

令和 4 年度 修士論文

sox11a の複合タグノックインラインの確立と

ノックインラインを利用した Sox11a の解析

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

高知工科大学 環境理工学群 生命科学専攻

分子発生制御学研究室

梶尾 浩大

指導教員

蒲池 雄介 教授

目次

要旨	- 1 -
第 1 章 序論	- 3 -
第 2 章 結果と考察	- 5 -
第 3 章 材料と方法	- 14 -
参考文献	- 20 -
謝辞	- 21 -

要旨

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* のオーソログとして *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ト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、両方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。ウェスタンブロットティングでは野生型胚に対して抗 Sox 抗体を用いたものでは非特異的なバンドを含め多くのバンドが見られた。また、ノックイン胚に対して FLAG 抗体を用いたものでは一本のバンドが見られた。そのバンドと重なる位置にノックインラインに対して抗 Sox 抗体を用いたものでもバンドが見られたことから、タグが付加された Sox11a タンパク質を検出できることが確認された。

第1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することで、タンパク質の局在や発現量の解析は容易となる。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作成することは非常に難しい。そのため優れた抗体を準備できない場合に目的のタンパク質に対して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。そのような研究では、転写因子とゲノム DNA の相互作用を調べる方法であるクロマチン免疫沈降法がよく用いられる(Spencer et al., 2003)。クロマチン免疫沈降法においてもエピトープタグを目的タンパク質に付加させることで解析が可能となる(Savic et al., 2015)。本研究ではその前段階として 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 をモデルとしノックインラインの確立を行なった。ゼブラフィッシュにおいては、*Sox11* オーソログとして *sox11a* と *sox11b* がある。そこで *sox11a* に対して複合タグのノックインラインの確立を行うことで *sox11b* と区別して検出が可能になることに加え、親和性が高く、特異的な抗体を使用できる。この研究では、エピトープタグの FLAG タグ(Hopp et al., 1988)の三量体を使用した。複合タグのノックインには CRISPR-Cas9 システムを利用し、ドナーには長鎖一本鎖 DNA を用いてノックインの操作を行なった。これにより正確なノックインアレルを次世代に伝達可能な F0 魚を得た。その魚を用いてノックインラインの確立を行なった。ノックインの確立では目的のノックインアレルを持つ F1 成魚をスクリーニングによって選び出した。F1 成魚の交配によって F2 魚のノックインアレルをホモ接合型で持つ魚を得た。その魚同士の交配で得られた胚を用いて Sox11a タンパク質をエピトープタグ抗体により検出が可能であるかをホールマウント免疫染色法と蛍光ウェスタンブロット法を用いて調べた。それにより、タグの抗体によってノックインの起こった Sox11a を特異的に検出できることを示す結果が得られた。このノックインラインの利用によって Sox11a のターゲットとする遺伝子についても今後調べられることが期待される。

また、ノックインラインの確立の過程で複数回のスクリーニングが必要であり、一般的な尾ビレから DNA を得る方法では魚が成魚になるまで育てる必要がある。その問題を解決する方法として初期の胚から DNA を得る方法が開発されている。その方法として粗面ガラスを用いたジェノタイピング専用の機器を用いたもの(Lambert et al., 2018)やプロテアーゼ酵素を用いて胚表面の細胞を剥離させ、得られた細胞から DNA を得る方法(Zhang et al., 2019)などがある。そこで本研究ではプロテアーゼ

酵素を用いたものの最適化を行なった。魚への影響が少ないと考えられる反応温度においてプロテアーゼの種類や濃度、また Medium の種類などを検討した。DNA 回収量の最適化は、*hesx1* を対象とした qPCR によって得られたゲノム DNA コピー数を指標とした。その結果、特定の条件において PCR と電気泳動によって遺伝型の判別が可能であることがわかった。これにより、ゼブラフィッシュにおいてジェノタイピングにかかる時間やコストを抑えることが可能になると期待される。

