

2023 年度 修士論文

複合タグノックインラインとノックアウトラインを
利用したゼブラフィッシュ Pax6a の解析

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

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻 生命科学コース
分子発生制御学研究室

漆原 舞

指導教員
蒲池 雄介 教授

目次

要旨	3
第1章 序論	5
第2章 結果	7
ノックインラインの確立	7
FLAG タグを用いたホールマウント免疫染色	9
FLAG タグを用いたクロマチン免疫沈降	11
ノックアウトラインの確立	13
抗 Pax6 抗体を用いたホールマウント免疫染色	15
第3章 考察	16
第4章 材料と方法	18
ノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング	18
fin-clip	18
ノックアウトアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング	19
ホールマウント免疫染色	19
ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型を同定する PCR	20
クロマチン免疫沈降	20
ChIP-qPCR	21
本研究で用いたプライマー	23
謝辞	24
参考文献	25

要旨

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、*Pax6* のオーソログとして *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 抗体は非特異的な回収が多いと考えられる。

また、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集によって生じた insertion 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、これまで生育させていた F2 成魚の遺伝型を調べた。その結果、insertion アレルをホモ接合型

で持つ魚も生存していることが分かった。そこで insertion アレルを持つ胚に対してホルマウント免疫染色を行ったところ、Pax6a 特異的な発現が見られる間脳に染色があまり見られなかったことから、Pax6a タンパク質は発現されていない可能性が高いと考えられる。

第1章 序論

Pax6 は転写因子で、眼の発生におけるマスター制御遺伝子として知られている (Gehring, 1996)。また、中枢神経系や鼻、膵臓、脳下垂体などの発生にも関与している (Walther & Gruss, 1991)。ヒトにおいては、*PAX6* 遺伝子の変異は小眼球症や無虹彩症などの眼の発生異常を引き起こすことが示されている (Brown, 1998) (Tzoulaki et al., 2005)。

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づけは十分には分かっていない。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分かっていないことが残っているのが現状である。

ゼブラフィッシュを含む硬骨魚類は、脊椎動物誕生後のさらなる全ゲノム重複の結果、多くの遺伝子で 2 つのオーソログを持つことが知られている。オーソログの最も可能性の高い運命は機能の喪失であるが、サブ機能や新機能が生じる可能性もある (Richardson et al., 2017)。

Pax6 もその 1 つで、ゼブラフィッシュは *Pax6* のオーソログとして *pax6a* と *pax6b* を持つ。この 2 つの遺伝子から作られるタンパク質のアミノ酸配列は非常に類似していることから、*Pax6* タンパク質を検出するために現在利用な抗体は Pax6a、Pax6b のどちらも検出するため研究を困難にしている。この問題を回避する 1 つの方法は、ゲノム上の *pax6a* にタグ配列をノックインすることで、Pax6a に付加されたタグを利用して Pax6a を研究することである。この方法により Pax6a の検出やクロマチン免疫沈降などのタンパク質機能の解析が容易になることが期待できるため、*pax6a* に対しタグのノックインが当研究室で行われた。

これまでに当研究室では、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術における相同組換え型修復によって、FLAG の 3 量体を含む複合タグ (His-Bio-His-FLAGx3 [HBH-FLAGx3]) をコードする配列を野生型のゼブラフィッシュの *pax6a* の開始コドンの前にノックイン (図 1) するための操作を行い (Ranawakage et al., 2021)、正確なノックインが生殖細胞系列で起こったファウンダー F0 魚を得た。正しくノックインができるとスプライシングを経て、N 末に複合タグがつく Pax6a をコードする mRNA (図 2) が予想される。さらに、このファウンダー F0 魚と野生型の成魚をかけ合わせ得た F1 魚を飼育していた。

本研究では、*Pax6* タンパク質の機能解析を容易にするために複合タグのノックインアレルをホモ接合型で持つゼブラフィッシュを得た。F0 から F1、F2 世代へとノックインアレルが伝達され、ノックインラインとして確立を行った。

また、ノックインライン作製の過程で得た insertion1 アレルを持つゼブラフィッシュについても insertion により Pax6a のノックアウトが起きている可能性があるため、ノックアウトラインの確立を試みた。

そして、複合タグノックインラインとノックアウトラインを利用してホールマウント免疫染色を行い、Pax6a タンパク質の発現について調べた。また、ノックインラインに関してはクロマチン免疫沈降とそれに引き続く定量的 PCR (ChIP-qPCR) を行い、FLAG タグを利用したクロマチン免疫沈降の特異性について調べた。その結果、FLAG 3 量体を含む

複合タグのノックインアレルを持つゼブラフィッシュを対象に、抗 FLAG 抗体を用いることで Pax6a の発現を調べることが可能だということが分かった。また、insertion1 アレルを持つゼブラフィッシュでは、Pax6a タンパク質は発現されていない可能性が高いということが分かった。

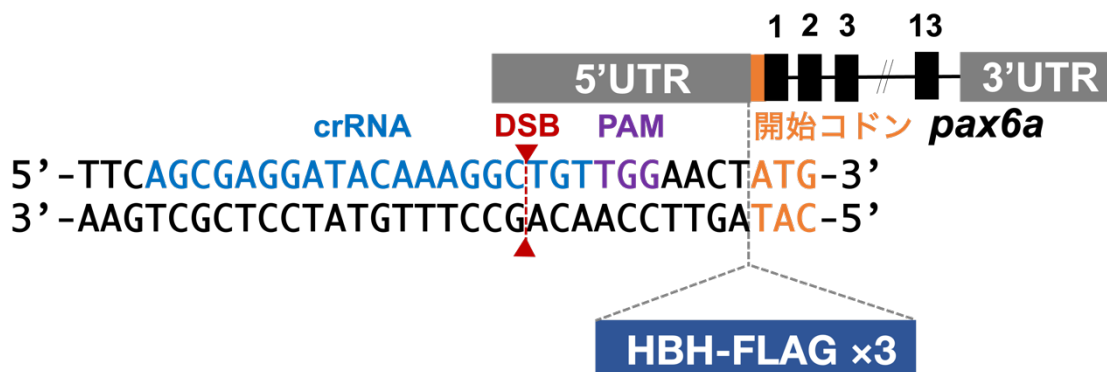


図 1. CRISPR-Cas9 システムによる複合タグのノックイン



図 2. ノックインアレル mRNA

第2章 結果

ノックインラインの確立

複合タグ(His-Bio-His-FLAGx3)(Ranawakage et al., 2021)を利用して Pax6a タンパク質の解析を行うためには、そのノックイン(KI)アレルをホモ接合型で持つゼブラフィッシュが有用であるため、F0 から F1、さらに F2 世代へとノックインアレルが伝達され、ノックインラインとして確立する必要がある。

