

# ゼブラフィッシュ胚を用いた特定の遺伝子座の可視化

プロジェクト代表者：川村哲規（理工学研究科・助教）

## 1. 研究目的

DNA は間期の核内において高度に凝集された染色体として存在する。遺伝子発現の制御機構を理解する上で、凝集された染色体から必要な遺伝情報を適切に取り出す分子メカニズムを明らかにすることが重要である。最近の研究から、核内部での遺伝子座の位置取りをドラスティックに変化させ、遺伝子の発現を制御することが示唆されている<sup>1,2</sup>（図1）。しかしながら、これまでの解析は培養細胞系を用いたものが主であり、生物の個体で遺伝子座がどのような挙動を示すのかについてほとんど知見が得られていない。筆者は、DNA 結合能を持たせた改変型蛍光タンパク GFP-lacI と、lacI タンパク質が直接結合する DNA 配列(*lacO*)に目的の遺伝子の制御領域をつないだゼブラフィッシュ胚を作製することで、特定の遺伝子制御領域を可視化し、別の蛍光タンパク質で核膜を標識することで、核内での相対的な位置取りを胚発生において観察することを目的とする。

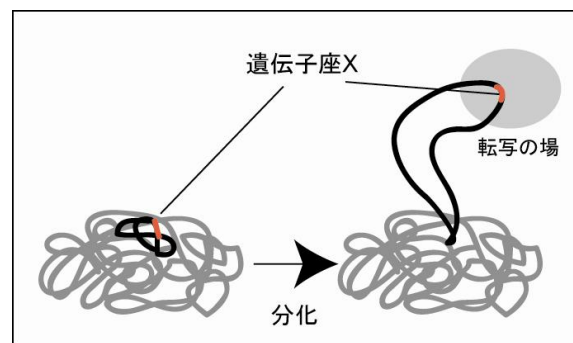


図1. 分化に伴う染色体の構造変化

## 2. 結果

遺伝子座を可視化するために、GFP-LacI/*lacO* システムを用いて行った。この系は、大腸菌由来の DNA 結合能をもつ LacI タンパク質と GFP 緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて、LacI の結合配列である *lacO* をゲノムに挿入することで、特定の遺伝子座を結合した GFP 蛍光により間接的に可視化する手法である（図2）<sup>3</sup>。まず、ゼブラフィッシュにおいてこのシステムにより可視化が可能であることを検討するために、GFP-LacI, *lacO* サイト(256 回の tandem repeat)、核膜に局在するエメリンと赤色蛍光タンパクをコードするプラスミドを作製した。その後、GFP-LacI、エメリン赤色蛍光タンパクをコードする mRNA を合成して、ゼブラフィッシュの受精卵に *lacO* サイトの DNA とともにインジェクションし、発生を進め、共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス社）を用いて、蛍光観察を行った。ここで代表的な例を示すが、原腸期（70%エピボリー期）の胚の細胞群を観察したものだが、GFP-LacI は、核移行シグナルを含み、

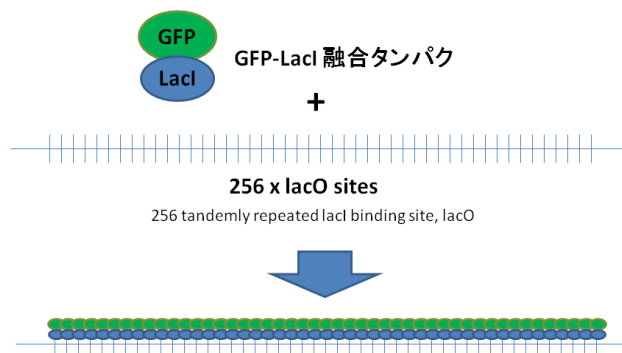


図2. GFP-LacI/*lacO* システムによる遺伝子座の可視化

通常は核に一様に存在するが、*lacO*がゲノムに組み込まれた場合には、GFP-LacIの局在がドット状に観察され、ゼブラフィッシュ胚においてGFP-LacI/*lacO*系を用いることで、特定のゲノム領域を特異的に可視化することができた。また、核内における遺伝子座の局在を詳細に観察すると、核膜に近接して存在しているものや核膜から離れた位置に存在するものなどが見られ、挿入された遺伝子座により、様々な核内局在をとることが示唆される。

これらの結果は mRNA を受精卵に導入した transient のものであるため、現在は GFP-lacI、*lacO* 配列を安定に組み込んだトランスジェニック・フィッシュを作製しており、少なくとも *lacO* 配列をもつトランスジェニック魚を 3 系統同定した。今後は、作出したトランスジェニックの受精卵を用いて、解析を進める予定である。

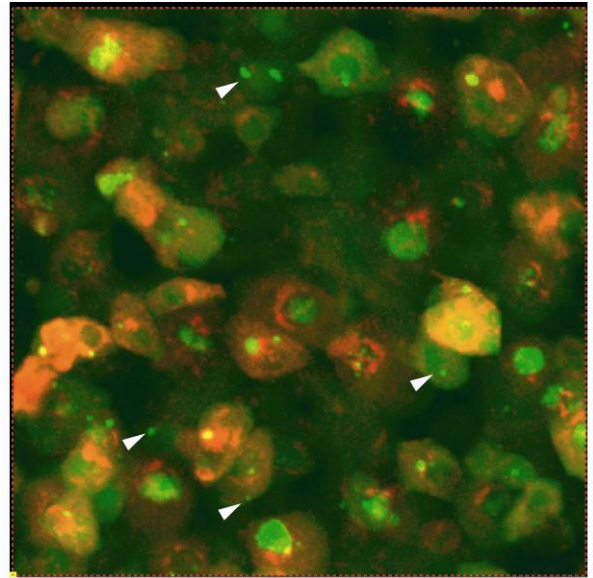


図3. GFP-LacI/*lacO*システムによるゼブラフィッシュ胚における遺伝子座の可視化

原腸胚を生きたまま共焦点顕微鏡で観察した。*lacO*がゲノムに挿入された核においては、GFP-LacIの局在がドット状に観察（矢頭）され、特定の遺伝子座を観察することができる。核膜を赤色の蛍光タンパク質で可視化することで、核内での相対的な位置取りを観察することができる。

### 3. まとめ

GFP-LacI/*lacO* 系を用いることで、ゼブラフィッシュ胚において特定の遺伝子座を可視化した。この系の最大の特色は、胚を生きたまま特定の遺伝子座を可視化できることである。このような長所を生かして、胚発生の過程で遺伝子の発現制御に関わるエンハンサーと *lacO* サイトを繋ぐことで、発現変化に伴って、核内でエンハンサーの位置取りがどのように変化していくのかについての解析を今後行っていく予定である。このような解析により、遺伝子発現における遺伝子座の核内ポジショニングの役割の一端が明らかになると考えられる。

### 4. 参考文献

1. Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E. & Singh, H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* **452**, 243-7 (2008).
2. Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. & Cremer, T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* **8**, 104-15 (2007).
3. Belmont, A. S., Li, G., Sudlow, G. & Robinett, C. Visualization of large-scale chromatin structure and dynamics using the lac operator/lac repressor reporter system. *Methods Cell Biol* **58**, 203-22 (1999).