

卒業論文要旨

ノックイン解析に向けたゼブラフィッシュ胚における Sox2 および Pax6b タンパク質のタグ検出系の評価

土尻 大騎

Taiki Dojiri

Evaluation of tag-based detection systems for Sox2 and Pax6b proteins toward zebrafish knock-in analysis

ニワトリ胚において Pax6 は、Sox2 などの SoxB1 因子と協調して δ -crystallin エンハンサーを活性化するとともに、他の遺伝子へも働きかけレンズプラコードの形成を誘導すると考えられている。ゼブラフィッシュでは Pax6 に相当する遺伝子として pax6a と pax6b の二つのパラログが存在し、本研究では眼発生への寄与が大きいと考えられる Pax6b と、その協調因子である Sox2 に注目した。将来的に sox2 および pax6b 内在性遺伝子へのタグノックイン解析を行うためには、ゼブラフィッシュ胚において安定に検出可能なタグおよび検出手法を事前に評価することが重要である。そこで本研究ではその前段階として、複数のエピトープタグおよび共通タグとして HiBiT タグを付加した Sox2 mRNA を調製し、ゼブラフィッシュ胚へ顕微注入を行った。顕微注入後の胚からタンパク質を抽出し、Westernblotting および HiBiT blotting により発現量および検出感度を比較した。その結果、すべてのタグで特異的なバンドが検出されたが、OLLAS および ALFA タグでは発現量が低く、FLAG、Myc、PA、Ty1 タグでは比較的高い発現が得られた。さらに、N 末端および C 末端にタグを付加した Pax6b についても発現および検出性を比較した結果、N 末端付加がより安定した検出に適していることが示唆された。