まず初めに、これまで本研究室で飼育していたノックインアレルヘテロ接合型 F1 同士をかけ合わせ得た F2 胚を成魚になるまで飼育した。これらの遺伝型を調べるため、尾びれを切断し、その DNA の抽出を行った。ノックインアレルは複合タグ配列分 210 bp の挿入があるため、PCR でその違いが検出できるようにプライマーを設定した。PCR を行ったあと、アガロースゲル電気泳動によってバンドを検出することで F2 魚のアレルの遺伝型を調べた(図 3)。その結果、遺伝型を調べた 56 匹中 9 匹、つまり 16.1%がノックインアレルをホモ接合型で持つことが分かった(図 4, 表 1)。このように、メンデルの分離比に近い割合で魚が存在することから、ノックインアレルをホモ接合型で持つ魚は生存可能ということが分かった。よって、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。

この結果をもとに、ノックインアレルをホモ接合型で持つゼブラフィッシュを選別し、全てのゼブラフィッシュがノックインアレルをホモ接合型で持つ F3 魚を得るため、F2 同士をかけ合わせた魚を成魚になるまで飼育している。

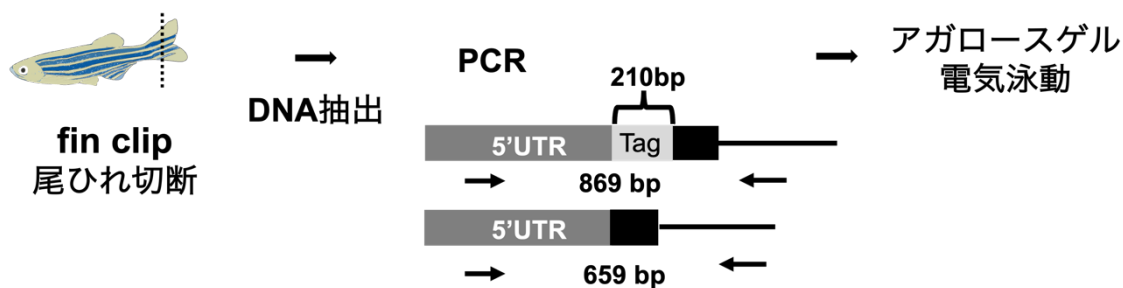


図 3. ノックインアレルを持つ F2 魚のスクリーニング

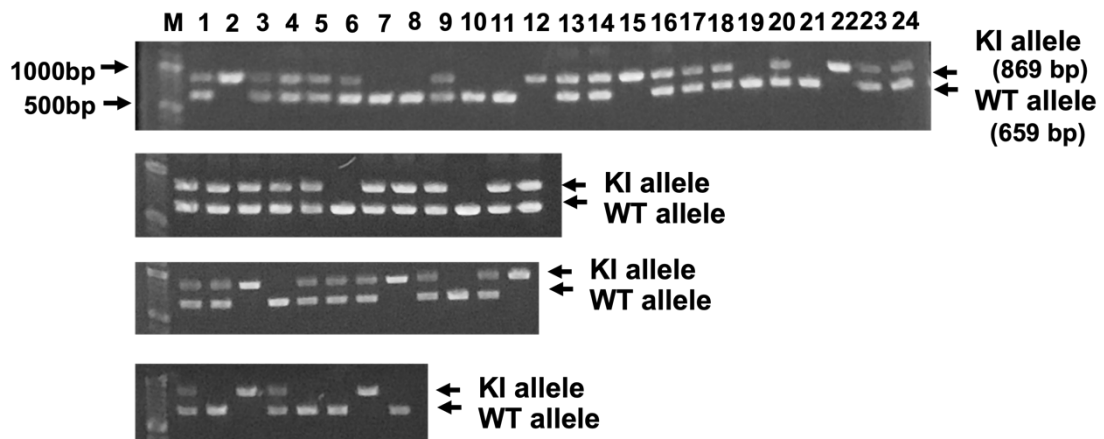


図 4. ノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング結果
 ノックインアレルは 869bp、野生型アレルは 659bp にバンドが現れるため、バンド上側のみのサンプルはノックインアレルホモ接合型、バンドが 2 つのサンプルはノックインアレルヘテロ接合型、バンド下側のみのサンプルは野生型である。

KI / KI	KI / WT	WT / WT
16.1%(9/56)	58.9%(33/56)	25%(14/56)

表 1. ノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュの生存割合
 メンデルの分離比に近い割合で生存していることが分かった。

FLAG タグを用いたホルマウント免疫染色

FLAG タグを用いて Pax6a タンパク質を検出できるのか調べるため、ノックインアレルヘテロ接合型 F2 同士をかけ合わせ得られた F3 胚、および野生型同士をかけ合わせ得られた胚について、受精後 24~25 時間の時点で固定し、ホルマウント免疫染色を行った。また、ホルマウント免疫染色を行った胚から DNA の抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動を行い、サンプルの遺伝型を調べた。

ノックインアレルホモ接合型胚では、Pax6a 特異的な発現が見られる後脳のところに明瞭な染色が見られた(図 5)。ノックインアレルヘテロ接合型胚では、ノックインアレルホモ接合型胚と同じように後脳に染色が見られ、野生型胚では全く染色されていないことが分かった。したがって、FLAG タグを含む複合タグのノックインアレルを持つ魚に対して抗 FLAG 抗体を用いることで特異的な免疫染色が行えることが分かった。

また、野生型胚に対して抗 Pax6 抗体を用いた染色(図 6)と比較すると、野生型胚では後脳や脊髄のところが全体的に染色されているのに対し、ノックインアレルホモ接合型胚に対して抗 FLAG 抗体を用いて染色したものは Pax6a 特異的な染色がされていた。

