

ゼブラフィッシュにおける 外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発

坂 季美子（国立遺伝学研究所 技術課）

SAKA Kimiko : Development of the method to generate transgenic zebrafish stably expressing a foreign gene

To generate transgenic zebrafish highly expressing transgenes, we established a method to integrate the transgene into a putative safe harbor locus by phiC31 integrase-mediated transgenesis. The transgenic zebrafish we reported at this meeting last year had two plasmid backbones. Here we report that removal of one of them by Cre/loxP system increased the expression level of the target genes.

1. 背景と目的

トランスジェニック動物を作製する際、外来遺伝子をゲノムにランダムに組み込むと、期待通りに外来遺伝子が発現しない場合がある。外来遺伝子を高発現するトランスジェニック動物を作製するためには、発現抑制を受けにくい領域（セーフハーバー領域）に外来遺伝子を導入する必要がある。本研究では、ゼブラフィッシュにおけるセーフハーバー領域を推定し、その領域に部位特異的組換え酵素 phiC31 インテグラーゼを用いて目的遺伝子を組み込む手法を開発した。

昨年の本研究会にて、上述の手法により、セーフハーバー推定領域に目的遺伝子が導入されたトランスジェニックゼブラフィッシュの作製に成功したことを報告した¹⁾。今回、目的遺伝子の発現量増加を目指し、検討を行った。

2. 方法

昨年報告した方法により作製したトランスジェニックゼブラフィッシュは、セーフハーバー推定領域に、転写因子 Gal4 結合配列 UAS につながれた還元酵素 NTR(nitroreductase)遺伝子、赤色蛍光タンパク質遺伝子 mScarlet が組み込まれていた。更にこれらの下流に、EF1α プロモーター、GFP、2つのプラスミドバックボーン、3つの loxP 配列が配置されていた（図1）¹⁾。プ

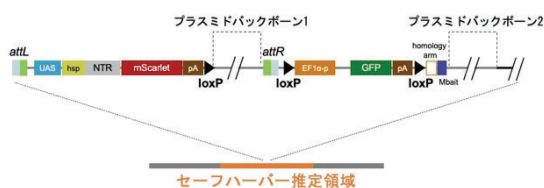


図 1. セーフハーバー推定領域に導入された外来遺伝子の構

ラスミドバックボーン配列の重複が、その周辺の遺伝子の発現量に影響を与えていることが考えられるため、Cre/loxP システムにより、プラスミドバックボーン 1 を含む loxP で挟まれた領域を除去し、mScarlet の発現量が変化するか否かを調べた。

3. 結果

上述のトランスジェニックゼブラフィッシュは、配属先研究室が保有する筋肉特異的に Gal4 を発現する遺伝子トラップシステムと掛け合わせ、ダブルトランスジェニックフィッシュとした。

このダブルトランスジェニックフィッシュ由来の受精卵に、Cre mRNA を顕微注入し、筋肉特異的に mScarlet を発現する稚魚を単離した。これらを成魚になるまで育て、掛け合わせをし、次世代の中から mScarlet を強く発現する個体を得た。これらの個体からゲノム DNA を抽出し、PCR とシーケンス解析を行ったところ、プラスミドバックボーン 1、attR、EF1α-GFP を含む 3 つの loxP で挟まれた領域の除去が認められた（図 2）。

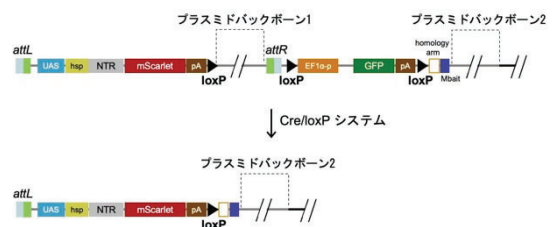


図 2. Cre/loxP システムによる loxP で挟まれた領域の除去

loxP で挟まれた領域を除去したトランスジェニックフィッシュと、除去する前のトランスジェニックフィッシュにおける mScarlet の発現を蛍光顕微鏡下及び RT-qPCR により比較した(図 3、図 4)。その結果、loxP で挟まれた領域を除去したトランスジェニックフィッシュは、mScarlet の発現量が約 3 倍増加していることが示された(図 4)。



図 3. 五日齢のトランスジェニックフィッシュにおける mScarlet の発現 (同じ条件下で撮影)

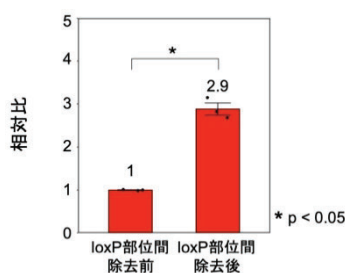


図 4. RT-qPCR による mScarlet 発現量の比較

この loxP で挟まれた領域を除去したトランスジェニックフィッシュは、前述の通り、UAS の下流に NTR 遺伝子と mScarlet 遺伝子をもつ。NTR は Mtz (metronidazole)を活性化し、活性化した Mtz は細胞死を引き起こす。そこで、このトランスジェニックフィッシュの稚魚に Mtz を投与し、筋肉特異的に機能が阻害されるか否かを検証した。

筋肉特異的に mScarlet を発現する二日齢の稚魚に 10 mM の Mtz を投与し、24 時間後と 48 時間後に観察したところ、筋肉に異常が認められた (図 5)。この結果から、作製したトランスジェニックフィッシュにおいて、NTR が十分量発現していることが示された。

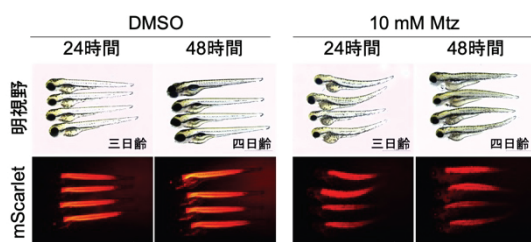


図 5. Mtz を投与したトランスジェニックフィッシュ

4. 考察

Cre/loxP システムを用いてプラスミドバックボーンを含む領域を除去したことにより mScarlet の発現量が増加したことから、プラスミドバックボーンを重複してもつ場合は、サイレンシングの影響を受けることが考えられる。そのため、本来は発現抑制を受けない領域に目的遺伝子が組込まれているにもかかわらず、発現量が抑えられている可能性がある。

現在、phiC31 インテグラーゼによる遺伝子導入の際 Cre mRNA も共注入し、一段階で loxP 部位間の配列が除去されたトランスジェニックフィッシュが得られるかどうか検討を行っている。

謝辞

ご指導いただいた国立遺伝学研究所・発生遺伝学研究室の川上浩一教授をはじめ、研究室の皆さまに心より御礼を申し上げます。

本研究は令和 4 年度科学研究費補助金 (奨励研究:課題番号 22H04263) の助成を受けて実施いたしました。

参考文献

1)坂 季美子 (2023) ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発 生物学技術研究会報告第 34 号 : 24-25