

ゼブラフィッシュ胚を用いた核内における 遺伝子座のポジショニングのイメージング解析

プロジェクト代表者：川村哲規（理工学研究科・講師）

1. 研究目的

発生は時期及び領域特異的な遺伝子発現によって制御されている。発生過程において遺伝子発現がどのように調節されているかを明らかにすることが、発生を理解する上で重要である。最近の研究から、遺伝子座は核内部での位置取りを変化させ、遺伝子の発現を制御することが示唆されている（図1）¹。しかしながら、これまでは培養細胞系を用いた解析が主であり、生物の個体内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ない。本研究では、特定の遺伝子座を間接的に可視化するDNA結合能を持たせた改変型蛍光タンパクGFP-LacIと、それが結合するDNA領域(*lacO*)に目的の遺伝子の制御領域を繋ぐGFP-LacI/*lacO* システム法（図1）を、胚が透明でイメージング解析が可能なゼブラフィッシュ胚において確立することを目的とした。これによって胚発生における核内ポジショニングと遺伝子発現の関連について調べることが可能となる。

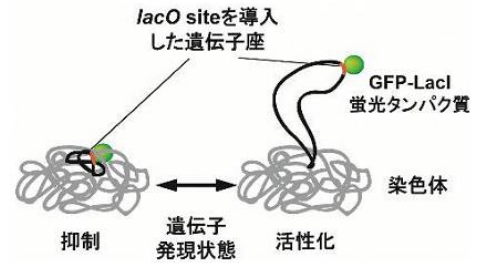


図1. GFP-LacI/*lacO*法による
遺伝子座の可視化

2. 結果

GFP-LacI/*lacO* システムがゼブラフィッシュ胚において機能するか調べるために、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かを検討するために、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ゼブラフィッシュ胚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²。その結果、核膜と思われる領域が赤色蛍光によって標識され、その内部にGFP-LacIタンパクが点状の局在が観察され、このシステムが有効に機能することが示唆された。次にこれらの遺伝子をゲノムに導入したトランスジェニック魚を*Tol2*トランスポゾンシステムによる作製

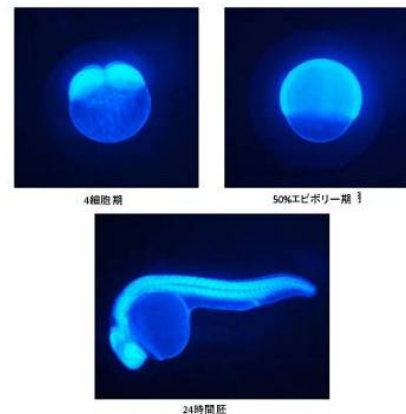


図2. *lacO-hsp8-CFP*が導入されたトランスジェニック胚の蛍光観察

を試みた。恒常的に発現する *hspa8* プロモーターの下流に CFP 遺伝子を導入し、その遺伝子を *lacO* アレイにつないだプラスミドを作製し、ゼブラフィッシュ胚にインジェクションした結果、CFP 遺伝子を発現する組換え魚が少なくとも 3 系統単離することが出来た。また、単離されたトランスジェニック胚の CFP シグナルを詳細に観察した結果、胚全体に強く恒常的に発現しており、大きな *lacO* 配列の下流に位置していても、*hspa8* プロモーターは正常に機能することが確認された (図 2)。さらに、このトランスジェニック魚の胚に、*lacO* サイト

に結合する GFP-LacI と核膜を標識する dTomato-*emerin* をコードするプラスミドを導入し、核内において導入した *hspa8* プロモーターの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、核膜と思われる領域が赤色蛍光によって標識され、その内部に点状に観察される緑色の蛍光シグナルが幾つか観察された (図 3. 矢印)。

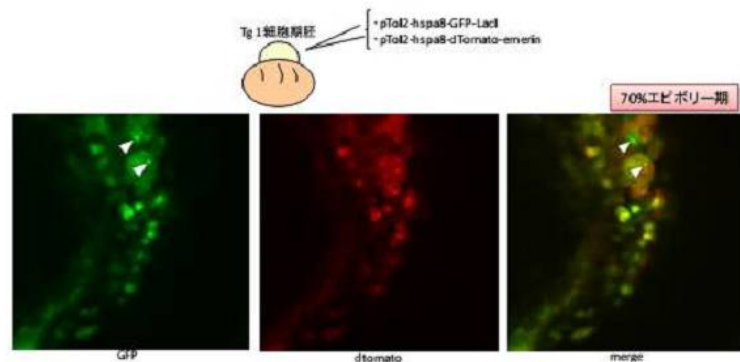


図2. *lacO-hspa8-CFP*トランスジェニック胚に、さらにGFP-LacI, dTomato-*emerin*を導入した胚の蛍光写真

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恒常的に発現する *hspa8* プロモーターをモデルとして特定の遺伝子座を可視化し、ゼブラフィッシュ胚においても有効に機能することを確認した。この系の最大の特徴は、胚を生きたまま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ことが今後予想される。

4. 参考文献

- 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).
- 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).