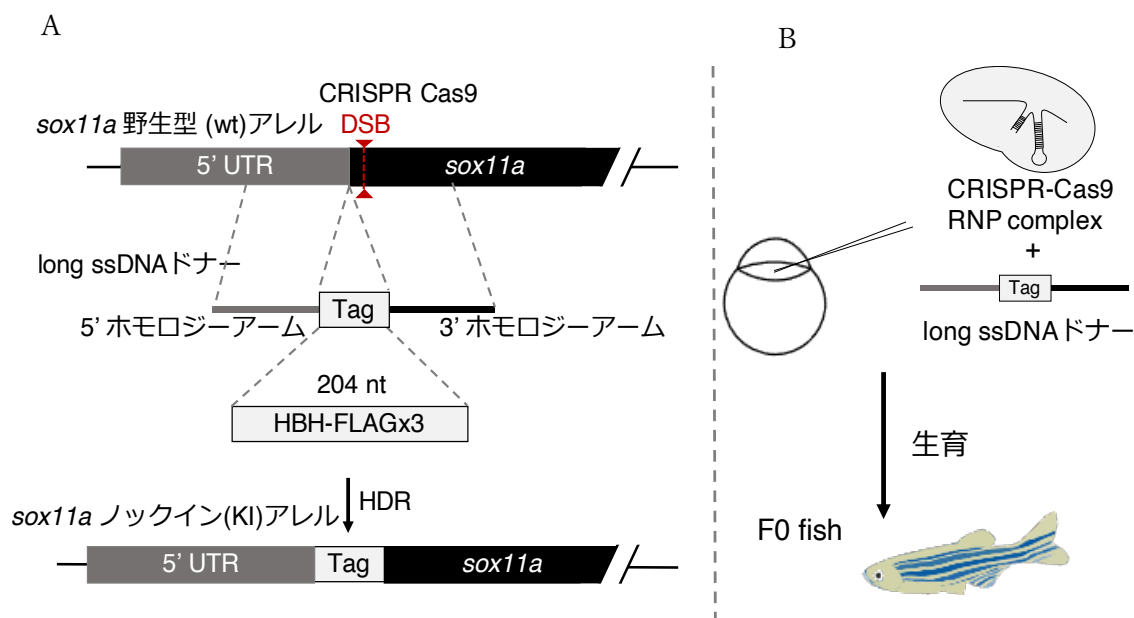


図 1. CRISPR-Cas9 システムを用いた複合タグのノックイン操作

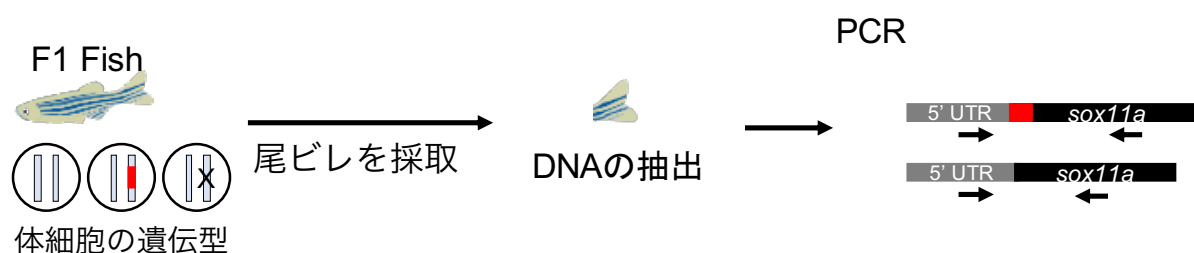
A, ノックインの概要図、B, ノックインの操作図

第2章 結果と考察

sox11a の複合タグノックインラインの作成

ノックイン操作を行なった F0 世代の成魚と野生型の成魚とで交配を行い、生殖系列細胞に正しいノックインアレルを多く持つものを選び出した。その F0 成魚と野生型の成魚を交配させ、得られた胚を飼育し F1 世代の成魚を得た。その F1 成魚の尾ビレを切断し、その尾ビレからゲノム DNA を抽出しノックインアレルをヘテロ接合型で持つものを選び出した。

A



B



図 2. 尾ビレを用いたジェノタイピングによるノックインアレルをヘテロ接合型でもつ F1 成魚の選別

A, 尾ビレを用いたジェノタイピングの手順、B, PCR 産物のアガロース電気泳動

ノックインアレルをヘテロ接合型で持つ F1 成魚同士の交配を行なった。得られた胚から初期の段階でジェノタイピングする方法を最適化し利用した。方法は後に記述する。

ホモ接合型でノックインアレルを持つものを選び出した。ホモ接合型でノックインアレルを持つ成魚を維持することで、永続的に効率よくタグが付加された *Sox11a* を調べることができると考えられる。

ノックインアレル ヘテロ接合体 F1 fish

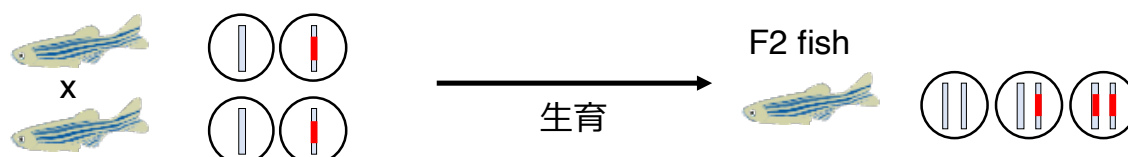


図 3. ノックインラインの確立

ノックインラインを用いたタグ付き *Sox11a* の抗体による検出

ホモ接合型でノックインアレル持つことを確認した F2 成魚同士を掛け合わせて得られた F3 および野生型の 24 hpf 胚を用いた。ホールマウント免疫染色法でタグ抗体(FLAG 抗体)によって Sox11a 特異的なところで染色が見られるかを調べた。