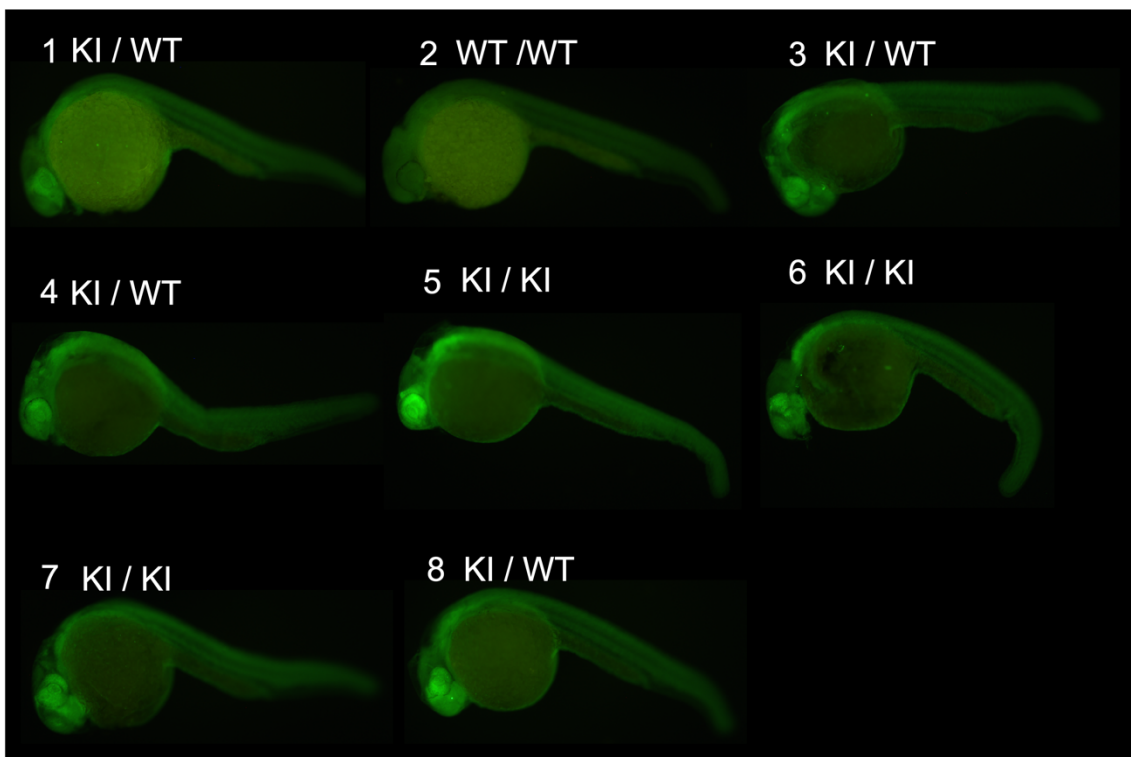


図 5. ノックインアレルを持つゼブラフィッシュ胚に対して抗 FLAG 抗体を用いてホルマウント免疫染色を行った結果

ノックインアレルホモ接合型胚とノックインアレルヘテロ接合型胚では眼と Pax6a 特異的な後脳に染色が見られる。野生型では全く染色されていない。

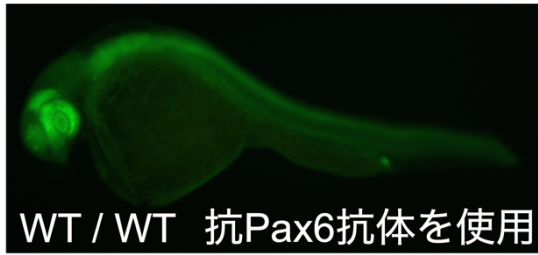


図 6. 野生型胚に対して抗 Pax6 抗体を用いてホールマウント免疫染色を行った結果
眼や後脳、脊髄など Pax6a、Pax6b で発現する場所が全体的に染色されている。

FLAG タグを用いたクロマチン免疫沈降

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るため、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た。そして、抗 FLAG 抗体と抗 Pax6 抗体、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い、qPCR で回収された DNA 量を定量化した。

抗 FLAG 抗体を用いて特異性高く回収が行えるかを調べるために、ノックインアレルホモ接合型胚と野生型に対して抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降をおこなった。同時に、Pax6a、Pax6b どちらも検出する抗 Pax6 抗体を用いた回収を調べるために、野生型に対して抗 Pax6 抗体と陰性コントロールとして正常ウサギ IgG を使用した。

免疫沈降により得られた DNA を用いて、Pax6 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)である *sox2-N3*、*prox1a*、*tcf7l2* (Inoue et al., 2007)(Coutinho et al., 2011)と結合しないネガティブ領域である *bactin2* の 4 つをターゲットにして qPCR を行い、回収された DNA 量を定量化した。

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、野生型ではネガティブ領域とポジティブ領域で回収率に差がないのに対し、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(図 7A)。

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 抗体を用いた方ではポジティブ領域の回収率がネガティブ領域より高く、正常ウサギ IgG でも同じ傾向が見られた(図 7B)。

したがって、複合タグのノックインアレルを持つ胚に対して抗 FLAG 抗体を用いることで、特異的な免疫沈降が行えるということが分かった。しかし、回収率が高いとは言えないためさらなる改良が必要だと考えられる。また、抗 Pax6 抗体を用いた免疫沈降は非特異的な回収が多く、実際に特異的に回収できている割合は少ないと考えられる。よって、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降は非特異的な回収が少ないのが利点の一つである。

