

2021 年度 修士論文

ゲノム編集によりタグがノックインされた

sox3 ラインの確立と

複合タグを利用した Sox3 の機能解析

Establishment of tagged *sox3* knock-in lines generated

by genome editing and functional analysis of Sox3

using the composite tags

高知工科大学 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

川口 雄也

指導教員

蒲池 雄介 教授

目次

第1章 要旨	- 1 -
第2章 序論	- 2 -
第3章 結果	- 2 -
第4章 考察	- 16 -
第5章 材料と方法	- 18 -
第6章 謝辞	- 27 -
第7章 参考文献	- 28 -

第1章 要旨

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、プロテイナーゼ 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。

第2章 序論

生命科学の研究において、特定のタンパク質の機能を調べる際に、目的のタンパク質に対して高い特異性と親和性をもつ優れた抗体を利用して局在や発現量を調べる方法は非常に有用である。しかし、目的のタンパク質に対して高い特異性と親和性を持つ抗体を常に準備することは難しい。優れた抗体を準備できない場合、目的のタンパク質に抗原となるエピトープタグを付加する手法を用いることで、エピトープタグ抗体を利用した目的のタンパク質の検出、解析が可能になる (Brizzard, 2008)。

胚の発生はゲノムから読み出された遺伝情報を元に進行する。この遺伝情報の読み出しは、転写レベルにおいては、転写因子というタンパク質がゲノムからの遺伝子の発現を厳密に制御している。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。転写因子の役割を解明するためには、*in vivo* における転写因子とゲノム DNA の相互作用を調べるのが重要になる。転写因子とゲノム DNA の相互作用を調べる手段としてクロマチン免疫沈降法がある (Spencer et al., 2003; Kidder et al., 2011)。クロマチン免疫沈降法の場合でも、解析に対して十分な性能をもつ抗体が利用できない転写因子に対しても、エピトープタグを付加させることで、検出や解析が可能になる (Savic et al., 2015)。

本研究室の以前の研究で、ゼブラフィッシュにおける働きが比較的理解されている Sox3 転写因子 (Okuda et al., 2010) を使用して、クロマチン免疫沈降法におけるエピトープタグの至適化を行った。この研究では、エピトープタグの FLAG タグ (Einhauer et al., 2001; Hopp et al., 1988)、PA タグ (Fujii et al., 2014) の三量体を利用することが検討された。また、ゼブラフィッシュの *sox3* 遺伝子に対して CRISPR-Cas9 システム (Mail et al., 2013) を用いて、5'側と 3'側のホモロジーアームの長さを変えた長鎖一本鎖 DNA をドナーとし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 魚を効率的に得ることに成功した (Ranawakage et al., 2021; 図 1; 表 1)。複合タグ配列としては、3 量体 FLAG エピトープタグに Bio タグと HiBiT タグを連結したもの、3 量体 PA エピトープタグに Bio タグと HiBiT タグを連結したものが用いられた (Ranawakage et al., 2019)。

以上の研究を基盤として本研究では、Sox 転写因子ファミリーの 1 つである Sox3 が発生にどのような役割を果たしているかをさらに理解するために、複合タグがノックインされた *sox3* ラインの確立と複合タグを利用した Sox3 タンパク質の解析を行った。複合タグがノックインされた *sox3* ラインの確立では、目的のノックインアレルをもつ F1 成魚をスクリーニングで同定し、それらを交配させることでノックインアレルをホモ接合型にもつ F2 魚を得ることができた。Sox3 タンパク質の解析では、F1 または F2 の成魚を利用して次世代の胚を得て、ウエスタンブロットティング、ホールマウント免疫染色、HiBiT ブロットティングを行ない、Sox3 タンパク質の発現を調べた。また、クロマチン免疫沈降

法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法の特異性について調べた。

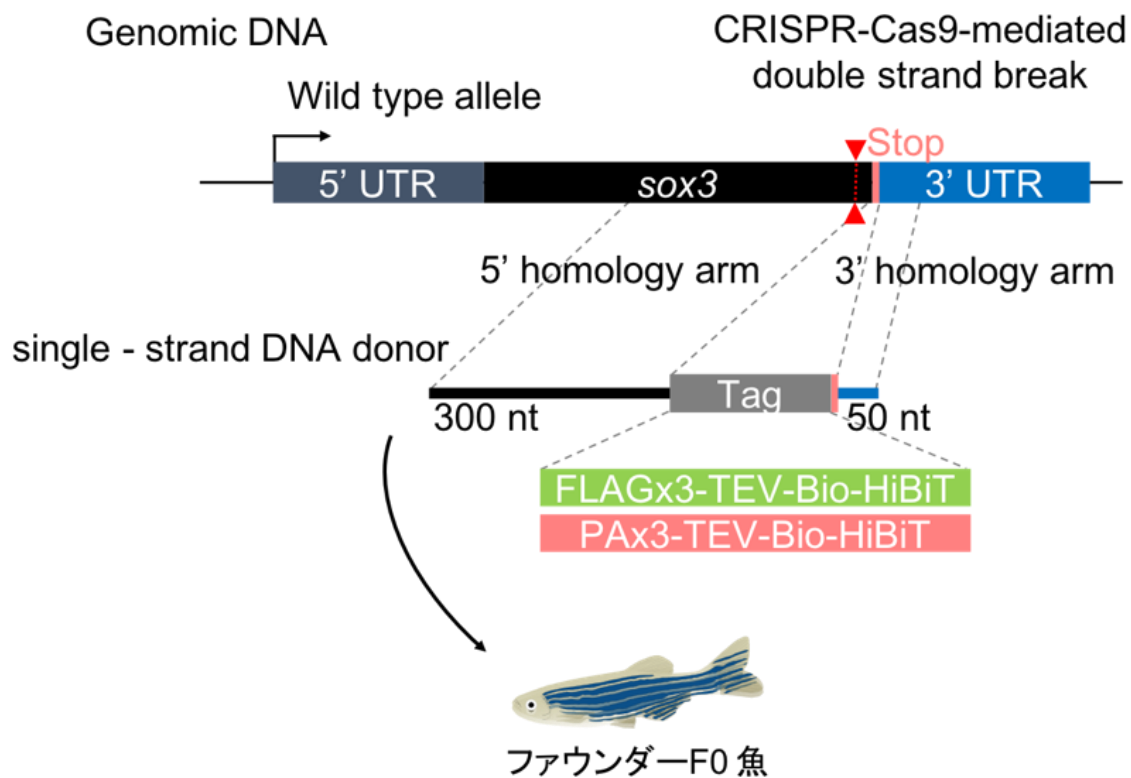


図 1. CRISPR-Cas9 システムによる複合タグのノックイン

表 1. ノックインされた *sox3* アレルの生殖系列細胞への伝達

5'側のホモロジーアームの長さを 300 nt に固定、3'側のホモロジーアームの長さを 300 nt、50 nt に変化させ、ゼブラフィッシュの *sox3* 遺伝子に対して CRISPR-Cas9 システムで複合タグをコードする配列をノックインした際に生殖系列細胞においてノックインが起こった割合を示す。Number of germline transmitted fish (F0 founders)では、次世代の F1 胚で PCR によってノックインを同定した F0 の個体数を示し、F0 founders with correct integration の Rate ではそのうちサンガーシーケンスにより複合タグが正しくノックインされていることが分かった F0 個体数を示している。

Tag- 3' homology arm length	Number of fish screened	Number of germline transmitted fish (F0 founders)	Rate of germline transmission	F0 founders with correct integration		Number of F1 embryos with correct integration
				Rate	ID #	
FLAGx3-300	37	7	19% (7/37)	3%(1/37)	#9	16% (8/50)
FLAGx3-50	28	8	29% (8/28)	21%(6/28)	#9	N.D.
					#16	85% (17/20)
					#19	5% (1/20)
					#20	N.D.
					#21	N.D.
					#22	10% (2/20)
PAX3-300	30	5	17% (5/30)	3%(1/30)	#7	N.D.
PAX3-50	47	10	21% (10/47)	6%(3/47)	#21	55% (11/20)
					#25	N.D.
					#34	N.D.