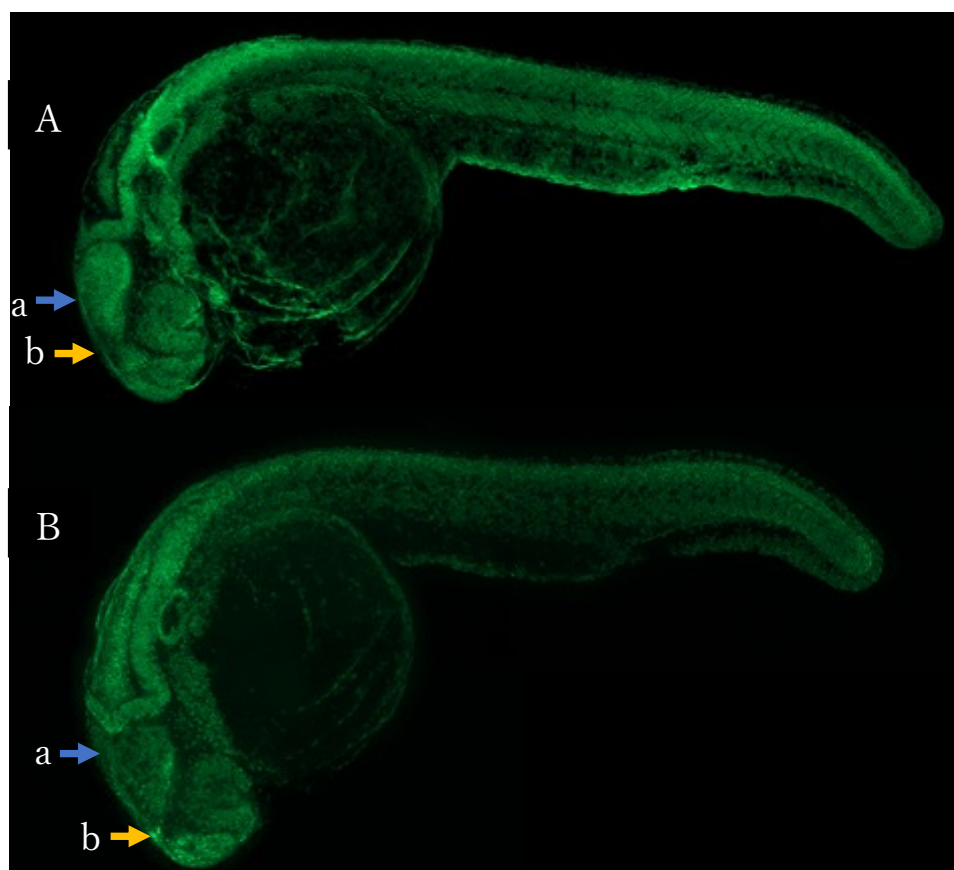


図 4. ホールマウント免疫染色法による比較

A, 野生型胚において Sox11 抗体を用いた検出を行なったもの

B,ホモ接合型胚でノックインアレルにおいて FLAG 抗体を用いた検出を行なったもの

a,中脳:Sox11b が発現することがわかっており、A で高い染色が見られた。

b,松果体:Sox11a 特異的な発現部位であり、B で特に顕著な染色が見られた。

また A,B 共に中枢神経系で高い染色が見られた。

ホールマウント免疫染色法の結果より、野生型胚に対して Sox11 抗体を用いた検出とノックインアレルをホモ接合型で持つ胚に対して FLAG 抗体を用いた検出を比較した。Sox11 は中枢神経系で発現が高いことが分かっており、それに合致して中枢神経系で高い染色が見られた。

また、頭部で Sox11b が高い発現を示す中脳においては、野生型胚に Sox11 抗体を用いたもので

高い染色が見られたのに対して、ノックインアレルをホモ接合型で持つ胚に FLAG 抗体を用いたものでは低い染色しか見られなかった。Sox11a を特異的に発現する松果体においては、ノックインアレルをホモ接合型で持つ胚に FLAG 抗体を用いたもので顕著な染色が見られた。野生型胚に Sox11 抗体を用いたものの画像では綺麗な染色は見られないが、撮影角度によるものであると考えられる。これによってノックインアレルをホモ接合型で持つ胚に FLAG 抗体を用いたものでは Sox11a が特異的に検出されていると考えられる。

ホールマウント免疫染色法と同様にホモ接合型でノックインアレルを持つことを確認した F2 成魚同士を掛け合わせ得られた F3 胚と野生型の胚を用いて、蛍光ウェスタンブロッティング法で比較を行った。胚の発生段階は 10 hpf のものを用いた。

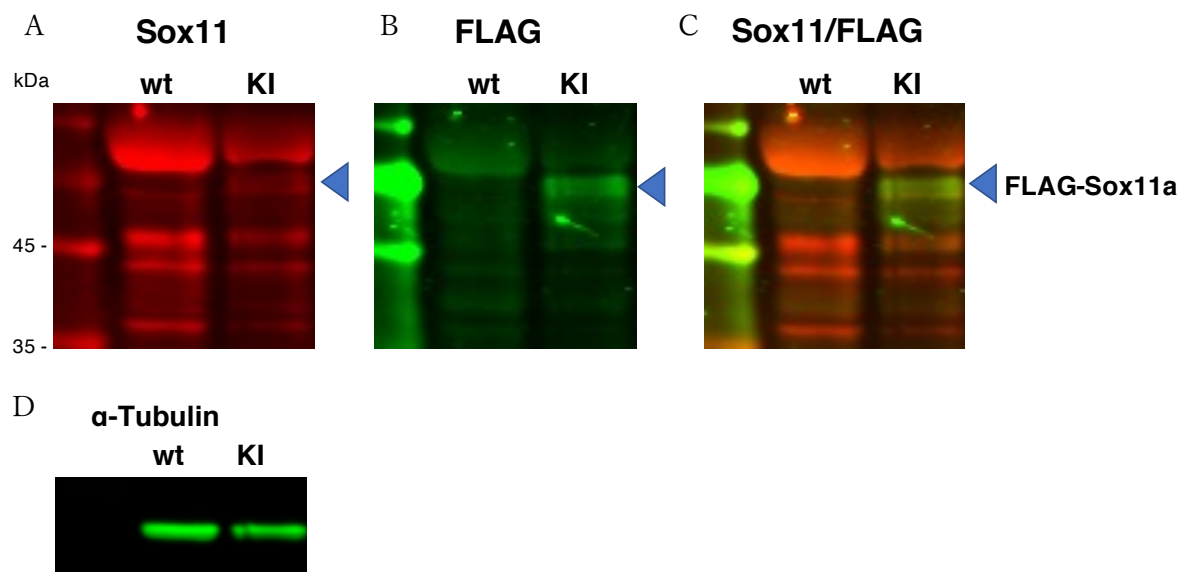


図 5. ウェスタンブロッティング法による比較

A, Sox11 抗体を用いたもの、B, FLAG 抗体を用いたもの、C, Merge (Sox11 抗体+FLAG 抗体)

C, リファレンスとして α -Tubulin 抗体を用いたもの

wt: 野生型、KI: ノックインアレルをホモ接合型で持つもの

Sox11 抗体を用いたものでは非特異的な複数のバンドが見られた。FLAG 抗体を用いたものではノックインアレルをホモ接合型で持つ胚で一本のバンドが見られた。またそのバンドと重なるところに Sox11 抗体で検出されるバンドが見られたため、タグが付加された Sox11a タンパク質を検出していると考えられる。

生きたゼブラフィッシュ胚のジェノタイピング法の確立

胚を用いて生きたままで DNA を回収する方法として、プロテアーゼ処理を用いて胚表面の細胞を剥離させ、その細胞から DNA を回収する方法があるが、この改良を行った。

改良方法を確立する際は、プロテアーゼ処理はゼブラフィッシュの飼育温度と同じ 28 °C で反応を行った。また、その条件で最適なプロテアーゼを見いだすため、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 種で比較検討を行った。また、メディウムの種類においてもどのようなものが良いのかの検討を行った。

まずは、先行研究(Zhang et al., 2019)で使用されていたメディウムとプロテイナーゼ K, トリプシンで比較を行った。比較の指標として *hesx1* の qPCR を行い、得られたゲノム DNA コピー数を計測した。