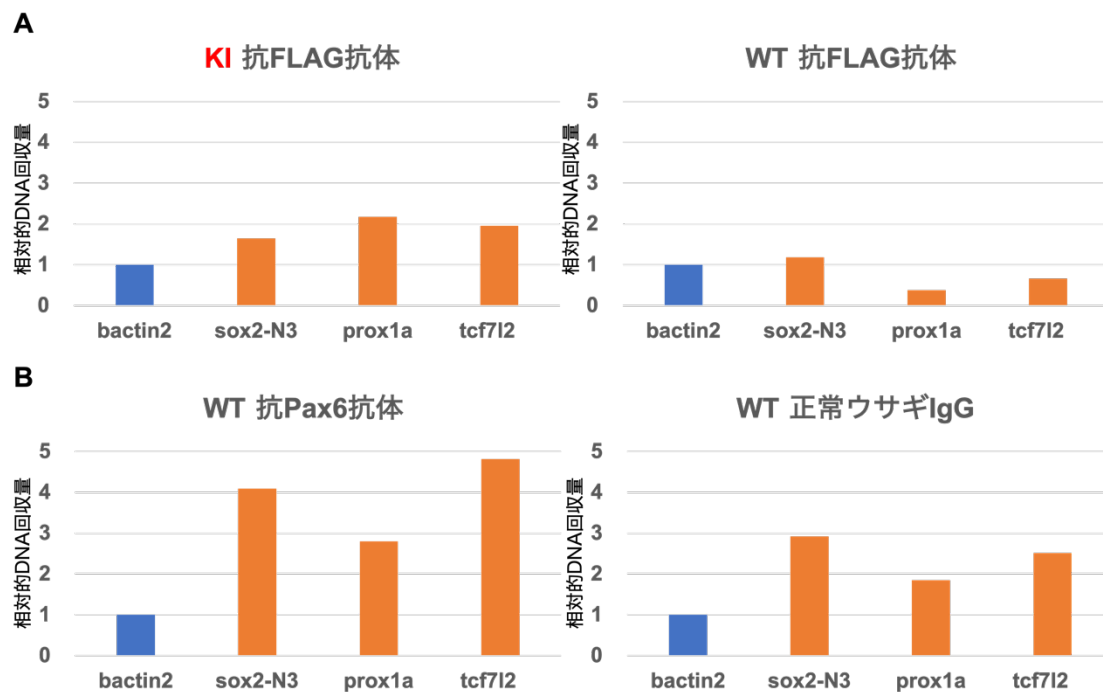


図 7. ChIP-qPCR の結果

青色のグラフバーがネガティブ領域の回収率、オレンジ色のグラフバーがポジティブ領域の回収率を示している。

A. ノックインアレルホモ接合型胚と野生型胚に対して抗 FLAG 抗体を使用

野生型胚ではネガティブ領域とポジティブ領域で回収率に差がない。ノックインアレルホモ接合型胚ではネガティブ領域に対しポジティブ領域の回収率が高くなっている。

B. 野生型胚に対して抗 Pax6 抗体、正常ウサギ IgG を使用

抗 Pax6 抗体を使用した場合ではネガティブ領域に対しポジティブ領域の回収率が高くなっている。また、正常ウサギ IgG でも同じ傾向が見られた。

ノックアウトラインの確立

これまでの研究で Pax6a の機能が失われるノックアウト (KO) が起きている可能性のある insertion1 (In1) アレル (図 8) を持つ F1 ゼブラフィッシュを得て、F2 魚として飼育していた。そこで、F2 魚の遺伝型を調べるために尾びれを切断し、DNA の抽出を行った。insertion1 アレルは 23 bp の挿入があるため、PCR でその違いが検出できるようにプライマーを設定した。PCR を行ったあと、アガロースゲル電気泳動によってバンドを検出することで F2 魚の遺伝型を調べた (図 9, 図 10)。その結果、遺伝型を調べた 24 匹中 8 匹、つまり 33.3% がノックアウトアレルをホモ接合型で持つことが分かった (表 2)。したがって、insertion1 アレルをホモ接合型で持つ魚は生存可能ということが分かった。insertion1 アレルホモ接合型胚も外見上の異常なく正常に発生する理由の 1 つとして、*pax6a* がノックアウトされることにより、*pax6b* による補償的な発現が起きている可能性がある。

この結果をもとに、ノックアウトアレルをホモ接合型で持つ F2 魚とノックアウトアレルをヘテロ接合型で持つ F2 魚をかけ合わせた F3 魚を成魚になるまで飼育している。かけ合わせを行う時点でノックアウトアレルをホモ接合型で持つ F2 魚がオスのみだったため、メスはノックアウトアレルをヘテロ接合型で持つ F2 魚を使用した。遺伝型を調べ、その後交配に用いた成魚には、ノックアウトアレルをホモ接合型で持つメスはいなかったが、遺伝型を調べていない成魚を含む全体の中でホモ接合型メス魚がいたかどうかは定かではない。

