

Knock-in of a composite tag into the sox11a gene and its use for Sox11a analysis

胚の発生の進行には、転写因子と呼ばれる遺伝子の発現を厳密に制御する一群のタンパク質が深く関与している。しかし、未だに機能が解明されていない転写因子は多くあり研究が進められている。本研究では、Sox 転写因子ファミリーのグループ C のメンバーである Sox11 に注目し、ゼブラフィッシュの発生においてどのような役割を持つかを解明することを目標とした。ゼブラフィッシュでは、ゲノム重複のため Sox11 のオースログとして *sox11a* と *sox11b* がある。本研究ではゲノム上の *sox11a* に対してタグをノックインし、そのタグを用いて Sox11a タンパク質の解析を行えるようにすることを計画した。この方法を用いることで、Sox11 抗体では Sox11a と Sox11b の両方を検出してしまうという問題を回避し、Sox11a と Sox11b を区別して検出することができる。

タグ配列のゲノム上の *sox11a* へのノックインでは CRISPR-Cas9 システムを使用し、HBH(His-Bio-His)-FLAGx3 複合タグが Sox11a の N 末端に挿入されるようにした。F0 成魚をスクリーニングすることで、生殖細胞にノックインアレルを持つファウンダー魚を得た。ファウンダー魚と野生型魚を交配し、F1 世代の成魚を得た。これらの遺伝型を尾ビレから調製した DNA を用いた PCR によって調べ、ノックインアレルをヘテロ接合型で持つ魚を得た。次に、ノックインアレルをホモ接合型にもつ F2 魚を得ることを計画した。成魚に育てる前に、胚の段階で遺伝型がわかれば、魚の飼育負担がかなり軽減される。そこで、まず胚の遺伝型をなるべく簡便に行える方法を確立することにした。

先行研究で、プロテアーゼを用いて胚の表面から細胞を剥離させることでゲノム DNA を得る方法が報告されていたので、この方法をさらに至適化することにした。この際、プロテアーゼはプロテイナーゼ K、アクチナーゼ E、コラゲナーゼ、トリプシン、パパインの 5 種類を用い、プロテアーゼの種類と濃度が胚の生育と DNA の回収量に与える影響を調べた。胚は受精後 3 日目の孵化してすぐの胚を用いた。プロテイナーゼ K あるいはトリプシンを用いた場合に、DNA がより多く回収されることを示す結果が得られた。トリプシン処理の方法を用いることで、ノックインアレルをヘテロ接合型で持つ F1 魚同士の交配により得られた F2 胚を調べ、ホモ接合型胚を選別することが出来た。これらの多くは成魚まで育ったことから、プロテアーゼ処理がその後の魚の成長に与える影響はほとんどないと考えられる。

次に複合タグがノックインされた Sox11a タンパク質が正常に発現されているか、また複合タグに対する抗体を利用した Sox11a の検出が可能であるかを調べるためにホールマウント免疫染色とウェスタンブロッティングを行った。この際、ノックインした複合タグに含まれる FLAG タグに対する抗体と Sox11a と Sox11b 両方を検出する抗 Sox11 抗体を用いた。抗 FLAG 抗体と抗 Sox11 抗体を用いたホールマウント免疫染色では、両者で中枢神経系に強いシグナルが見られた。抗 FLAG 抗体のものでは、松果体で強いシグナルが見られた一方、中脳ではシグナルが弱くなっていた。また抗 Sox11 抗体では、中脳で強いシグナルが見られた。これらの違いは *in situ* ハイブリダイゼーションの結果と合致していたことから、抗 FLAG 抗体で Sox11a を特異的に検出できることがわかった。ウェスタンブロッティングでは、明瞭なシグナルを得ることが難しかったため、ノックアウト胚を用いた検証を進めている。