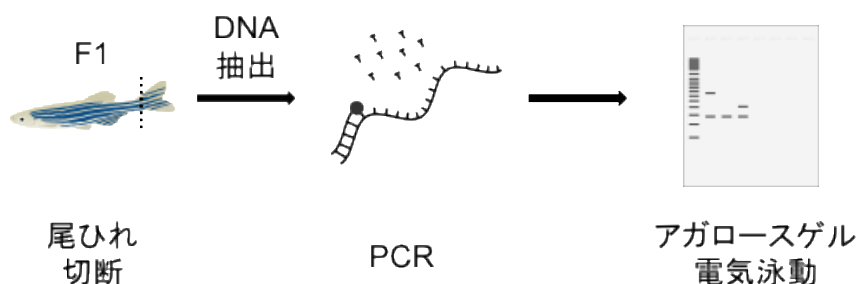
(N.D. Not determined)

第3章 結果

ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ F1 魚のスクリーニング

本研究室の以前の研究で、F0 世代の成魚と野生型の成魚を交配し、生殖系列細胞に正しくノックインアレルが伝達される確率が高いことが確認された FLAG # 16、PA # 21 の F0 ファウンダー魚が得られている(Ranawakage et al., 2021; 表 1)。本研究では、FLAG # 16、PA # 21 を F0 ファウンダー魚として使用した。ファウンダーF0 魚の FLAG # 16、PA # 21 と野生型の成魚を交配させて得られた胚を飼育することで F1 世代の成魚を得た。F1 世代の成魚でノックインアレルをヘテロ接合型にもつ個体を選別するためにスクリーニングを行った。スクリーニングの方法としては、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、プロテイナーゼ K 処理を行うことでゲノム DNA を抽出した。複合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。(図 2)。このプライマーペアを使用した場合、FLAG タグを含む複合タグがノックインされたアレルに由来する PCR 産物の長さは 895 nt、PA タグを含む複合タグがノックインされたアレルに由来する PCR 産物の長さは 934 nt、一方野生型アレルの場合の PCR 産物の長さは 691 nt である (図 2)。

A 手順



B プライマーの設定

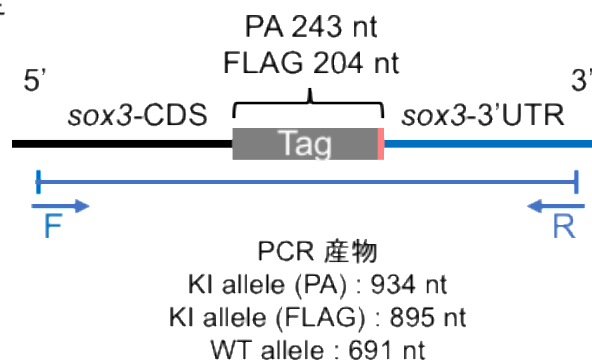


図 2. F1 魚のスクリーニング

- A. F1 世代のノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚を選別するためのスクリーニング手順
- B. スクリーニングの PCR のプライマーの設定

スクリーニングの PCR の電気泳動では、FLAG x 3 タグ配列をもつファウンダー由来の F1 魚の場合は、ノックインアレルに由来するバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 2 種類が見られた。一方、PA x 3 タグをもつファウンダー由来の F1 魚の場合は、ノックインアレルに由来するバンド、不正確なノックインに由来すると考えられるバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 3 種類が見られた (図 3)。スクリーニングの結果から F1 世代の体細胞の遺伝型が同定できたことから、F0 世代の生殖系列細胞の遺伝型は、FLAG x 3 タグ配列をもつ F0 魚ではノックインアレルをもつホモ接合型が大部分であり、PA x 3 タグ配列をもつ F0 魚ではノックインアレルをもつホモ接合型、ノックインアレルをもつヘテロ接合型、不正確なノックインをもつヘテロ接合型、不正確なノックインアレルとノックインアレルをもつ遺伝型のいずれか複数が混在していると推測される (図 3)。

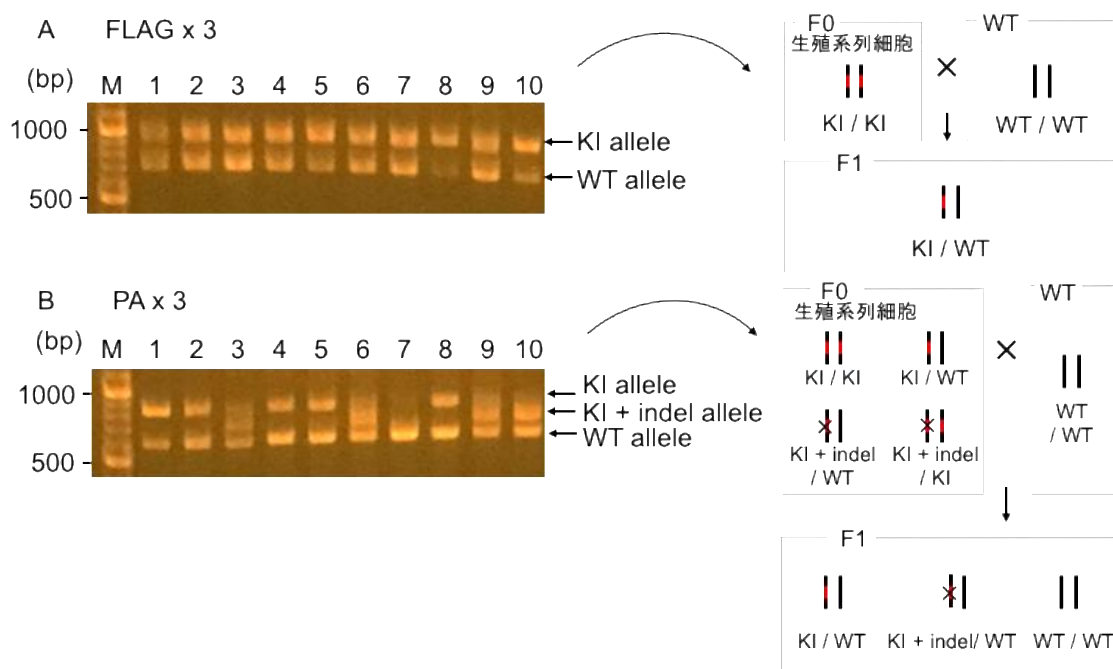


図 3. F1 世代のスクリーニング結果

A. FLAG x 3 タグ配列をもつファウンダー由来の F1 魚の PCR 産物の電気泳動によるスクリーニングの結果と F1 世代の遺伝型から推測される F0 世代の生殖系列細胞の遺伝型

B. PA x 3 タグ配列をもつファウンダー由来の F1 魚の PCR 産物の電気泳動によるスクリーニングの結果と F1 世代の遺伝型から推測される F0 世代の生殖系列細胞の遺伝型

F1 魚から F2 魚へのノックインアレルの伝達

ノックインアレルをホモ接合型にもつ F2 魚のスクリーニング

目的のノックインアレルをヘテロ接合型にもつ F1 世代の成魚を得ることができたので、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚同士を交配させて F2 胚を得た。F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達を調べるため、得た F2 胚の一部をプロテイナーゼ K 処理を行うことでゲノム DNA を抽出し、複合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 (図 4)。残りの胚は F2 世代として成魚まで飼育し、スクリーニングを行なった。スクリーニングの方法は、まず健康状態の良い F2 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、プロテイナーゼ K 処理を行うことでゲノム DNA を抽出した。複合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 (図 4)。