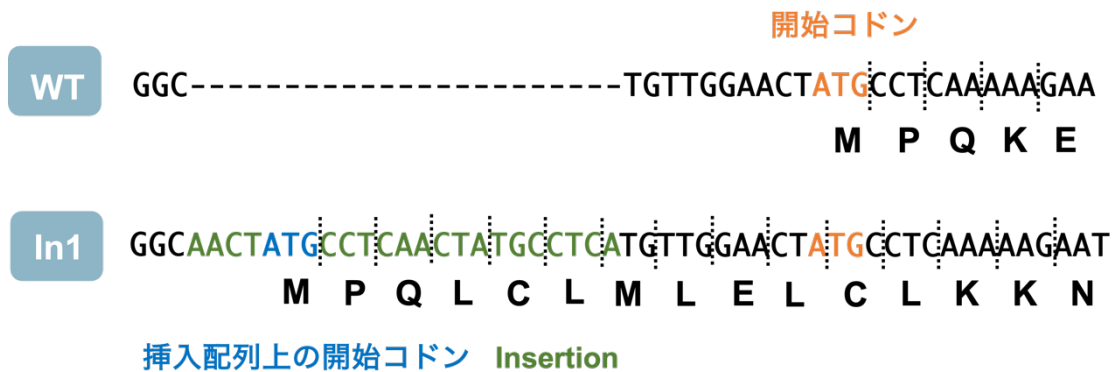


図 8. 野生型アレルと insertion1 アレルの配列

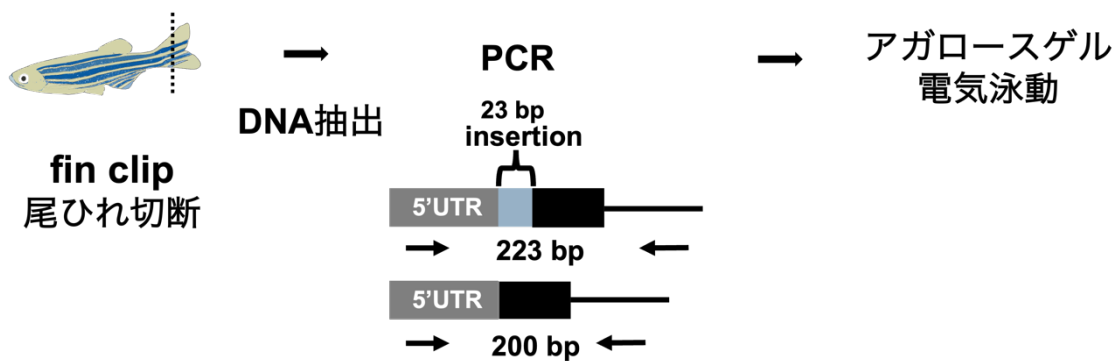


図9. ノックアウトアレルを持つ F2 魚のスクリーニング

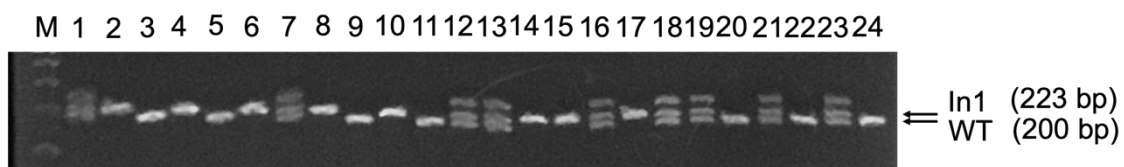


図10. ノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング結果

insertion1 アレルは 223bp、野生型アレルは 200bp にバンドが現れるため、矢印で示したバンドが上側のみに出ているサンプルは insertion1 アレルホモ接合型、矢印で示したバンドが2つ出ているサンプルは insertion1 アレルヘテロ接合型、矢印で示したバンドが下側のみに出ているサンプルは野生型である。

In1/In1	In1 / WT	WT / WT
33.3%(8/24)	37.5%(9/24)	29.2%(7/24)

表2. ノックアウトアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュの生存割合

抗 Pax6 抗体を用いたホルマウント免疫染色

insertion1 アレルを持つゼブラフィッシュに Pax6a のノックアウトが起きているかを調べるために、抗 Pax6 抗体を用いたホルマウント免疫染色を行った。insertion1 アレルヘテロ接合型 F2 同士をかけ合わせ得られた受精後 24~25 時間の F3 胚、および同じ発生ステージの野生型胚を固定し、ホルマウント免疫染色を行った。また、ホルマウント免疫染色を行った胚から DNA の抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動を行い、サンプルの遺伝型を調べた。

野生型、insertion1 アレルヘテロ接合型胚では Pax6a 特異的な染色が見られる間脳が染色されているが insertion1 アレルホモ接合型胚では染色があまりされていないように見える。したがって、insertion1 アレルからは Pax6a タンパク質は発現されていない可能性が高いと考えられる。しかし、同じく Pax6a 特異的な染色が見られる後脳は遺伝型に関わらず染色のシグナルが下がっていないように見える。そのため、ノックアウトができていても Pax6b による補償的な発現によってシグナルがあまり下がっていない可能性があると考えられる。

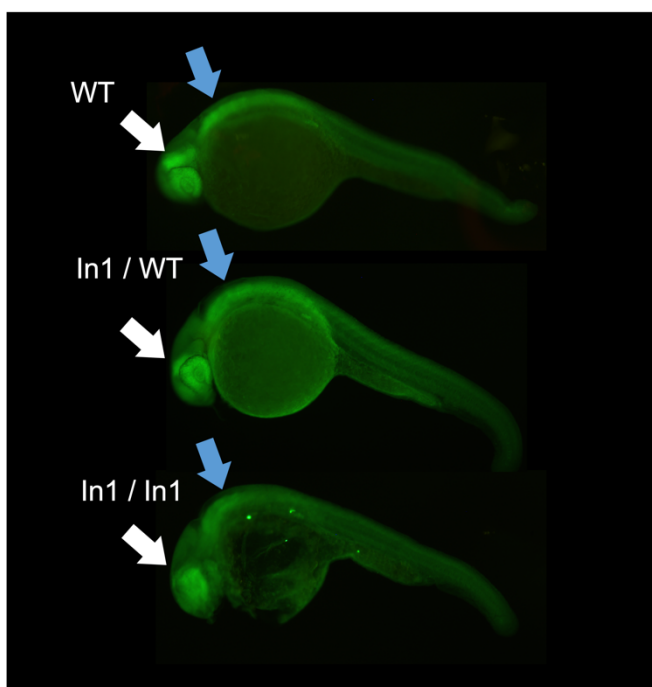


図 11. ノックアウトアレルを持つゼブラフィッシュ胚に対して抗 Pax6 抗体を用いてホルマウント免疫染色を行った結果

白色の矢印は間脳を、青色の矢印は後脳を示している。

insertion1 アレルホモ接合型では他の遺伝型と異なり間脳の染色があまりされていないように見えるが、後脳はいずれの遺伝型でも染色が見られる。

第3章 考察

HBH(His-Bio-His)-FLAGx3 複合タグ配列(ノックインアレル)を持つゼブラフィッシュ

ノックインアレルをヘテロ接合型で持つ F1 魚同士の交配で得られた F2 世代のスクリーニング結果から、メンデルの分離比に近い割合で各遺伝型の魚が存在することから、ノックインアレルをホモ接合型で持つ魚は生存可能ということが分かった。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。また、ホールマウント免疫染色では、ノックインアレルを持つ魚に対して抗 FLAG 抗体を用いることで Pax6a が特異的に発現する後脳(Thisse et al., 2001)が染色されていた。このことから、FLAG タグを含む複合タグのノックインアレルを持つ魚に対して抗 FLAG 抗体を用いることで、特異的な免疫染色が行えることが分かった。さらに、ノックインアレルホモ接合型胚と野生型胚から調製したクロマチンに対して抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降では、野生型胚ではネガティブ領域とポジティブ領域で回収率に差がないのに対し、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。よって、複合タグのノックインアレルを持つ魚に対して抗 FLAG 抗体を用いることで特異的な免疫沈降が行えると考えられる。しかし、ポジティブ領域の回収率が高いとは言えないためさらなる改良が必要だと考えられる。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した際に、両者で同じような傾向が見られたため、抗 Pax6 抗体を用いた免疫沈降は非特異的な回収が多く、実際に特異的に回収できている割合は少ないと考えられる。その点を踏まえると抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降は非特異的な回収が少ないのが利点の一つである。

