

小型魚類を利用した網羅的な転写制御カスケード同定法の開発

●蒲池 雄介

大阪大学大学院 生命機能研究科

〈研究の目的と進め方〉

遺伝子発現ネットワークの主要なステップである「転写因子→標的配列→標的遺伝子の発現」という転写制御カスケードを効率的に解析していくことが、今後のゲノム生物学における重要な課題の一つである。転写因子の標的配列を含むゲノムDNAは、多くの場合エンハンサーとしての活性を持つと考えられる。本研究は、クロマチン免疫沈降法により転写因子の*in vivo*結合配列を回収する手法と、エンハンサー活性の可視化法を組み合わせ、網羅的な転写制御カスケード同定法を開発を目指して実施した。トランスポゾンによる遺伝子導入法と小型魚類の利点をいかして、トランスジェニック法でありながらエンハンサー活性の可視化を効率的におこなう手法を取り入れ、制御標的配列を生体内での機能に基づいて選別するシステムを構築することにより、網羅的な転写制御カスケード同定法を開発をおこなう。本研究では転写因子の具体例として、HMGドメイン転写因子SOXを取り上げる。このうち、グループB1に属するSOXは、神経系と感覚器の発生に重要な役割を果たしていると考えられるが、その標的遺伝子の多くは明らかになっておらず、その同定が急がれている。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) ゼブラフィッシュのグループB1 *sox*遺伝子のcDNAを網羅的にクローニングし、それらの発現パターンを詳細に解析する。
- 2) クロマチン免疫沈降法に必要な抗B1 SOX抗体を調製するとともに、ゼブラフィッシュ胚を用いたクロマチン免疫沈降法の確立をおこなう。
- 3) エンハンサー活性を検出するための蛍光タンパク質レポーターコンストラクトをSleeping Beauty (SB) トランスポゾンベクター上で構築する。
- 4) 抗B1 SOX抗体を用いて、ゼブラフィッシュ胚においてクロマチン免疫沈降法をおこない、回収されたDNA断片のライブラリーを上記のベクターを用いて作製する。
- 5) ライブラリーをSBトランスポゾンシステムによりゼブラフィッシュに遺伝子導入し、次世代の胚において、回収されたDNA断片のエンハンサー活性の有無を調べる。また、トランスポゾンによる遺伝子導入法の改良をおこない、導入効率をたかめる。

〈研究期間の成果〉

- 1) ゼブラフィッシュのグループB1 *sox*遺伝子として、すべての脊椎動物に共通の*sox1a/b*, 2, 3と魚類でのみ見出される *sox19a/b*が得られた。発現パターンの解析を行ったところ、*sox19a*と*sox19b*が神経系原基のほぼ全体で発現されるとともに、グループB1の他の*sox*遺伝子が、神経系の様々な領域で重なりをもちながら発現されることがわかった。このようなゼブラフィッシュのグループB1 *sox*遺伝子の発現パターンは、鳥類や哺乳類における各遺伝子の発現パターンとはかなり異なる

ることがわかった。(論文1)

- (2) クロマチン免疫沈降法に必要な抗SOX抗体の調製をおこなった (SOX1, SOX2, SOX3に特異的な抗体、およびグループB1 SOXすべてを認識する抗体)。これらの抗体が、免疫沈降法に使用できることを既知のターゲットを用いて確認した (ゼブラフィッシュには既知のターゲット遺伝子がないため、この実験には既知のターゲットがあるニワトリ胚を利用した)。
- 3) エンハンサー活性を検出するためのVenusレポーターコンストラクトをSleeping Beautyトランスポゾンベクター上で構築し、エンハンサー活性の検出に使用できることをゼブラフィッシュ胚で確かめた。
- 4) ゼブラフィッシュ胚を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、回収されたDNA断片をレポーターベクターに挿入し、サブライブラリーを作製した。
- 5) 現在、回収されたDNA断片の転写制御活性を検討するために、トランスポゾンによる遺伝子導入を行っている。また、トランスポゾンによる遺伝子導入法の改良をおこなうなど、本計画に必要なとされる基本的な実験条件の設定が終了した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

転写制御のカスケードを効率よく同定する手法は、世界的に見てもいまだに開発段階にある。本手法は胚発生の過程で働く転写因子に特に有用であると考えられるが、原理的にはどのような転写因子にも応用できることから、その確立は遺伝子ネットワークを解明する大きな力になると期待できる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

クロマチン免疫沈降法の最適化が必ずしも出来てない可能性がある。ゼブラフィッシュの初期胚は、卵黄部が大きな部分を占めるため、実験操作上困難な点がある。

〈今後の課題〉

網羅的なターゲットの同定には、本システム全体の最適化を図る必要がある。そのために、ネスチンエンハンサーなどの既知のターゲットエンハンサーをもったトランスジェニックフィッシュを作製し、それを指標にして各ステップの効率を高める予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H., Kamachi, Y. (2006) Comparative genomic and expression analysis of group B1 *sox* genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev. Dynam.* (in press)