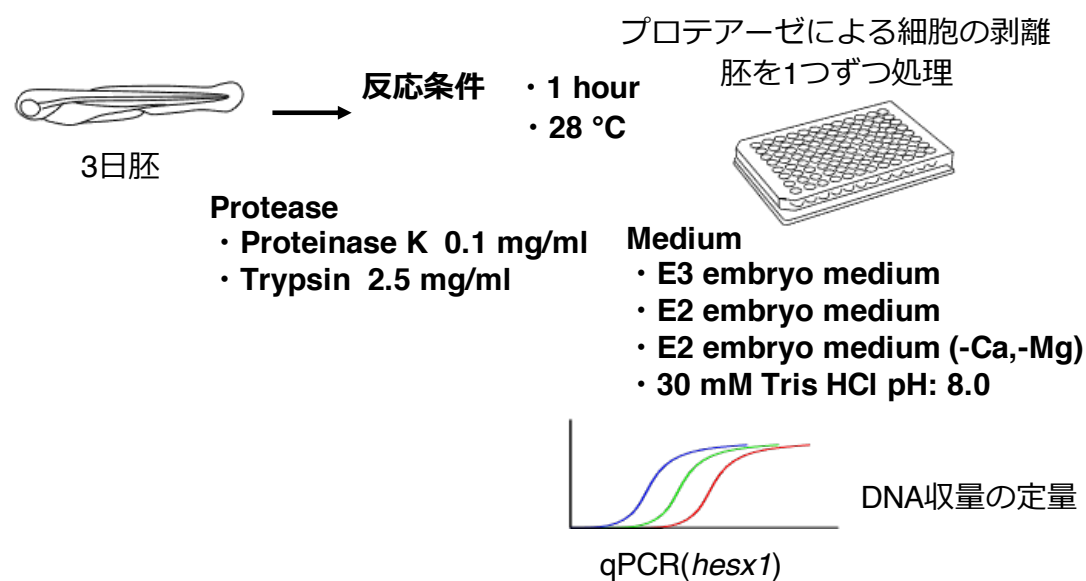


図 6. 参考論文のメディウムにおける比較の方法

A

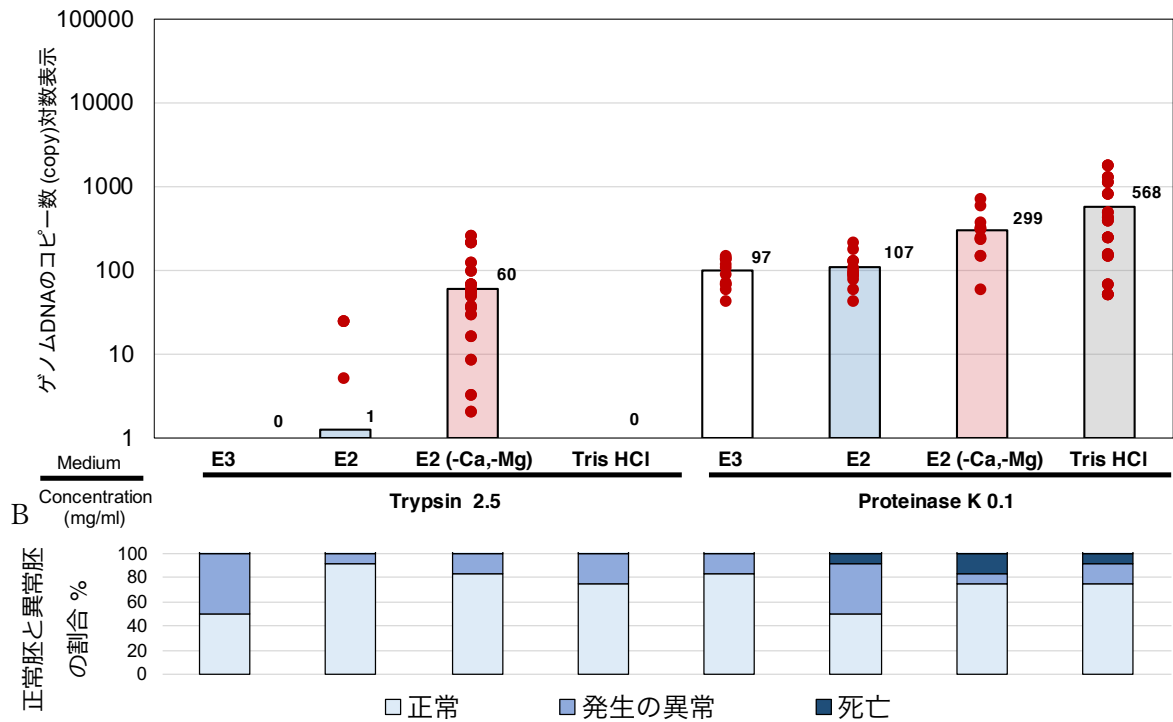


図 7. 参考論文のメディウムにおける比較の結果

A,hesx1 を基準に用いて 1 反応で得られるゲノム DNA コピー数で比較したもの

B,胚への影響を示したもの

プロテイナーゼ K では E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたものと Tris HCl pH,8.0 で多くのゲノム DNA が得られ、トリプシンでは E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたもので多くのゲノム DNA が得られた。プロテアーゼの種類検討では多くのプロテアーゼが働くことのできるメディウムが良いため E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたものを用いることとした。

そのため E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたものにおいて 5 種類のプロテアーゼで検討を行った。