以上のように、HBH(His-Bio-His)-FLAGx3 複合タグ配列(ノックインアレル)を持つゼブラフィッシュを用いることで、特異的な抗体の作製が難しいタンパク質の解析が容易になることが分かった。引き続きこのノックインアレルを持つゼブラフィッシュを用いて、解析を行うことで Pax6a の理解を深めることができると期待される。また、同様に Pax6b に別の複合タグ配列を付加し、Pax6b について調べることも可能であると考えられる。

insertion1 配列(ノックアウトアレル)を持つゼブラフィッシュ

ノックアウトアレルを持つ F2 世代のスクリーニング結果から、insertion1 アレルをホモ接合型で持つ魚は生存可能ということが分かった。また、ホールマウント免疫染色では Pax6a 特異的に発現する間脳(Thisse et al., 2001)が野生型胚と insertion1 アレルヘテロ接合型胚では染色されているのに対し、insertion1 アレルのホモ接合型胚ではあまり染色されていないように見える。よって、insertion1 アレルからは正常な Pax6a タンパク質は発現されていない可能性が高いと考えられる。しかし、間脳の他に Pax6a 特異的に発現する後脳では染色のシグナルがあまり下がっていないため、ノックアウトができていても Pax6b による補償的な発現によってシグナルがあまり下がっていない可能性があると考えられる。したがって、そのような理由で insertion1 アレルホモ接合型胚も問題なく正常に発生するのではないかと考えられる。この結果と一致して、*pax6a* に大きな欠失を導入したアレルを利用した先行研究においても、胚性突然変異体(zygotic mutant)では変異の影響

が現れず、母性胚性変異体 (maternal-zygotic mutant)でのみ眼に表現型が現れることが報告されている (Takamiya et al., 2020)。そのため、今後ノックアウトアレルをホモ接合型で持つゼブラフィッシュを用いて、ホルマウント免疫染色やウェスタンブロッティングを行うことでノックアウトアレルにさらについて調べる必要がある。

第4章 材料と方法

ノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング

これまでの研究で、CRISPR-Cas9 システムの相同組換え型修復によって His-Bio-His-FLAGx3 の複合タグ配列をゼブラフィッシュの *pax6a* 遺伝子の開始コドンの前にノックインを行い、正確にノックインされたアレルを持つファウンダーF0 魚が得られ、F1 成魚、F2 胚へとアレルの伝達が行われることが分かっていた。そこで、F2 成魚の遺伝型を調べるために、尾びれを切断し (fin-clip)、この組織から DNA を抽出した。PCR はノックインアレルと野生型アレルを判別するために、上流ではプライマー *pax6a_start_seq_F2*、下流ではプライマー *pax6a_start_seq_R2* を用いた。

PCR は

94°C 30 秒	} 30 サイクル
94°C 15 秒 変性	
60°C 30 秒 アニーリング.	
68°C 45 秒 伸長 (1 分/kb)	
68°C 5 分	
16°C 保持	

の条件で行った。

この PCR 産物を電気泳動することにより、F2 魚が持つアレルを決定した。

Name	Volume
DW	14.2 μ l
5x One Taq Buffer	6.0 μ l
2.5 mM dNTPs	2.4 μ l
Primer F (100 μ M)	0.12 μ l
Primer R (100 μ M)	0.12 μ l
6x sucrose red	5.0 μ l
One Taq	0.15 μ l
Template	2.0 μ l

表 3. 尾びれから抽出した DNA の遺伝型を固定するための PCR の反応液の組成

fin-clip

麻酔用の容器に 1L システムの水を入れ、500 μ l の 10% clove oil を加え麻酔溶液を作る。魚を 1 匹ずつ麻酔溶液に入れ、麻酔を効かせる。麻酔が効いた頃にゼブラフィッシュの尾びれをハサミで切断し、チューブに入れた。尾びれ入りのチューブに DNA 抽出 buffer (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8), 10mM EDTA, 1% Triton X-100, 200 μ g/ml Proteinase K) を 100 μ l ずつ加えた。その後ボルテックスにかけ 55°C インキュベーターへ

入れ、尾びれが溶けるまで 10 分おきにボルテックスにかけた。3 時間ほど待ち、完全に尾びれが溶けていることを確認した。その後、Proteinase K を失活させるため 90°C 10 分で熱処理した。

ノックアウトアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニング

Pax6a の機能が失われるノックアウト(KO)が起きている可能性のある insertion1(In1)アレルを持つ F1 ゼブラフィッシュを得て、F2 魚として飼育していた。そこで、F2 魚の遺伝型を調べるために尾びれを切断(fin-clip)し、DNA を抽出した。PCR は insertion1 アレルと野生型アレルを判別するために、上流ではプライマー pax6a_start_HMA_F、下流ではプライマー pax6a_start_HMA_R を用いた。PCR の条件と反応液の組成はノックインアレルを持つ F2 ゼブラフィッシュのスクリーニングと同じである。この PCR 産物を電気泳動することにより、F2 魚が持つアレルを決定した。

ホルマウント免疫染色

受精後 24~25 時間胚を用いた。35 mm 培養皿に胚を移し、水気をできるだけ取り除いた。2 mg/ml Pronase /embryo medium を 2.5 ml 加え、10 分程静置した。殻が壊れ始めたら、embryo medium を 1 ml 加え、ポリピペットで軽くピペッティングして殻を外した。そして、embryo medium を 6 ml 入れておいた 60 mm 培養皿に水気を持ち込まないように胚を移した。embryo medium で 2 回液を替え洗浄し、シリコンコーティングチューブに胚を移した。水分をできるだけ取り除き、4 % PFA(パラホルムアルデヒド)/PBS 固定液を 2 ml 加え、4°C下で 4 時間、ローテーターで回転させた。

その後、PBST で 5 分の洗浄を 3 回行い、25% MeOH/PBS、50% MeOH/PBS、75% MeOH/PBS、100% MeOH の順に 5 分ずつ振とうした後、新しい 100% MeOH に入れ替えて冷凍庫に保存した。次に、100% MeOH、75% MeOH/PBS、50% MeOH/PBS、25% MeOH/PBS、PBSTx3 の順で 5 分振とうした後、液を取り除いた。150 mM Tris-HCl (pH9.0)を入れ、70°C 15 分でインキュベートした後、液を取り除き、次に 150 mM Tris-HCl (pH9.0)を入れ、室温で 5 分振とう後、液を取り除いた。PBST で 5 分の振とうで 2 回洗浄し、よく冷やした純水で 5 分の氷上インキュベートを液替えし 2 回行った。-20°C で冷やしておいたアセトンを入れ、-20°C で 20 分のインキュベートした後、液を取り除いた。その後、再びよく冷やした純水で 5 分の氷上インキュベートを液替えし 2 回行った。PBST で 5 分の振とうで 2 回洗浄し、10 % Normal Goat Serum/PBT で胚を浸し、4°C で緩やかに 3 時間振とうした。胚をチューブから 24 ウェルプレートに移した。