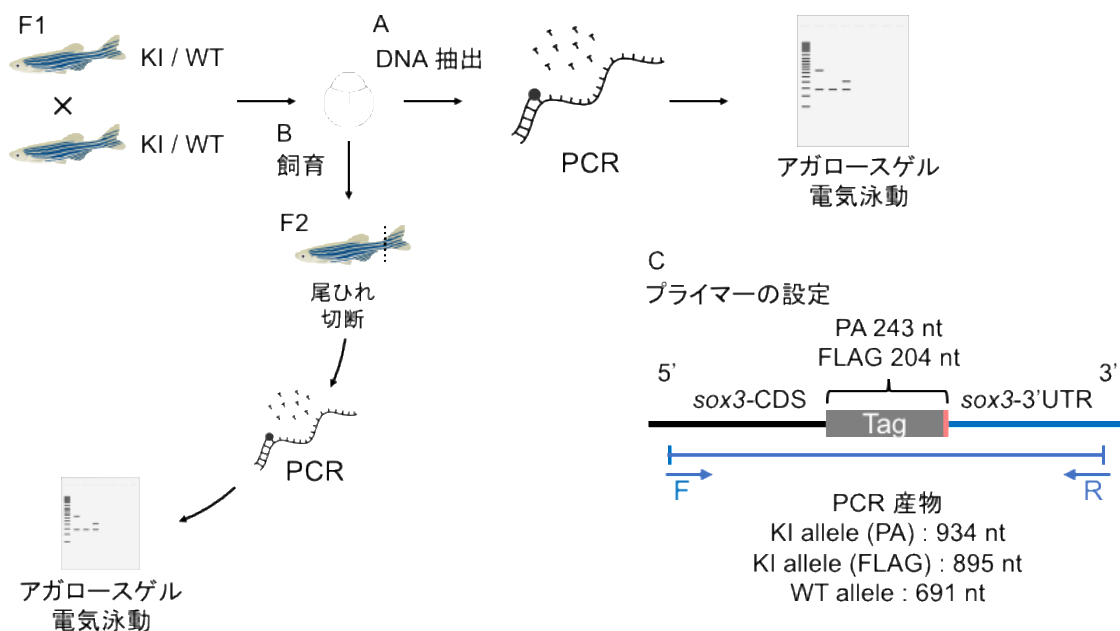


図 4. F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達の調査と F2 世代のスクリーニング

A. F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達の調査の手順

B. F2 世代のスクリーニングの手順

C. F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達の調査・F2 世代のスクリーニングの PCR のプライマーの設定

胚を利用した F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達を調べた PCR の電気泳動では、FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚の場合は、ノックインアレルに由来するバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 2 種類が見られ、同様に PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚の場合でも、ノックインアレルに由来するバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 2 種類が見られた (図 5)。FLAG x 3 タグ配列をもつノックインアレルの F1 世代から F2 世代への伝達は、ノックインアレルをホモ接合型にもつ割合は 25%、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ割合は 58.3%、野生型のアレルをホモ接合型にもつ割合は 16.7%であった (表 2)。一方、PA x 3 タグ配列をもつノックインアレルの F1 世代から F2 世代への伝達は、ノックインアレルをホモ接合型にもつ割合は 16.7%、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ割合は 50%、野生型のアレルをホモ接合型にもつ割合は 33.3%であった (表 2)。これより、FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚から F2 世代へのノックインアレルの伝達は、メンデルの法則に近い割合だった。一方、PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚から F2 世代へのノックインアレルの伝達は、メンデルの法則と比較した場合にノックインアレルをホモ接合型にもつ割合が低い傾向が見られた。また、複合タグはタグの繰り返し配列を含むため、複合タグが挿入されているアレルが正確に伝達されていることをサンガーシーケンスで調べたところ、配列に変化がないことが分かった。

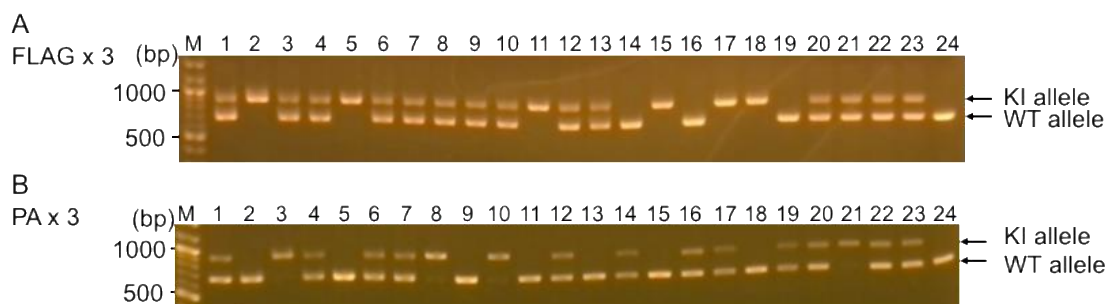


図 5. F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達

A. FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のノックインアレルの伝達を調べる PCR の電気泳動の結果

B. PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のノックインアレルの伝達を調べる PCR の電気泳動の結果

表 2. F1 世代から F2 世代へのノックインアレル伝達の割合(胚)

	KI / KI	KI / WT	WT / WT
FLAG	25%(6/24)	58.3%(14/24)	16.7%(4/24)
PA	16.7%(4/24)	50%(12/24)	33.3%(8/24)

F2 世代の成魚をスクリーニングした PCR の電気泳動では、FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の F2 魚の場合は、ノックインアレルに由来するバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 2 種類が見られ、同様に PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の F2 魚の場合でも、ノックインアレルに由来するバンド、野生型のアレルに由来するバンドの 2 種類が見られた (図 6)。FLAG x 3 タグ配列をもつノックインアレルの F1 世代から F2 世代への伝達は、ノックインアレルをホモ接合型にもつ割合は 21.6%、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ割合は 52.9%、野生型のアレルをホモ接合型にもつ割合は 25.5%であった (表 3)。PA x 3 タグ配列をもつノックインアレルの F1 世代から F2 世代への伝達は、ノックインアレルをホモ接合型にもつ割合は 10.4%、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ割合は 66.7%、野生型のアレルをホモ接合型にもつ割合は 22.9%であった (表 3)。これより、FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚から F2 世代へのノックインアレルの伝達は、メンデルの法則に近い割合であり、一方、PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚から F2 世代へのノックインアレルの伝達は、メンデルの法則と比較した場合にノックインアレルをホモ接合型にもつ割合が低い傾向が見られた。これは、胚を利用した F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達を調べた際と同じ傾向であった。

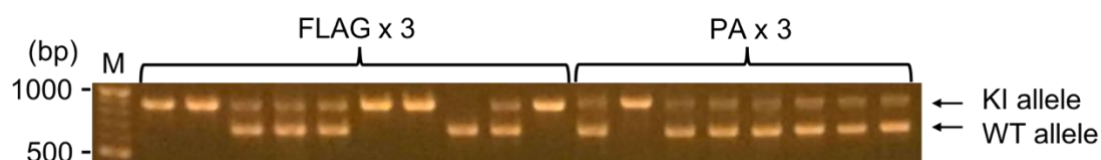


図 6. F2 世代のスクリーニング結果

表 3. F1 世代から F2 世代へのノックインアレル伝達の割合(尾鰭)

	KI / KI	KI / WT	WT / WT
FLAG	21.6%(11/51)	52.9%(27/51)	25.5%(13/51)
PA	10.4%(5/48)	66.7%(32/48)	22.9%(11/48)

F2 世代のスクリーニングにより、目的の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。目的の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、得た胚を飼育することで、ノックインアレルをホモ接合型にもつ *sox3* ノックインラインを確立した。

Sox3 タンパク質の発現の解析

ノックインアレルをヘテロまたはホモ接合型にもつ成魚を利用して、次世代の胚における Sox3 タンパク質の発現を調べた。本研究では複合タグに含まれている FLAG タグまたは PA タグを利用したウエスタンブロッティングとホールマウント免疫染色を行うとともに、HiBiT タグを利用した HiBiT ブロッティングも行なった。

ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングでは、野生型の成魚同士、F2 世代のノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚同士、F2 世代の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。調製したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、以下の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。野生型の成魚の交配から得た胚由来のサンプル、ノックインアレルをヘテロまたはホモ接合型にもつ成魚の交配から得た胚由来のサンプルに対して、抗 Sox3 抗体、および抗 PA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体のいずれかを組み合わせて用いた。

PA x 3 タグ配列を含む複合タグを付加させた Sox3 タンパク質、FLAG x 3 タグ配列を含む Sox3 タンパク質の分子質量を CLC Main Workbench 7 を利用して計算すると、PA タグが付加された Sox3 タンパク質の分子質量は 41.9 kDa、FLAG タグが付加された Sox3 タンパク質の分子質量は 41.3 kDa、Sox3 タンパク質の分子質量は 33.4 kDa となり、分子質量から想定される位置にバンドを検出することができた (図 7, 8)。