A

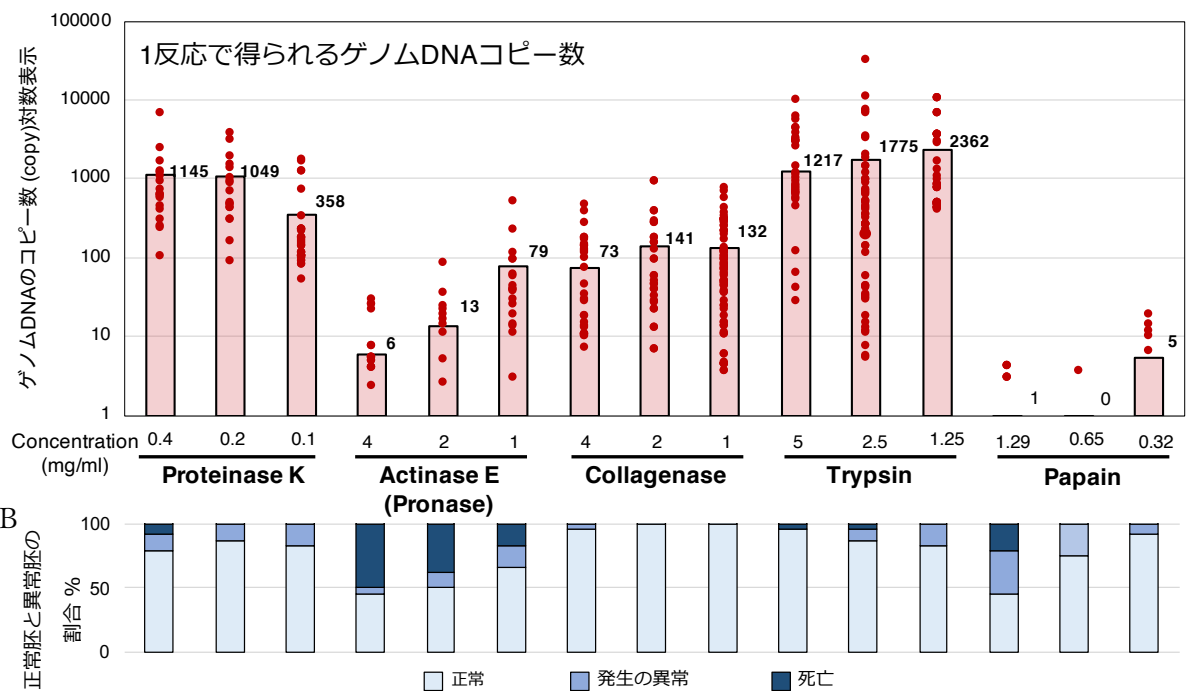


図 8. 2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたもののプロテアーゼ比較の結果
A,hesx1 を基準に用いて 1 反応で得られるゲノム DNA コピー数で比較したもの
B,胚への影響を示したもの

プロテアーゼの種類と濃度の比較よりプロテイナーゼ K とトリプシンで胚への影響が低く、多くのゲノム DNA が回収された。その中でもトリプシンの 1.25 mg/ml で最も効率よくゲノム DNA が得られることが分かった。

トリプシンの 1.25 mg/ml の条件でメディウムの再検討を行った。使用するメディウムの種類としては E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたものとそれに加えて、EDTA を調整して加えることでよりカルシウム、マグネシウムの持ち込みによる影響を少なくできると考えた。

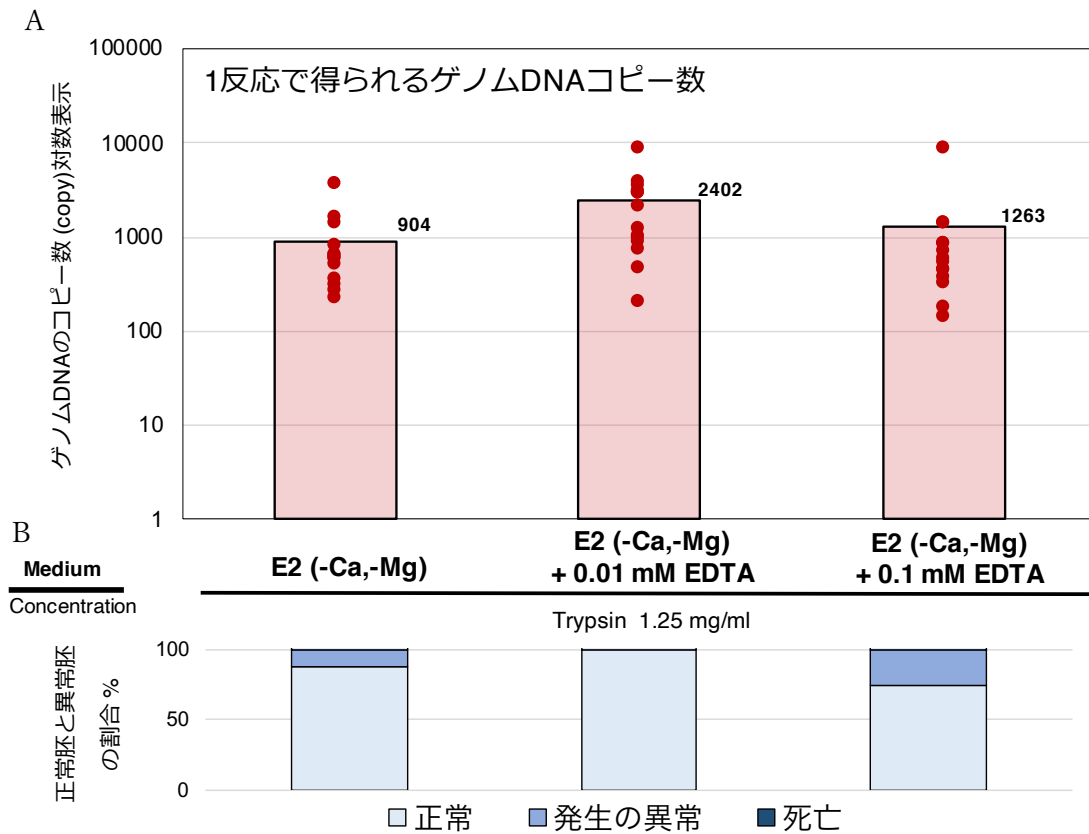


図9. トリプシンの 1.25 mg/ml の条件でのメディウム比較の結果

A, *hesx1* を基準に用いて 1 反応で得られるゲノム DNA コピー数で比較したもの

B, 胚への影響を示したもの

胚への影響と得られたゲノム DNA 量どちらにおいても少量の EDTA(0.01 mM)で最も効率よくゲノム DNA の回収ができるという結果が得られた。

少し条件は異なるが、作成した *sox11a* の複合タグノックインアレルをヘテロ接合型で持つ成魚同士の交配で得られた 3 日胚でゲノム DNA の回収を行なった。その後 PCR とアガロースゲル電気泳動で遺伝型の判別が可能であるかを調べた。