ノックインアレルを持つ胚のサンプルには抗 FLAG 抗体 (018-22381、Wako) を 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml の濃度で含む一次抗体希釈液を、野生型とノックアウトアレルを持つ胚のサンプルには抗 Pax6 抗体 (901301、Biolegend) を 2.5 μ g/ml の濃度で含む一次抗体希釈液を使用した。4°C で緩やかに振とうしながら二晩反応させた。PBT で 1 時間の振とうによる洗浄を 5 回行った。抗 FLAG 抗体を反応させた胚のサンプルには anti-mouse IgG Alexa488 を 4 μ g/ml の濃度で含む二次抗体希釈液を、抗 Pax6 抗体を反応させ

た胚のサンプルには anti-rabbit IgG Alexa488 を 4 μ g/ml の濃度で含む二次抗体希釈液を使用した。アルミホイルで遮光し、4°Cで緩やかに振とうしながら一晩反応させた。PBT で 10 分の振とうによる洗浄を 5 回行った。蛍光顕微鏡で確認し、バックグラウンドが高い場合には PBT による洗浄を追加で行った。4% PFA/PBS を入れ 20 分の振とうを行い、PBT で 5 分の振とうを 3 回行った。PBST を入れ、遮光して 4°Cで保管した。

蛍光観察のために 25% Glycerol/PBS、50% Glycerol/PBS、75% Glycerol/PBS の順に 20 分ずつ振とうした。アガロースコートをした 35 mm 培養皿上で胚を固定して蛍光顕微鏡による撮影を行った。

ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型を同定する PCR

DNA extraction buffer に 20 mg/ml Proteinase K を 0.2 mg/ml の濃度になるように加え、DNA 抽出に用いた。ホールマウント免疫染色のサンプルの胚 1 つをチューブに入れたところに、DNA extraction buffer を 20 μ l 加えた後、55°Cで 3 時間インキュベートを行った。その後、90°Cで 12 分のインキュベートを行い、Proteinase K を失活させ、テンプレートとして使用した。プライマーはノックインアレルを持つサンプルは pax6a_start_seq_F2、pax6a_start_seq_R2 を、insertion アレルを持つサンプルは pax6a_start_HMA_F、pax6a_start_HMA_R を用いた。PCR の反応液の組成は、表 4 に示した。

PCR は

98°C 10 秒	} 30 サイクル
60°C 5 秒	
68°C 5 秒	
68°C 30 秒	
4°C 保持	

の条件で行った。

Name	Volume
DW	10.7 μ l
2x KOD One PCR Master Mix	15.0 μ l
Primer F (100 μ M)	0.15 μ l
Primer R (100 μ M)	0.15 μ l
Template	4.0 μ l

表 4. ホールマウント免疫染色胚から抽出した DNA の遺伝型を固定するための PCR 反応液の組成

クロマチン免疫沈降

ノックインアレルをホモ接合型で持つゼブラフィッシュ同士をかけ合わせ得た胚と野生型同士をかけ合わせ得た胚を受精後 28 時間まで培養した。embryo medium に 20 mg/ml Pronase を 2 mg/ml の濃度になるように加え、殻を取るために用いた。60 mm 培養皿に胚

を移し、飼育水をできるだけ取り除き、2 mg/ml Pronase in embryo medium を入れた。軽く揺らし、殻にヒビが入るまで 10 分程静置した。embryo medium をさらに 5 ml 加え、水流を作り殻を壊した。embryo medium が 10 ml 入った 60 mm 培養皿を用意しておき、そこに胚を移した。壊れた殻を取り除きながら embryo medium の液替えを 2 回程行った。胚を 2 ml シリコンコーティングチューブに移し、水分を取り除き、1% Formaldehyde Solution in Embryo Medium を固定液として 1 ml 加えた。15 分間ローテーターで回転させた。2.5 M Glycine を 50 μ l 加え、5 分ローテーターで回転させた。チューブ内の液体を取り除き、冷やした PBS を 1 ml 入れて 3 回洗浄を行った。PBS をできる限り取り除き、-80°C の冷凍庫で保管した。今回は、マウス由来のモノクローナル抗体である抗 FLAG 抗体 (IE6, Wako) の捕捉には抗 mouse IgG、ウサギ由来のポリクローナル抗体である抗 Pax6 抗体 (Biolegend) の捕捉には抗 rabbit IgG のビーズを使用した。チューブにビーズを 15 μ l 入れ、磁石を利用して上澄み液を取り除いた。0.5% BSA/PBS を 60 μ l 加えた。ビーズを含むこの溶液に抗 FLAG 抗体、抗 Pax6 抗体、normal rabbit IgG を加えて、4°C のコールドルームでローテーターを利用し回転させた。固定した胚が入っているチューブに Cell Lysis Buffer を 0.2 ml/100 embryo 加え、ピペティングし胚の形を崩した。終了後、氷上で 15 分置いた。胚と溶液をチューブにピペットマンで移し、冷やしておいた遠心機で 3500 rpm、4°C、5 分の遠心を行った。上澄み液を取り除いた。ペレットができていないチューブに Nuclei Lysis Buffer (0.25% SDS) を 130 μ l 入れ、ピペティングし氷上で 10 分置いた。次に DNA Shearing システム M220 (Covaris) を用いて 7°C で 5 分間超音波処理を行った。終了後、Nuclei Lysis Buffer (0.25% SDS) の 1.5 倍量の ChIP Dilution Buffer for 0.25% SDS Nuclei Lysis Buffer を加えた。13500 rpm、4°C、10 分で遠心し、チューブに上澄み液を移し、氷上に置いた。4°C で回転させていたビーズ入りのチューブ中の溶液を 0.5% BSA/PBS で 2 回液替えを磁石を用いながら行った。液を取り除き、0.5% BSA/PBS を 10 μ l 加えた。ピペティングし、それぞれの胚のサンプルにビーズ入りの溶液を全て加えた。4°C でローテーターで回転させた。抗体-ビーズ複合体を含んだ溶液を上澄みを取り除いた。この上澄み液を新しいチューブに移し、氷上に置いた。上澄みを取り除いた後の磁気ビーズを氷で冷やした RIPA buffer/Triton で 4 回洗浄後、TBS を加え新しいチューブに移し、TBS を取り除き、さらに上澄みを取り除いた。このチューブには ChIP elution buffer を 200 μ l、5M NaCl を 8.4 μ l 入れた。先程新しいチューブに移した上澄み液はその内 15 μ l を input control とし、ChIP elution buffer を 185 μ l、5M NaCl を 8.4 μ l 加えた。どちらも 65°C で 6 時間脱架橋処理をした。溶出した DNA と input control を RNaseA で処理、proteinase K で処理を行ったあと、DNA を精製した。精製には、ChIP DNA Binding Buffer (Zymo Research)、と Monarch PCR DNA Cleanup Kit (NEW ENGLAND Biolabs) のカラム、チューブ、Wash Buffer を組み合わせて使用した。DNA の溶出は、最終濃度が 1 embryo 相当量/ μ l になるように行った。