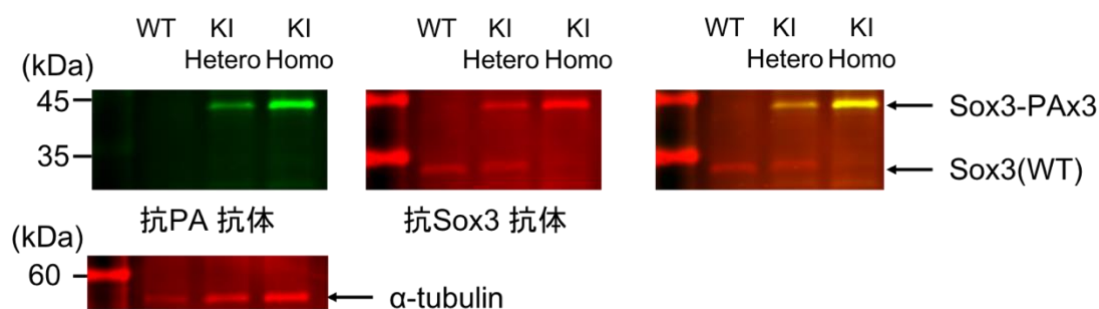


図 7. PA タグを利用したウエスタンブロッティング
 α -tubulin はローディングコントロールとして使用した。

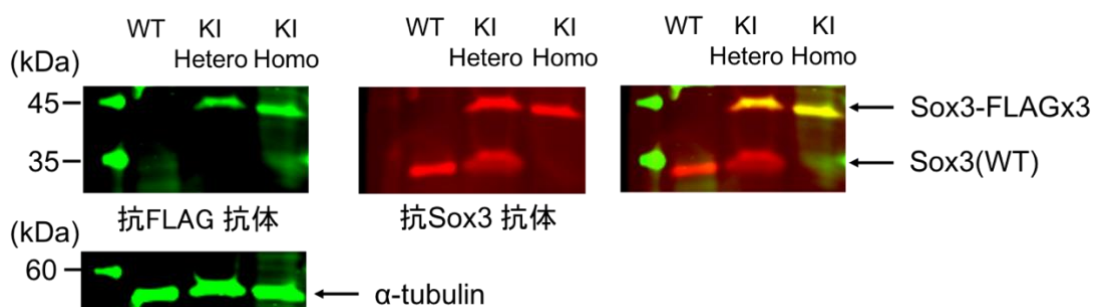


図 8. FLAG タグを利用したウエスタンブロッティング
 α -tubulin はローディングコントロールとして使用した。

ホールマウント免疫染色

ホールマウント免疫染色では、野生型の成魚同士、F1 世代のノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚同士を交配させて得た胚を 24 時間培養した後に固定、ブロッキングを行い、以下の抗体を用いてホールマウント免疫染色を行なった。一次、二次抗体反応において、野生型の胚のサンプルには抗 Sox3 抗体、複合タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のサンプルには抗 FLAG 抗体あるいは抗 PA 抗体を用いた。

野生型の胚に抗 Sox3 抗体を用いたサンプルと複合タグ配列をもつ F1 魚由来の胚に抗 FLAG 抗体、抗 PA 抗体を用いたサンプルでの蛍光を比較すると、どちらも中枢神経系に Sox3 タンパク質の発現を検出できた (図 9)。

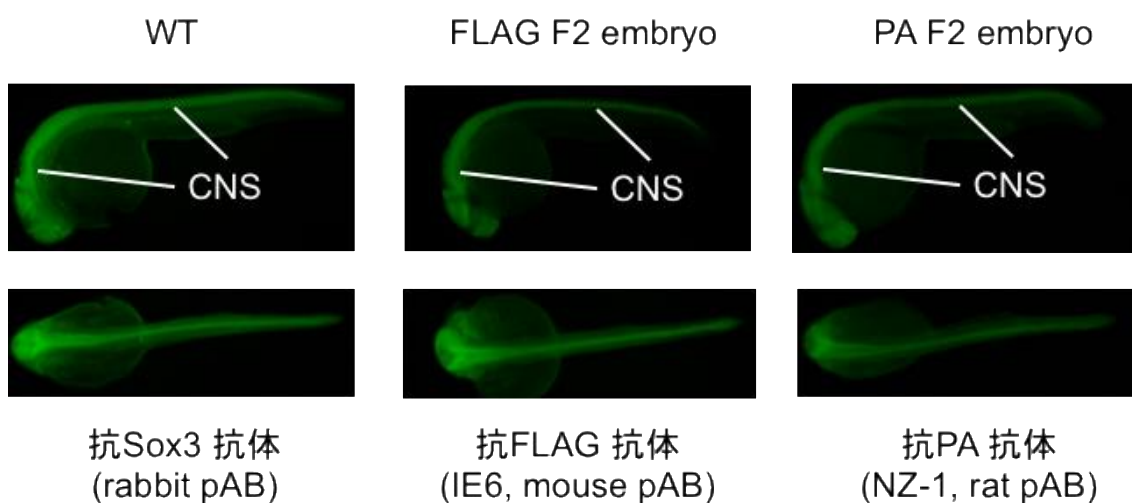


図 9. エピトープタグを利用したホールマウント免疫染色

蛍光観察後、撮影した胚のサンプルの遺伝型を同定するために、複合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 (図 2B)。

ホールマウント免疫染色の胚のサンプルの遺伝型を同定する PCR の電気泳動では、野生型の胚のサンプルでは、野生型のアレルに由来するバンドが見られ、FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のサンプルでは、ノックインアレルに由来するバンドが見られ、PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のサンプルでは、野生型のアレルに由来するバンドとノックインアレルに由来するバンドが見られた (図 10)。これより、蛍光観察を行った FLAG x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のサンプルの遺伝型はノックインアレルをホモ接合型であり、PA x 3 タグ配列をもつ F1 魚由来の胚のサンプルの遺伝型はノックインアレルをヘテロ接合型であることが分かった。

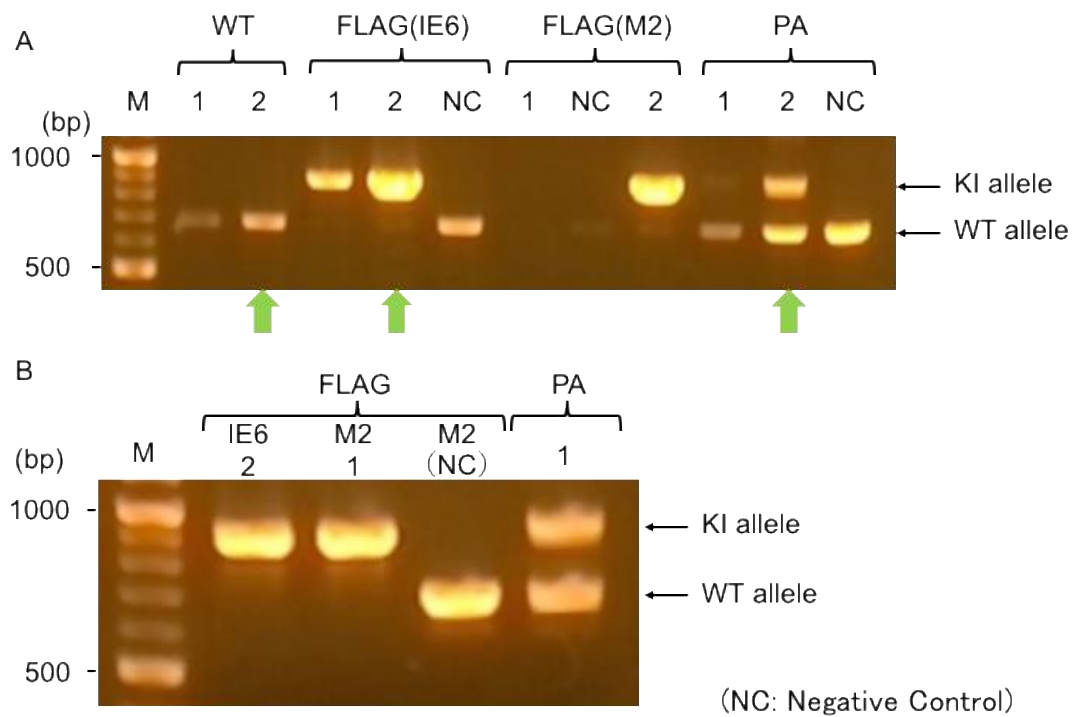


図 10. ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型の同定

A. ホールマウント免疫染色を行なった胚のサンプルの遺伝型を同定するための PCR の電気泳動の結果。緑色の矢印が図 9 のサンプルのアレルを示している。

B. 図 11A でバンドが検出できなかったサンプルの PCR の電気泳動の結果。FLAG (IE6)の 2 はポジティブコントロールとして用いた。

HiBiT ブロットイング

HiBiT ブロットイングでは、野生型の成魚同士、F1 世代のノックインアレルをヘテロ接合型にもつ成魚同士を交配させて得た胚を 70~80%エピソード期まで培養し、それぞれの胚のタンパク質を調製した。調製したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、LgBiT と発光基質を含む溶液を利用して検出を行なった。

