

Analysis of zebrafish Pax6a using composite tag knock-in and knock-out lines

Pax6 は、中枢神経系、眼、鼻、腭臓、脳下垂体の発生に重要な進化的に保存された転写因子の一つである。動物の眼や神経系の発生における *pax6* 遺伝子の役割はマウスやショウジョウバエでよく研究されているが、未だ遺伝子発現調節のネットワークの全体像における位置付けは十分ではない。特に、胚の発生過程における他のタンパク質との相互作用やゲノムとの相互作用については十分に分かっていないのが現状である。ゼブラフィッシュは、オーソログとして *pax6a* と *pax6b* を持つ。この二つの遺伝子から作られるタンパク質のアミノ酸配列は酷似していることから、それぞれに特異的な抗体を作成することは難しく、個別のタンパク質機能の解析を難しくしている。この問題を解決するため、CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノム上の *pax6a* に HBH(His-Bio-His)-FLAGx3 複合タグ配列をノックインし、その複合タグを利用することでタンパク質の機能解析を行うことを計画した。

Pax6a タンパク質の解析を行うには、複合タグのノックインアレルをホモ接合型で持つ胚を用いた方がタグを用いた検出が有利になる。ノックインアレルが野生型アレル同様に振る舞うとすれば F2 世代でノックインアレルをホモ接合型で持つオスとメスの成魚を得ることが可能である。実際に、F1 成魚を掛けあわせ得られた胚を生育させて得られた F2 成魚の遺伝型を調べたところ、遺伝型がメンデルの分離比に近いことがわかった。したがって、複合タグのノックインが Pax6a の機能へ与える影響はないと考えられる。さらに、ホールマウント免疫染色を行ったところ、ノックインアレルをホモ接合型で持つ胚に対して抗 FLAG 抗体を用いたものと、野生型の胚に対して抗 Pax6a 抗体を用いたもの (Pax6a/b 両方が染色される) とで比較すると、ノックインアレルを持つゼブラフィッシュではその一部が染色されていることから、Pax6a 特異的に免疫染色が行えることがわかった。

そこで、FLAG タグを利用したクロマチン免疫沈降が特異性高く行えるかを調べた。野生型およびノックインアレルホモ接合型の受精後 28 時間胚を用いてクロマチンを調製し、抗 FLAG 抗体と抗 Pax6 抗体、また陰性コントロールとして正常ウサギ IgG を用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降により得られた DNA を用いて、Pax6a/b 転写因子が特異的に結合することが知られている 3 遺伝子のゲノム領域 (ポジティブ領域) と、結合しないネガティブ領域の 4 つをターゲットにして qPCR を行い、回収された DNA 量を定量した。野生型胚とノックインアレルホモ接合型胚に対して抗 FLAG 抗体を用いた場合を比較すると、ノックインアレルホモ接合型胚ではポジティブ領域の回収率がネガティブ領域より高かったことから、抗 FLAG 抗体を用いることで特異的な免疫沈降が行えていると考えられる。一方、野生型胚に対して抗 Pax6 抗体あるいは正常ウサギ IgG を用いた場合を比較すると、抗 Pax6 抗体を用いた場合にポジティブ領域の回収率がネガティブ領域より高くなったが、正常ウサギ IgG においてもこの傾向が見られたため、抗 Pax6 抗体の免疫沈降の特異性は必ずしも高くはないと考えられた。

また、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集によって生じた indel により遺伝子の機能が失われるノックアウトが引き起こされている可能性のあるアレルに関して、ノックアウトが起きているか調べている。