぞれの胚のタンパク質を調製した。抗 Sox3 抗体と抗 FLAG、抗 PA 抗体を使用して、ウエスタンブロットティングを行なったところ、Sox3 に複合タグの分子質量が加わった位置にバンドが見られた。この結果は、ノックインした複合タグは、Sox3 タンパク質の発現に大きな影響を与えていないことを示している。

また、FLAG エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降が特異性が高く行えるのかを調べた。野生型の胚、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ胚、ノックインアレルをホモ接合型にもつ胚を 90% エピボリー胚まで培養後、抗 Sox3 抗体と抗 FLAG 抗体を利用してクロマチン免疫沈降を行った。沈降により得られた DNA を鋳型に用いて、Sox3 転写因子が特異的に結合することが知られているゲノム領域であるポジティブ領域と、結合しないネガティブ領域の両方で q-PCR を行い、回収された DNA 量を定量した。その結果、FLAG タグを利用したクロマチン免疫沈降では、抗 Sox3 抗体を利用したとき比較すると、ネガティブ領域の混入が少ないことが分かった。