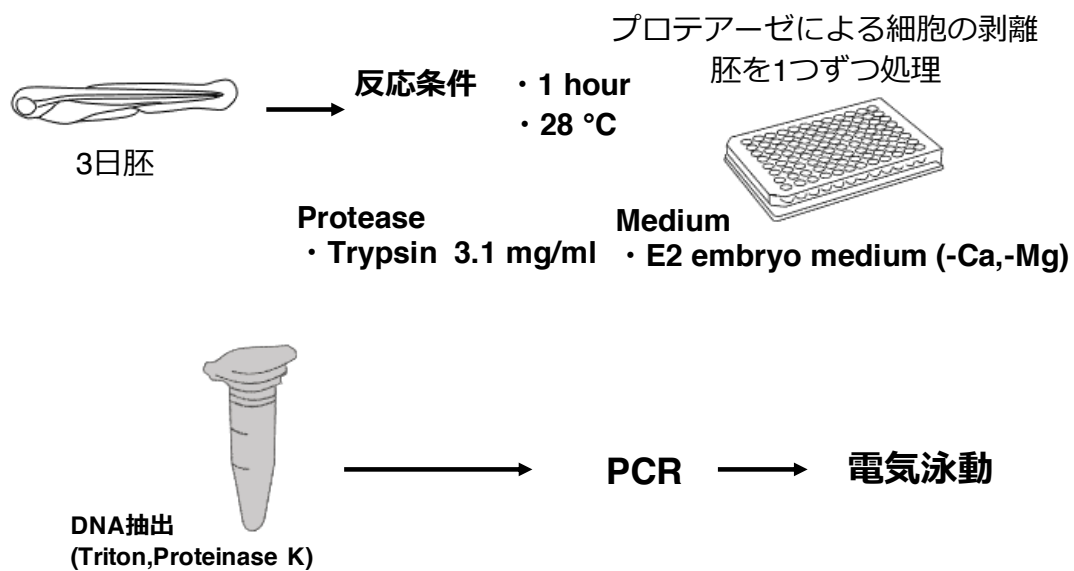
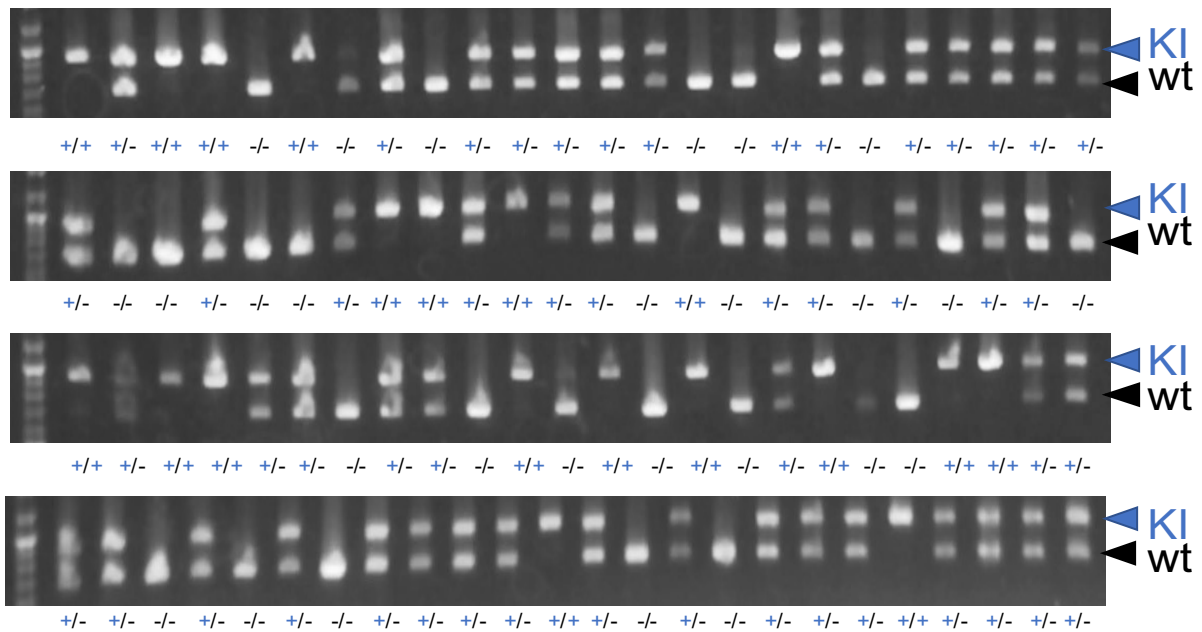


図 10. PCR と電気泳動を加えた遺伝型の判別試験

詳しい条件としては、トリプシンを 3.1 mg/ml 濃度で使用し、E2 embryo medium からカルシウム、マグネシウムを除いたものを用いて細胞の剥離を行なった。また得られた剥離細胞を DNA 抽出してから行なった。

A



B

96 中	受精後5日目 の生存率	成魚
KI/KI (+/+)	20 → 100%	
KI/wt (+/-)	49 → 100%	→ 45%
野生型 wt (-/-)	27	

図 11. PCR と電気泳動を加えた遺伝型の判別の結果

A, アガロースゲル電気泳動による結果を示す。B, 5 日目の時点では生存に影響は見られず、ヘテロ接合体で成魚の時点には 45% が生き残った。

条件は至適化したものとは異なり、多少のバンドの濃淡はあるが遺伝型の判定が可能であることがわかった。メEDIUMの条件としてトリプシンはカルシウム、マグネシウムの有り無しの影響が大きいことが考えられる。また、プロテアーゼ処理で判定を行い、成魚まで育ったノックインアレルホモ接合型のもの同士の交配で問題なく発生が見られた。そのため次世代への生殖にも問題がないと考えられる。