HiBiT ブロットイングの結果は、ウエスタンブロットイングの結果と同様に、分子質量から想定される位置にバンドを検出することができた (図 11)。

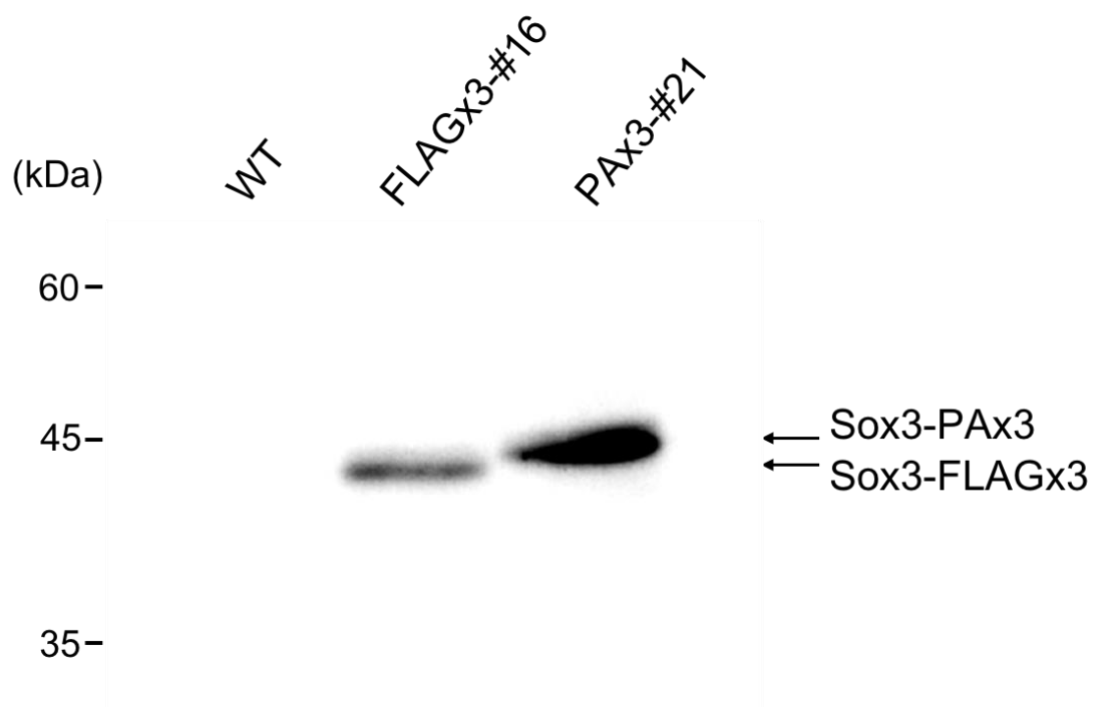


図 11. HiBiT タグを利用した HiBiT ブロットイング

クロマチン免疫沈降法

ChIP-qPCR

FLAG エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降が、抗 Sox3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降と比較して特異性が高くなるのかを調べた。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 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行なった。抗体は、野生型の胚由来のサンプルには抗 Sox3 抗体、ノックインアレルをヘテロまたはホモ接合型にもつ胚由来のサンプルには抗 FLAG 抗体を用いた。クロマチン免疫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 qPCR を行い、回収した DNA 量を定量した (図 12)。

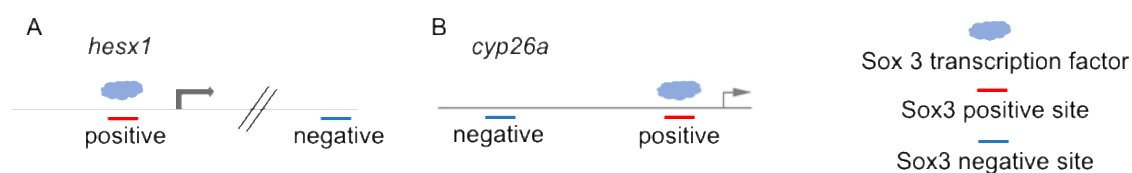


図 12. 各遺伝子におけるポジティブ領域とネガティブ領域

A. *hesx1* 遺伝子で Sox3 転写因子が特異的に結合するポジティブ領域と結合しないネガティブ領域の模式図

B. *cyp26a* 遺伝子で Sox3 転写因子が特異的に結合するポジティブ領域と結合しないネガティブ領域の模式図

得られたデータより、全ての条件でポジティブ領域はネガティブ領域より DNA の回収率が高かった。また、ポジティブ領域とネガティブ領域の比率を ChIP 濃縮度として算出した。これらのことから、FLAG タグを利用して抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降は、抗 Sox3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降と比較すると、ネガティブ領域の混入が少ないことにより ChIP 濃縮度が高くなることが分かった (図 13)。

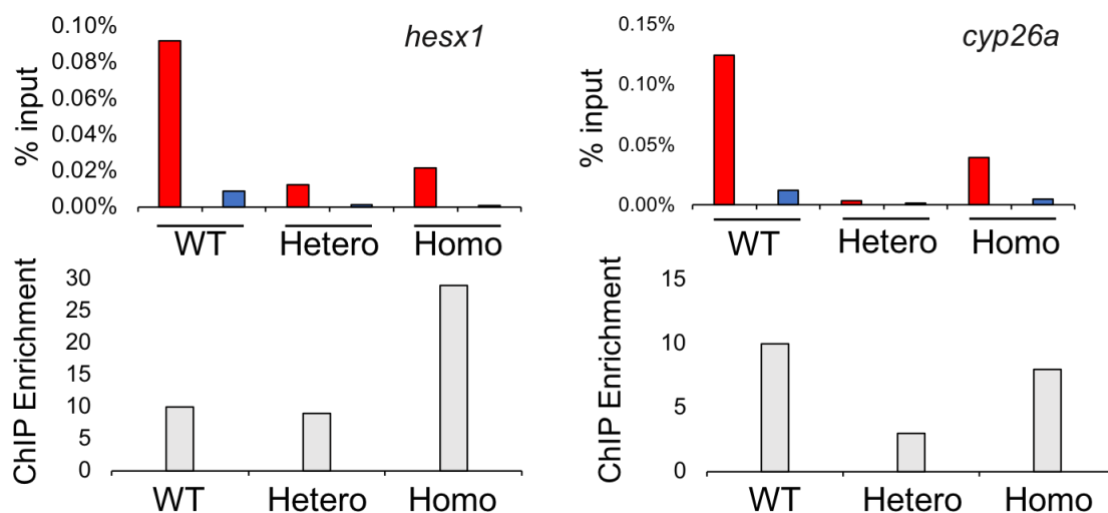


図 13. FLAG タグを利用した ChIP-qPCR

赤いグラフバーがポジティブ領域の回収率、青いグラフバーがネガティブ領域の回収率を示している。

第4章 考察

ウエスタンブロッティング、HiBiT ブロッティングでは、FLAG x 3 タグ配列、PA x 3 タグ配列を含む複合タグ配列を付加させた Sox3 タンパク質の分子質量から想定される位置にバンドが検出された。また、ホールマウント免疫染色では、野生型の胚に抗 Sox3 抗体を用いたサンプルと複合タグ配列をもつ F1 魚由来の F2 胚に抗 FLAG 抗体、抗 PA 抗体を用いたサンプルでの蛍光を比較すると、どちらも中枢神経系に Sox3 タンパク質の発現を検出できた。このことから、FLAG タグあるいは PA タグを含む複合タグが Sox3 タンパク質の発現に大きな影響を与えていないことが分かった。一方、PA タグを含む複合タグがノックインされている成魚同士を交配させた場合、F1 世代から F2 世代へのノックインアレルの伝達の割合がメンデルの法則とは外れて小さくなっていた。さらに、ノックインアレルをヘテロまたはホモ接合型にもつ F2 世代の成魚同士の交配で胚を得られないことが多い傾向があった。これらのことから、PA タグが Sox3 タンパク質の機能に何らかの影響を与えている可能性がある。