ChIP-qPCR

クロマチン免疫沈降によって回収し精製した DNA は、ポジティブ領域、ネガティブ領域

域の両方で 1 embryo 相当量を用いた。また、定量のための% input の検量線には input control から精製した DNA を使用し、2~0.0002%までの 5 段階の 10 倍希釈を用いた。各ウェルに対してプライマーをフォワードとリバースがそれぞれ 200 nM になるように加え、qPCR ミックスには、HOT FIRE pol Solis Green qPCR Mix(Solis BioDyne)を使用した。qPCR 反応には LightCycler96(Roche)を用いて行い、サイクル数は 40 で、各サイクルは初期変性が 95°Cで 10 分、変性が 95°Cで 10 秒、アニーリングが 62°Cで 20 秒、伸長反応が 72°Cで 20 秒である。

それぞれの相対的 DNA 回収量(相対値)の計算は表 5 の回収率の絶対値を用いて行った。ネガティブ領域(bactin2)の回収率を 1 として相対値を求め、それを元に回収率の比較を行った。

Sample Name	Gene Name	回収率の絶対値	相対値
WT FLAG	bactin2	0.003941	1.000000
WT FLAG	sox2-N3	0.004653	1.180665
WT FLAG	prox1a	0.001471	0.373256
WT FLAG	tcf7l2	0.002592	0.657701
KI FLAG	bactin2	0.086450	1.000000
KI FLAG	sox2-N3	0.141900	1.641411
KI FLAG	prox1a	0.187700	2.171197
KI FLAG	tcf7l2	0.168600	1.950260
WT pax6	bactin2	0.007940	1.000000
WT pax6	sox2-N3	0.032450	4.086902
WT pax6	prox1a	0.022190	2.794710
WT pax6	tcf7l2	0.038200	4.811083
WT controllgG	bactin2	0.027770	1.000000
WT controllgG	sox2-N3	0.080950	2.915016
WT controllgG	prox1a	0.051190	1.843356
WT controllgG	tcf7l2	0.069790	2.513144

表 5. ChIP-qPCR の回収率

本研究で用いたプライマー

Name	Sequence(5' to 3')		
pax6a_start_seq	F2, CAGAGGTCAGGCTCAGCTAATCG	R2,	AGGCAAAGAGGCTCCG
pax6a_start_HMA	F, CCACCCGAGATCAGTTGGAAAC	R,	TCAACTAGACTTCGGGGCATATTG
sox2 enhancer N-3	F2, TCACACTTAATTACGGAGGATGAGG	R1,	CAGACTGCTCACTGGGGAATG
prox1a ECR	F1, ATCCGTCTCTTCTGCAAGCC	R1,	CAGACTGCTCACTGGGGAATG
pcf712 ECR	F1, CACAAATTTGACACCTCCGATGC	R1/2,	AACGGAGAATGTGCTGACTTACC
bactin2	F4, TATGGCTAGAGCCGGGTATGTG	R4,	CGTGTGGAGGAGCTCAAAGTG

表 6. プライマーリスト

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官の蒲池教授には実験や修士論文など様々な面でご指導ご鞭撻をいただきました。厚く御礼申し上げます。

また、研究室の皆さんには多方面で助けていただきました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- Brown, A. (1998). The Human PAX6 Mutation Database. *Nucleic Acids Research*, *26*(1), 259–264. <https://doi.org/10.1093/nar/26.1.259>
- Coutinho, P., Pavlou, S., Bhatia, S., Chalmers, K. J., Kleinjan, D. A., & Van Heyningen, V. (2011). Discovery and assessment of conserved Pax6 target genes and enhancers. *Genome Research*, *21*(8), 1349–1359. <https://doi.org/10.1101/gr.124115.111>
- Gehring, W. J. (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes to Cells*, *1*(1), 11–15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.11011.x>
- Inoue, M., Kamachi, Y., Matsunami, H., Imada, K., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2007). PAX6 and SOX2 - dependent regulation of the *Sox2* enhancer N - 3 involved in embryonic visual system development. *Genes to Cells*, *12*(9), 1049–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01114.x>
- Ranawakage, D. C., Okada, K., Sugio, K., Kawaguchi, Y., Kuninobu-Bonkohara, Y., Takada, T., & Kamachi, Y. (2021). Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Knock-In of Composite Tags in Zebrafish Using Long ssDNA as a Donor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 598634. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598634>
- Richardson, R., Tracey-White, D., Webster, A., & Moosajee, M. (2017). The zebrafish eye—A paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*, *31*(1), 68–86. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.198>
- Takamiya, M., Stegmaier, J., Kobitski, A. Y., Schott, B., Weger, B. D., Margariti, D., Cereceda Delgado, A. R., Gourain, V., Scherr, T., Yang, L., Sorge, S., Otte, J. C., Hartmann, V., Van Wezel, J., Stotzka, R., Reinhard, T., Schlunck, G., Dickmeis, T., Rastegar, S., ... Strähle, U. (2020). Pax6 organizes the anterior eye segment by guiding two distinct neural crest waves. *PLOS Genetics*, *16*(6), e1008774. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008774>
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degraeve, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X. Q., & Thisse, C. (2001). *Expression of the zebrafish genome during embryogenesis*.

Tzoulaki, I., White, I. M., & Hanson, I. M. (2005). PAX6 mutations: Genotype-phenotype correlations. *BMC Genetics*, *6*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-27>

Walther, C., & Gruss, P. (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, *113*(4), 1435–1449.
<https://doi.org/10.1242/dev.113.4.1435>