第3章 材料と方法

尾ビレからの DNA の抽出

ゼブラフィッシュの飼育液 1 L に対して 10%CloveOil/EtOH を 500 μ l を加えて、判別するゼブラフィッシュを麻酔状態にさせた。解剖用のハサミとピンセットを用い麻酔状態のゼブラフィッシュから尾ビレを切断した。ZF DNA extraction buffer(200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl[pH 8], 10 mM EDTA, 1% Triton X-100)に 20mg/ml Proteinase K を 0.2 mg/ml になるように加え、DNA を抽出した。抽出には 1 尾あたり DNA extraction buffer を 100 μ l 使用し、1.5 ml チューブに入れ、55 $^{\circ}$ C で 2 hours のインキュベーションを行なった。その後 90 $^{\circ}$ C で 12 min のインキュベーションで Proteinase K を失活させた。

胚からの DNA の抽出

2 M Tris-HCl [pH 8]と 0.5 M EDTA、Ultrapure water を混合し、10 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA になるよう濃度を調整した。その後オートクレーブを行い、室温で冷却した。10% TritonX-100 を加え、0.2% TritonX-100 に調整し、DNA extraction Buffer (Proteinase K-)を作成した。20 mg/ml Proteinase K を加え、0.2 mg/ml に調整し DNA extraction Buffer として用いた。0.1 emb./ μ l となるように DNA extraction Buffer を加え、55 $^{\circ}$ C で 2 hours の間インキュベーションした。Proteinase K の失活のため 95 $^{\circ}$ C で 10 min のインキュベーションを行った。

プロテアーゼを用いた DNA 回収法

3 日胚を使用し、孵化してすぐのゼブラフィッシュを用いた。プロテアーゼ処理に使用するメEDIUM で胚を洗浄した。広口のチップをライターで炙り、チップの角を取った。氷上で胚の入ったシャーレを冷やし、胚を鈍らせた。その後作成したチップを用いて 1 emb. を含む 30 μ l ずつを平底 96 well plate に入れていった。目的濃度の 2 倍の濃度で作成したプロテアーゼ液を 30 μ l ずつ入れていった。テープでしっかりと蓋をして plate を揺すった。28 $^{\circ}$ C で 1 hour のインキュベーションを行なった。PCR 用 96 well plate に反応液を 50 μ l ずつ移動させた。平底 96 well plate には 160 μ l ずつ E2 embryo medium を加えた。28 $^{\circ}$ C インキュベーターで生育させ、5 日胚で胚への影響を調べた。PCR 用 96 well plate は蓋をしサーマルサイクラーで 90 $^{\circ}$ C で 10 min のプロテアーゼの失活操作を行なった。

qPCR の Control template の作製

TL 系ゼブラフィッシュの自然交配によって得られた胚より抽出した wild type のゲノム DNA を精製したものを使用し、ゲノム DNA のコピー数として 5 μ l あたり 10 コピーから 10000 コピーのテンプレート希釈を作成した。

qPCR によるゲノム DNA コピー数の測定

qPCR の酵素には 5xFIRE Pol Solis Green qPCR Mix を用い、Primer には qChip-zf-hesx1-pro.F1 と qChip-zf-hesx1-pro.R1 を用いた。反応液は 1 回に 20 μ l で行い、計測に使用するプロテアーゼ処理液は 5 μ l ずつ使用した。

ホルマリン固定サンプルの固定

ノックインアレルホモ接合型の胚と野生型の胚をそれぞれ 24 hpf 胚まで培養した。E2 embryo medium に 20 mg/ml の Actinase E を 2 mg/ml の濃度でひたし、コリオンを剥がした。その後、E2 embryo medium で複数回洗浄した。E2 embryo medium を取り除き、4%PFA/PBS につけ 4 $^{\circ}$ C ローターで回転させ、4 hours おいた。PBST で 5 min の洗浄を 3 回行った。25% MeOH/PBST から 50% MeOH/PBST, 75% MeOH/PBST, 100% MeOH の順に 5 min ずつ振とうした。−20 $^{\circ}$ C で一晩置いた。サンプルを 100%MeOH から 75% MeOH/PBST, 50% MeOH/PBST, 25% MeOH/PBST, PBST の順に 5 min の振とうした。150 mMTris-HCl[pH 9.0]の中に入れ 70 $^{\circ}$ C で 15 min のインキュベーションをした。その後 PBST で 5 min の振とうで 2 回の洗浄を行った。よく冷やした D₃W で 5 min の氷上インキュベーションを液替し 2 回行った。冷凍で冷やしておいたアセトンにつけ −20 $^{\circ}$ C で 20 min のインキュベーションをした。よく冷やした D₃W で 5 min の氷上インキュベーションを液替し 2 回行った。その後、PBST で 5 min の振とうを 2 回行った。ブロッキングバッファーにつけ 4 $^{\circ}$ C で 3 hours 振とうした。24 well plate にサンプルを移した。

ホルマリン固定抗体反応と蛍光観察

ノックインアレルホモ接合体サンプルには anti-FLAG 抗体を用いた 1 次抗体希釈液を野生型胚サンプルには anti-Sox11 抗体を用いた 1 次抗体希釈液を使用した。4 $^{\circ}$ C で振とうしながら一晩反応させた。PBT で 1 hour の振とうによる洗浄を 5 回行った。ノックインアレルホモ接合体サンプルには anti-mouse 抗体を標識した 2 次抗体希釈液、野生型胚サンプルには anti-rabbit 抗体を標識した 2 次抗体希釈液を入れた。アルミホイルで遮光し 4 $^{\circ}$ C で振とうし一晩置いた。PBT で 10 min 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 PBT に

よる洗浄を行った。4%PFA/PBS に入れ 20 min の振とうを行なった。PBT で 5 min の振とうを 3 回行なった。PBST につけ 4 °C で保存した。

蛍光観察のために 25%Glycerol/PBS から 50%Glycerol/PBS, 75%Glycerol/PBS の順に 20 min ずつ振とうした。Glycerol で胚を固定して蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