FLAG タグを利用して抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降では、抗 Sox3 抗体を用いたときと比較すると、ネガティブ領域の混入が少なかった。ポジティブ領域の回収率は、遺伝子の *hex1* と *cyp26a* の両者において、抗 Sox3 抗体を用いた野生型の胚由来のサンプルが最も高く、次に抗 FLAG 抗体を用いたノックインアレルをヘテロ接合型にもつ胚由来のサンプルであり、ノックインアレルをヘテロ接合型にもつ胚由来のサンプルは最も低かった。他の遺伝子でも同じような傾向になることが想定される。ChIP 濃縮度については、抗 FLAG 抗体を用いた場合と抗 Sox3 抗体を用いた場合を比較すると、*hex1* の遺伝子では高くなり、*cyp26a* の遺伝子では同程度となった。以上のことから、FLAG タグの抗体がモノクローナル抗体であることを踏まえると、FLAG タグを利用して抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降は、ネガティブ領域の混入が少なく、さらに抗体ロットに左右されない安定した免疫沈降が行えると考えられる。

第 5 章 材料と方法

複合タグ配列

本研究で用いた複合タグ配列は、エピトープタグの 1 種である FLAG または PA タグの 3 量体、TEV プロテアーゼ認識配列、アビジンと複合体を形成する Bio タグ、NanoLuc ルシフェラーゼ断片 (LgBiT) と反応する HiBiT タグを含むものを用いた (Ranawakage et al., 2019)。

尾鰭からのゲノム DNA の抽出

まず健康状態の良いゼブラフィッシュをランダムに選んだ。ゼブラフィッシュを飼育しているシステムの飼育水 1 L に対して、500 μ L の 10% Clove Oil / EtOH をケース中の飼育水に入れ、その水中に選別したゼブラフィッシュを入れて麻酔状態にした。解剖用のハサミとピンセットを利用して麻酔状態のゼブラフィッシュの尾鰭を切断した。ZF DNA extraction buffer (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) 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。ゼブラフィッシュ 1 匹の尾鰭と DNA extraction buffer を 100 μ L を 1.5 mL チューブに入れ、55 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションを行った。その後、90 $^{\circ}$ C で 12 分のインキュベーションを行い、Proteinase K を失活させ、冷凍庫で保管した。

胚からのゲノム DNA の抽出

2 M Tris-HCl (pH 8) と 0.5 M EDTA、ultrapure water を混ぜ、10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA の濃度になるように調製後、オートクレーブを行なった。オートクレーブ終了後、10% Triton X-100 を加え、濃度が 0.2% Triton X-100 になるように DNA extraction buffer を作成した。これに 20 mg / mL Proteinase K を 0.2 mg / mL Proteinase K の濃度になるように加え、DNA 抽出に用いた。胚 1 つをチューブに入れたところに、DNA extraction buffer を 10 μ L 加えた後、55 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションを行った。その後、90 $^{\circ}$ C で 12 分のインキュベーションを行い、Proteinase K を失活させ、冷凍庫で保管した。

抽出したゲノム DNA の遺伝型を同定するための PCR

プライマーは、sox3_over_F1_190330、sox3-3'UTR_over300_R (表 11) を用いた。反応液の組成は、表 4 に示した。サイクルは以下の設定で行なった：(1) 95 $^{\circ}$ C 30 秒 1 サイクル (2) 95 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 30 秒 30 サイクル (3) 68 $^{\circ}$ C 5 分 1 サイクル (4) 4 $^{\circ}$ C 固定。

表 4 尾鰭から抽出した DNA の遺伝型を同定するための PCR の反応液の組成

Name	Volume
DW	17.15 μ l
10xThermoPolB	3.0 μ l
2.5 mM dNTP	2.4 μ l
6 x Sucrose red	5.0 μ l
primer F (100 pmol / μ L)	0.15 μ l
primer R (100 pmol / μ L)	0.15 μ l
Tag polymerase-NEB (5000 units / mL)	0.15 μ l
Template	2.0 μ l

タンパク質調製

ゼブラフィッシュを交配させて得た胚を 70~80% エピボリー期まで培養した。ZF Embryo Medium に 20 mg/ml Proteinase K を 0.2 mg/ml の濃度になるように加え、卵膜を剥がすために用いた。35 mm dish と 60 mm dish に 0.7% agarose / 0.03% red sea salt を入れ、薄くコートした。アガロースコートした 35 mm dish に胚を移した。飼育水をポリピペットですできるだけ除き、0.2 mg / mL Proteinase K / ZF Embryo Medium を 2.5 mL 入れ、10 分間静置した。ZF Embryo medium を 2 mL をピペットマンで入れる際の水流で卵膜を剥がし、アガロースコートされた 60 mm dish に胚を移した。壊れた卵膜を取り除きながら ZF Embryo Medium の液替えを 2 回行った。5 mL チューブに cComplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack (Roche) を 1 錠と、1 / 2 x Ginzburg Fish Ringer without Calcium (55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO₃) を 5 mL 入れ、錠剤を溶かして 2 x cComplete protease inhibitor cocktail を含む緩衝液を作成した。1.5 mL チューブにこの 2 x cComplete 含有緩衝液を 1 mL 入れた後に、胚を移した。2 x cComplete 含有緩衝液を除いて、再度 2 x cComplete 含有緩衝液を 0.2 mL 加え、ピペットマンで胚の塊が見えなくなるまでゆっくりピペッティングをした。2 x cComplete 含有緩衝液を 0.8 mL 加え、ローテーターで 5 分間ゆっくり回し、遠心分離機で遠心 (300 g, 30 秒) し、細胞を集めた。上澄み液を除き、1 embryo / μ L になるように 2 x cComplete 含有緩衝液で懸濁後、さらに等量の 2 x SDS sample buffer (+ DTT) を加え、P200 のピペットマンで均一な溶液になるまでピペッティングをした。熱処理 (70 °C, 5 分間) し、超音波処理 (30 秒間, 2 回) を行った (サンプルは -30 °C で保存した)。

SDS-PAGE

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う際のゲルは、30% acrylamide gel、D₃W、1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS を混合し、分離ゲルは濃度が 10% acrylamide gel、濃縮ゲルは濃度が 4% acrylamide gel になるように調製し、10% APS と TEMEND を加えて作成した。プロテインマーカー (PM2500[SMBIO]) とサンプルを適量ロードし、ミニゲルが 1 枚の場合は 15 mA で泳動を行った (2 枚の場合は 30 mA)。

蛍光ウエスタンブロッティング

転写緩衝液 (10 mM CAPS pH11, 10% MeOH)を調製し、コールドルーム (4 °C)で冷やしておいたものを使い、ゲルの平衡化を行った (20 分間)。ニトロセルロースメンブレン (Pall corporation Bio Trace NT)、スポンジ、ろ紙を転写緩衝液に浸した後、転写板 (黒)、スポンジ、ろ紙、ゲル、メンブレン、スポンジ、転写板 (透明)の順番で重ねていき、ゲルはマーカールが右になるように配置した。冷却しながら、転写を 90 V、1 時間の条件で行った (メンブレンは TBS [20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl]に浸し、4 °Cで保存した)。

メンブレンをブロッキング溶液 (1 / 2 x Intercept Blocking Buffer [LI-COR] in TBS)で 1 時間処理をした。TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)を調製し、洗浄に用いた。ブロッキング終了後、一次抗体希釈液 (1 / 2 x Blocking Buffer / TBS, 10% Tween 20 に一次抗体を希釈したもの)中でメンブレンを 2 時間振盪を行った (表 5)。メンブレン 1 cm² あたり 0.1 mL の抗体希釈液を用いた。TBST でリンス 1 回、洗浄 (5 分間)4 回を行った。二次抗体希釈液 (1 / 2 x Blocking Buffer / TBS, 10% Tween 20 に二次抗体を希釈したもの)中でメンブレンを 1 時間振盪を行った (表 6)。TBST でリンス 1 回、洗浄 (5 分間)4 回を行った。その後、近赤外蛍光検出装置 (ODESSEY CLx [LI-COR])で撮影を行い、Image Studio (LI-COR)で画像の解析を行った。

表 5. ウエスタンブロッティングで利用した一次抗体

1次抗体	抗FLAG 抗体 抗PA 抗体	抗Sox3 抗体	抗 α -Tubulin 抗体
FLAG	M2,mouse (モノクローナル) final 0.5 μ g / mL	GTX132494,rabbit (ポリクローナル) final 0.5 μ g / mL	B-5-1-2,mouse (モノクローナル) final 0.2 μ g / mL
PA	NZ-1,rat (モノクローナル) final 0.5 μ g / mL	GTX132494,rabbit (ポリクローナル) final 0.5 μ g / mL	B-5-1-2,mouse (モノクローナル) final 0.2 μ g / mL