10 hpf 胚の脱コリオン化とタンパク質の抽出

ノックインアレルホモ接合型成魚同士の交配で得られた胚の 10 hpf 胚を 35 mm dish を 0.7%Agarose / 0.3%Red sea water でコートしたものに入れた。極力水分を除き、2 mg/ml Pronase / E2 Embryo Medium を加え、5 分ほど浸し水流でコリオンを取り除いた。35 mm dish と同様にアガロースゲルでコートした 60 mm dish に E2 Embryo Medium が入ったものにコリオンの取り除いた胚をできるだけ水分を持ち込まずに移した。E2 Embryo Medium で2回液替えをした。潰れてしまった胚の数を数え、最終的に用いた胚の数を確定させた。

1/2 Ginzburg Fish Ringer without Calcium (55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO₃)の入ったエッペンチューブに胚を移した。液を取り除き 5 ml の 1/2 Ginzburg Fish Ringer without Calcium に cOmplete を 1 錠入れたものを入れ直した。ピペッティングで胚を細胞塊単位まで破碎した。その後チューブローテーターで5分間の転倒攪拌と 2,500 rpm で 30 秒の遠心分離後上澄みを取り除いた。1/2 Ginzburg Fish Ringer without Calcium + cOmplete を加え、1 emb./μl になるように入れた。2xSDS-PAGE Sample buffer をかき混ぜるように加え、0.5 emb./μl にした。SDS-PAGE のために 75°C で 5 分の熱処理と超音波処理を BioRuptor® (COSMO BIO)を用いて行った。

SDS-PAGE による分離

Mini gel で SDS-PAGE を行った。分離ゲル (10% Acrylamide, 0.375 M Tris-HCl pH8.8, 0.1% SDS)と濃縮用ゲル (4% Acrylamide, 0.125 M Tris-HCl pH8.8, 0.1% SDS) で構成されたポリアクリルアミドゲルを作成した。どのサンプルにおいてもレーンあたり 5 emb.分ずつ入れ、Buffer には SDS running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH8.3)を用いた。15 mA (cc 設定)で 2 時間電気泳動をした。

メンブレンへの転写

メンブレンは PVDF メンブレンの Immobilon FL を用いた。PVDF メンブレンをメタノールに 2 分浸した後、Ultra-pure water に 2 分浸し親水化させた。濾紙には厚めの ADVANTEC のものを用いた (No. 526 厚さ 0.70mm)。ポリアクリルアミドゲルの濃縮用ゲル部を捨て、分離ゲルとメンブレンと濾紙をスポンジと転写板で挟んだ。Western Transfer buffer を用いて 90 V の電圧を 1 時間かけ転写

した。メンブレンはラップで蓋をして TBS (20 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl) 中で、4℃で保存した。

蛍光 Western Blotting

複合タグ付加する位置による発現比較に用いたメンブレンでは、1/2 Intercept™ Blocking Buffer (Intercept™ Blocking Buffer : TBS = 1 : 1) に浸し、1 時間振とうしてブロッキングを行った。Sox11 と FLAG に対する抗体を含む 1 次抗体希釈液 (0.1% Tween-20、0.1 µg/ml Polyclonal SOX11 antibody [Rabbit, Sigma]、0.5 µg/ml Monoclonal anti-FLAG antibody [Mouse, Wako]、1/2x Blocking Buffer) につけ 2 時間振とうした。1 次抗体希釈液を捨て TBST (TBS、0.1% Tween-20) でリンスした。TBST で 5 分振とう、液替えを 4 回行った。1 次抗体として使用した Rabbit、Mouse 抗体に対する 2 次抗体を含む希釈液 (0.01% SDS、0.2% Tween-20、0.1 µg/ml anti-Rabbit IgG CF dye 680、0.2 µg/ml anti-mouse IgG CF dye 770、1/2x Blocking Buffer) にメンブレンをつけ、遮光し 1 時間振とうした。その後、1 次抗体反応後と同様に TBST でリンスと洗浄を行った。振とう時は遮光した。メンブレンを TBS でリンスし、TBS につけてアルミホイルで遮光した。Odyssey CLx でメンブレンをスキャンし、蛍光を検出した。その後、リファレンスとして 1 次抗体希釈液の抗体を α -Tubulin に対する抗体を使用し、同様に行い 2 次抗体では anti-mouse 抗体を用いた反応後、もう一度リファレンスとしてスキャンした。メンブレンはアルミホイルで遮光し、TBS 中 4℃で保存した。

本研究で使用した Primers

Primer	sequence
qChIP-zf-hesx1-pro.F1	TAAAAGCAGCCAAGCAGCCAAC
qChIP-zf-hesx1-pro.R1	ATGCTCGGCTTCACAAAAGCAC
sox11a-over(-327)_F	TCTCTCCTTTAGTCTAACGGATCCTG
sox11a-over(+302)_R	TGTATTTGTAGTCGGGGTAGTCAGC

参考文献

- Brizzard, B. (2008). Epitope tagging. *BioTechniques*, 44(5), 693–695. <https://doi.org/10.2144/000112841>
- Einhauser, A., & Jungbauer, A. (2001). The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1), 455–465. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00213-5)
- Lambert, C. J., Freshner, B. C., Chung, A., Stevenson, T. J., Bowles, D. M., Samuel, R., Gale, B. K., & Bonkowsky, J. L. (2018). An automated system for rapid cellular extraction from live zebrafish embryos and larvae: Development and application to genotyping. *PLOS ONE*, 13(3), e0193180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193180>
- 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 Research*, 25(10), 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(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00089-6)
- Zhang, X., Zhang, Z., Zhao, Q., & Lou, X. (2019). Rapid and Efficient Live Zebrafish Embryo Genotyping. *Zebrafish*, 17(1), 56–58. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1796>

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卒業論文など様々な面でご指導ご鞭撻を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また研究室の皆様にも採卵やゼブラフィッシュの管理など心より感謝申し上げます。

最後に大学生活を送る上で一番身近で支えていただいた家族深く感謝申し上げます。