表 6. ウェスタンブロッティングで利用した二次抗体

2次抗体	抗FLAG 抗体 抗PA 抗体	抗Sox3 抗体	抗 α -Tubulin 抗体
FLAG	goat-anti-mouse IgG-IR Dye680 RD final 0.1 μ g / mL	goat-anti-rabbit IgG-IR Dye800 CW final 0.2 μ g / mL	goat-anti-mouse IgG-IR Dye680 RD final 0.1 μ g / mL
PA	goat-anti-rat IgG-IR Dye800 CW final 0.2 μ g / mL	goat-anti-rabbit IgG-CF 680 CF final 0.1 μ g / mL	goat-anti-mouse IgG-IR Dye680 RD final 0.1 μ g / mL

HiBiT ブロッティング

タンパク質調製、SDS-PAGE を行った。転写緩衝液 (10 mM CAPS pH 11, 10% MeOH) を調製し、コールドルーム (4 °C) で冷やしておいたものを使い、ゲルの平衡化を行った (20 分間)。ニトロセルロースメンブレン (Pall corporation Bio Trace NT)、スポンジ、ろ紙を転写緩衝液に浸した後、転写板 (黒)、スポンジ、ろ紙、ゲル、メンブレン、スポンジ、転写板 (透明) の順番で重ねていき、ゲルはマーカーが右になるように配置した。冷却しながら、転写を 90 V、1 時間の条件で行った (メンブレンは TBS [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl] に浸し、4 °C で保存した)。メンブレンを TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 30 分間振盪した後、LgBiT タンパク質 (Promega) を含む Nano-Glo HiBiT ブロッティング試薬で 1 時間振盪した。基質であるフリマジンを追加し、5 分間振盪した。CCD カメラ (Fusion, Vilber Lourmat) を備えた化学発光イメージャーを使用した、プロットを画像化した。

ホールマウント免疫染色

ゼブラフィッシュを交配させて得た胚を 24 時間胚まで培養した。ZF Embryo Medium に 20 mg / mL Proteinase K を 0.2 mg / mL の濃度になるように加え、卵膜を剥がすために用いた。35 mm dish に胚を移した。飼育水をポリピペットでできるだけ除き、0.2 mg / mL Proteinase K / ZF Embryo Medium を 2.5 mL 入れ、10 分間静置した。ZF Embryo medium を 2 mL をピペットマンで入れる際の水 flow で卵膜を剥がし、60 mm dish に胚を移した。壊れた卵膜を取り除きながら ZF Embryo Medium の液替えを 2 回行った。ZF Embryo medium を取り除いて、4% PFA (パラホルムアルデヒド) / PBS を 1 mL 入れ、ローテーターで 4°C、2 時間回転させた。RNA 実験用のベンチで 4% PFA / PBS を取り除いた。PBST を 1 mL 入れ、5 分間ローテーターで回転させた (x 3 回)。PBST を取り除き、25% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間ローテーターで回転させた。25% MeOH / PBST を取り除き、50% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間ローテーターで回転させた。50% MeOH / PBST を取り除き、75% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間ローテーターで回転させた。75% MeOH / PBST を取り除き、100% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間ローテーターで回転させた。100% MeOH / PBST を取り除き、100% MeOH を入れた (サンプルを保管する場合は -30°C

で保存した)。事前に Acetone を-20℃の冷凍庫で冷やし、D₃W を氷の中で冷やした。100% MeOH を取り除き、75% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間洗浄を行った。75% MeOH / PBST を取り除き、50% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間洗浄を行った。50% MeOH / PBST を取り除き、25% MeOH / PBST を 1 mL 入れ、5 分間洗浄を行った。25% MeOH / PBST を取り除いた。PBST を 1 mL 入れ、5 分間洗浄を行った (x 3 回)。PBST を取り除き、150 mM Tris-HCl (pH 9.0) を 1 mL 入れ、5 分間洗浄を行った。150 mM Tris-HCl (pH 9.0) を取り除き、再び 150 mM Tris-HCl (pH 9.0) を 0.5 mL 加え、70 °C、15 分でインキュベートを行った。PBST を 1 mL 入れて 5 分間洗浄を行った (x 2 回)。PBST を取り除いた。チューブを氷の上に立てながら、D₃W を 1 mL 入れてリンスを行った (x 2 回)。事前に冷やしておいた Acetone を 1 mL 入れ、-20 °C の冷凍庫で 20 分間置いた。チューブを氷の上に立てながら Acetone を取り除いた。D₃W を 1 mL 入れてリンスを行った (x 2 回)。氷の上から取り出して室温で PBST を 1 mL 入れて、5 分間洗浄を行った (x 2 回)。PBST を取り除いた。10% Normal Goat Serum / PBT をブロッキング溶液として 1 mL 入れ、4 °C のコールドルームで 3 時間振盪した。24-well plate にそれぞれ胚を入れ、顕微鏡で壊れている程度を確認した。確認後、一次抗体希釈液 (1% Normal Goat Serum / PBT に一次抗体を希釈したもの) を 500 μL 入れて、4 °C のコールドルームで 3 日間振盪した (表 7)。

表 7. ホールマウント免疫染色で利用した一次抗体

1次抗体	抗FLAG 抗体 抗PA 抗体	抗Sox3 抗体
FLAG	IE6,mouse (モノクローナル) M2,mouse (モノクローナル) final 10 μg / mL	GTX132494,rabbit (ポリクローナル) final 5 μg / mL
PA	NZ-1, rat (モノクローナル) final 10 μg / mL	GTX132494,rabbit (ポリクローナル) final 5 μg / mL

一次抗体希釈液を取り除いた。PBT を 1 mL 入れて、1 時間の洗浄を行った (x 5 回)。二次抗体希釈液 (1% Normal Goat Serum / PBT に二次抗体を希釈したもの) を 1 mL 入れて 4 °C のコールドルームで 2 日間振盪させた (表 8)。

表 8. ホールマウント免疫染色で利用した二次抗体

2次抗体	抗FLAG 抗体 抗PA 抗体	抗Sox3 抗体
FLAG	anti-mouse IgG Alexa 488 final 4 µg / mL	anti-rabbit IgG Alexa 488 final 4 µg / mL
PA	anti-rat IgG Alexa 488 final 4 µg / mL	anti-rabbit IgG Alexa 488 final 4 µg / mL

二次抗体希釈液を取り除いた。PBT を 1 mL を入れて 5 分間の洗浄を行った (x 5 回)。顕微鏡で蛍光を確認した後、PBT を取り除いた。25% Glycerol / PBS を 1 mL 入れ、20 分間静置した。25% Glycerol / PBS を取り除いて、50% Glycerol / PBS を 1 mL 入れ、20 分間静置した。50% Glycerol / PBS を取り除いて、75% Glycerol / PBS を 1 mL 入れ、20 分間静置した。35 mm dish と 60 mm dish に 0.7% agarose / 0.03% red sea salt を入れ、薄くコートした。アガロースコートした dish に 75% Glycerol / PBS 入れた。35 mm dish に胚を移し、蛍光がしっかり光っていて体の形が保たれている胚を 60 mm dish に移し、Lateral と Dorsal の方向で GFP の蛍光の撮影を行った。

ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型を同定する PCR

ZF 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 µl 加えた後、55 °C で 3 時間インキュベーションを行った。その後、90 °C で 12 分のインキュベーションを行い、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、sox3_over_F1_190330、sox3-3'UTR_over300_R (表 11) を用いた。図 11A の PCR の反応液の組成は、表 9 に示した。図 11A の PCR のサイクルは以下の設定で行なった :

(1)95 °C 30 秒 1 サイクル (2)95 °C 15 秒 → 60 °C 30 秒 → 68 °C 50 秒 30 サイクル (3)68 °C 5 分 1 サイクル (4)4 °C 固定。

図 11B の PCR の反応液の組成は、表 10 に示した。図 11B の PCR のサイクルは以下の設定で行なった : (1)98 °C 10 秒 → 60 °C 5 秒 → 68 °C 5 秒 30 サイクル (2)68 °C 30 秒 1 サイクル (3)4 °C 固定。

表 9. ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型を同定するための PCR の反応液の組成

Name	Volume
DW	12.15 μ l
5 x One Taq Standard Reaction Buffer	6.0 μ l
2.5 mM dNTP	2.4 μ l
6 x Sucrose red	5.0 μ l
primer F (100 pmol / μ L)	0.15 μ l
primer R (100 pmol / μ L)	0.15 μ l
One Taq DNA polymerase-NEB (5000 units / mL)	0.15 μ l
Template	4.0 μ l

表 10 ホールマウント免疫染色の胚の遺伝型を同定するための PCR の反応液の組成

Name	Volume
DW	10.55 μ l
2 x KOD One PCR Master Mix	15.0 μ l
primer F (100 pmol / μ L)	0.225 μ l
primer R (100 pmol / μ L)	0.225 μ l
Template	4.0 μ l

クロマチン免疫沈降

ゼブラフィッシュを交配させて得た胚を 90%エピソード期まで培養した。ZF Embryo Medium に 20 mg / mL Proteinase K を 0.2 mg / mL の濃度になるように加え、卵膜を剥がすために用いた。35 mm dish と 60 mm dish に 0.7% agarose / 0.03% red sea salt を入れ、薄くコートした。アガロースコートした 35 mm dish に胚を移した。飼育水をポリピペットでできるだけ除き、2 mg / mL Proteinase K / ZF Embryo Medium を 2.5 mL 入れ、10 分間静置した。ZF Embryo medium を 2 mL をピペットマンで入れる際の水 flow で卵膜を剥がし、アガロースコートされた 60 mm dish に胚を移した。壊れた卵膜を取り除きながら ZF Embryo Medium の液替えを 2 回行った。胚を 2 mL チューブ (silicone coated) に移し、1%ホルムアルデヒド (ZF Embryo Medium, HEPES [10 mM, pH 7.6] に 37%, Formalin [8%メタノール含有] を 1%になるように加えて調製した) を固定液として 1.5 mL 加えて、ローテーターで 15 分回転させた。2.5 M Glycine を 75 μ L (固定液の 1 / 20 の量) を加えて転倒振盪を行い、ローテーターで 5 分間回転させた。2 mL チューブの中の液体を取り除いた。PBS を 1 mL 入れてリンスを行った (x 3 回)。PBS を取り除き、-80 $^{\circ}$ C の冷凍庫で保管した。今回は、ウサギ由来のポリクローナル抗体である抗 Sox3 抗体 (GTX132494, GeneTex) の捕捉には抗 rabbit IgG、

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 のビーズを使用した。1.5 mL チューブ (DNA low bind)にビーズを 20 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 Sox3 抗体、抗 FLAG 抗体を加えて、4 $^{\circ}$ 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。5 mL チューブに cComplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack (Roche)を 1 錠と、1 / 2 x Ginzburg Fish Ringer without Calcium (55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO₃)を 5 mL 入れ、錠剤を溶かして 2 x cComplete protease inhibitor cocktail を含む緩衝液を作成し、以下で使用する 2 x 緩衝液と混合し、1 x として用いた。細胞溶液緩衝液中 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 / cComplete protease inhibitor cocktail)を胚の数に合わせて加え (100 embryo で 0.2 mL)、懸濁し、氷上で 15 分間静置した。遠心分離により核を収集し、核溶解緩衝液中 (0.25% SDS, 2.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 / cComplete protease inhibitor cocktail)に 1 embryo / μ L になるように再懸濁し、氷上で 10 分間静置した。次に DNA Shearing システム M 220 (Covaris)を用いて 7 $^{\circ}$ C で 5 分間超音波処理を行った。10 embryo 分をインプットコントロールにした。超音波処理した細胞の上澄みを ChIP 希釈緩衝液 (250 mM NaCl, 1.65% DOC, 50 mM Tris-HCl pH 7.5)で 2.5 倍希釈した。希釈した溶液を、各抗体を結合させた抗 IgG ビーズと 4 $^{\circ}$ C で 17 時間混合した。抗体-ビーズ複合体を含んだ希釈溶液を 17 時間混合後に上澄みを取り除き、磁気ビーズを氷で冷やした RIPA 緩衝液 (50 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.7% DOC, 1% Triton X-100, 0.5 M LiCl)で 4 回洗浄後、チューブを変え、TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)で 1 回洗浄した。上澄みは取り除き、- 30 $^{\circ}$ C で保存した。ChIP 溶出緩衝液 (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.25% SDS, 25 mM DTT)を 200 μ L と 5 M NaCl を 8.4 μ L 加えて、65 $^{\circ}$ C、6 時間脱架橋処理をした。溶出した DNA を RNaseA で処理し、proteinase K で処理、ChIP DNA Binding Buffer は ChIP DNA Clean & Concentrater (Zymo Research)、カラム、チューブ、Wash Buffer は Monarch PCR DNA Cleanup Kit (NEW ENGLAND Biolabs)を使い精製した。DNA の溶出は、最終濃度が 0.2 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法によって回収し精製した DNA を TE で希釈し、1 反応あたりポジティブ領域では 2 embryo 相当量、ネガティブ領域では 4 embryo 相当量を用いた (ネガティブ領域は免疫沈降される DNA 断片量が少ないため)。また、定量のための%input の検量線にはインプット溶液から精製した DNA を使用し、4 ~ 0.0004%までの 5 段階の 10 倍希釈を用いた。各ウェルに対して表 11 の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 FIREPol SolisGreen qPCR Mix (Solis BioDyne)を使用した。qPCR 反応には LightCycler 96 (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 60 °Cで 20 秒、伸長反応が 72 °Cで 20 秒である。

本研究で用いたプライマー

表 11. プライマーリスト

Name	Sequence (5' to 3')
sox3_over300_F1_190330(5' junction)	GCGGGACTTCAGTACCCAATGA
sox3-3'UTR_over300_R(3' junction)	TGAACGTACTCTCCCTCCGT
hesx1_1 (Forward)	TAAAAGCAGCCAAGCAGCCAAC
hesx1_1 (Reverse)	ATGCTCGGCTTCACAAAAGCAC
hesx1_dow1 (Forward)	GATGATTCCCTCAGGCCTTCAGAT
hesx1_dow1 (Reverse)	AAGTTCGCCAGCAGTCCTAATG
cyp26a1_1-1(Forward)	CTCAGGATTGTCTGCCTTCTACAG
cyp26a1_1-1(Reverse)	CGGCTCCAAACTCTCAACCATTG
cyp26a1_1-3(Forward)	TGAGCTGACCTGAGTTTGAACC
cyp26a1_1-3(Reverse)	ACCCGTGCCACAGATATTATGC

第6章 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官の蒲池雄介教授には実験や修士論文など、様々な場面でご丁寧にご指導いただき深く感謝申し上げます。

また、研究室の先輩方、同期、後輩の皆様の様々な助言や支えに心より感謝致します。

最後になりましたが、大学生活を送る中で一番身近で支えてくれている両親、祖父母に厚く御礼申し上げます。

第 7 章 参考文献

Brizzard, B., 2008. Epitope tagging. *BioTechniques* 44, 693–695. <https://doi.org/10.2144/000112841>

Einhauser, A., Jungbauer, A., 2001. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* 49, 455–465. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00213-5)

Fujii, Y., Kaneko, M., Neyazaki, M., Nogi, T., Kato, Y., Takagi, J., 2014. PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin. *Protein Expr Purif* 95, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.009>

Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Pat Cerretti, D., Urdal, D.L., Conlon, P.J., 1988. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotechnol* 6, 1204–1210. <https://doi.org/10.1038/nbt1088-1204>

Kidder, B.L., Hu, G., Zhao, K., 2011. ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nat Immunol* 12, 918–922. <https://doi.org/10.1038/ni.2117>

Mali, P., Esvelt, K.M., Church, G.M., 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10, 957–963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>

Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H., Kamachi, Y., 2010. B1 SOX Coordinate Cell Specification with Patterning and Morphogenesis in the Early Zebrafish Embryo. *PLoS Genet* 6, e1000936. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000936>

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.

Ranawakage, D.C., Takada, T., Kamachi, Y., 2019. HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions. *Scientific Reports* 9, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43319-y>

Savic, D., Partridge, E.C., Newberry, K.M., Smith, S.B., Meadows, S.K., Roberts, B.S., Mackiewicz, M., Mendenhall, E.M., Myers, R.M., 2015. CETCh-seq: CRISPR epitope tagging ChIP-seq of DNA-binding proteins. *Genome Res* 25, 1581–1589.
<https://doi.org/10.1101/gr.193540.115>

Spencer, V.A., Sun, J.-M., Li, L., Davie, J.R., 2003. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31, 67–75.
[https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00089-6)