

(S-1)

# ゼブラフィッシュにおける 可変型遺伝子トラップ法の開発

坂 季美子（国立遺伝学研究所 技術課）

SAKA Kimiko : Development of a recombinase-mediated exchangeable gene trap system in zebrafish

The Laboratory of Molecular and Developmental Biology at the National Institute of Genetics has developed a gene trap system in zebrafish and created a large number of gene trap lines that express the transcription factor Gal4 in specific cells and organs. To use gene trap lines more effectively, we aimed to develop a new gene trap system in which Gal4 could be exchanged with other useful genes, such as Cre, by phiC31 integrase.

## 1. 目的

私の配属先である国立遺伝学研究所・発生遺伝学研究室は、モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて遺伝子トラップ法を開発し、これまでに様々な細胞や組織特異的に転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを 2000 系統以上作製したり。これらの Gal4 遺伝子トラップ系統は、バイオリソースとして国内外の研究者に提供され、幅広い分野の研究に利用されている。Gal4 遺伝子トラップ系統をさらに活用するために、本研究では Gal4 を別の遺伝子に置換できる新しい遺伝子トラップ法の開発を目指した。

## 2. 方法と結果

Gal4 の置換については、部位特異的組換え酵素 phiC31 インテグラーゼを利用することとした。phiC31 インテグラーゼは、認識配列 attP と attB の間の組換えを誘導する。そこで、Gal4 の上流と下流の 2 か所に attP 配列を配置した遺伝子トラップ系統と、Gal4 と置換えたい遺伝子とその上流及び下流に attB 配列を付加したドナープラスミドを作製する。phiC31 インテグラーゼによって 2 か所の attP-attB 間に組換えが起きれば、Gal4 が任意の遺伝子に置き換わると考えた(図 1)。まず、Gal4 を含む配列を EF1 $\alpha$  プロモーターにつなげた赤色蛍光タンパク質遺伝子 mScarlet に置き換えることを検討した(図 2)。

### (1) attP 配列をもつ Gal4 遺伝子トラップ系統の作製

従来の Gal4 遺伝子トラップ系統の作製に使用したコンストラクト(阿部ら、未発表)の Gal4 の上流と下流に attP 配列を配置した新しいコンストラクトを構築した。このコンストラクトをトランスポゾン mRNA

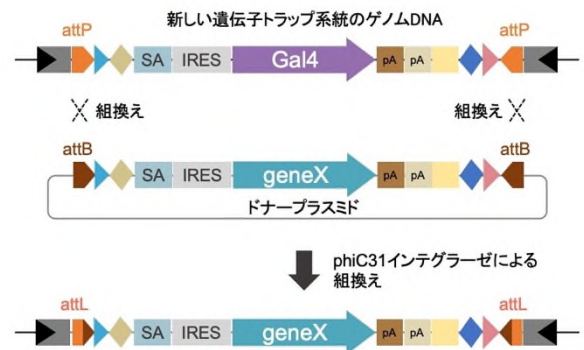


図 1. 遺伝子置換が可能な新しい遺伝子トラップシステム

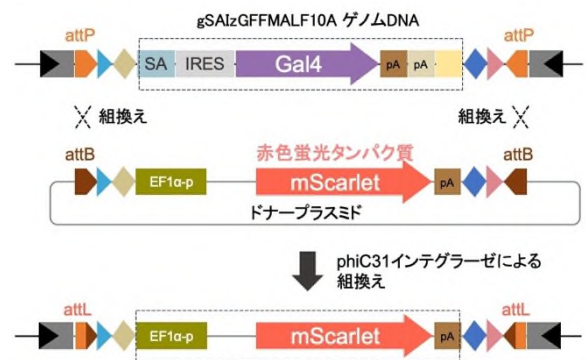


図 2. 新しい遺伝子トラップ系統における Gal4 を含む配列の EF1 $\alpha$ -mScarlet への置換

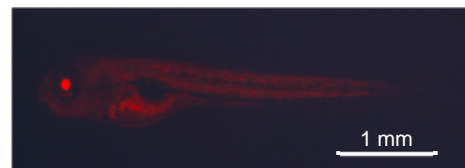


図 3. gSAIzGFFMALF10A において Gal4 を含む配列が EF1 $\alpha$ -mScarlet に置き換わった 5 日齢のトランスジェニックフィッシュ

とともに一細胞期の受精卵に顕微注入し、注入胚を成魚になるまで育て、UAS:GFP トランスジェニックフィッシュと掛け合わせた。GFP を発現する次世代が複数得られたことから、attP 配列を付加しても、Gal4 の発現に影響がないことが確認できた。現在までに、これらの新しい遺伝子トラップシステムを 91 系統作製した。

### (2)Gal4 を含む配列の EF1 $\alpha$ -mScarlet への置換

新しい遺伝子トラップシステムの中から、顎特異的に Gal4 を発現する系統 gSAIzGFFMALF10A (図 5(a))を用いて、Gal4 を含む配列の EF1 $\alpha$ -mScarlet への置換を検討した(図 2)。なお、gSAIzGFFMALF10A において、Gal4 遺伝子トラップコンストラクトがゲノム上の 1 か所のみを導入されていることをサザンブロッティングとインバース PCR によって確認した。

EF1 $\alpha$ -mScarlet の上流と下流に attB 配列を配置したドナープラスミドを phiC31 インテグラーゼ mRNA とともに gSAIzGFFMALF10A 由来の受精卵に顕微注入した。mScarlet を発現する注入胚を選抜し、成魚になるまで育て、野生型と掛け合わせて得られた次世代の中から、GFP を発現せず、mScarlet を全身で発現する個体をスクリーニングした。その結果、13 匹中 5 匹から mScarlet 陽性かつ GFP 陰性の次世代が得られた (図 3)。これらの個体からゲノム DNA を抽出し、PCR によって Gal4 を含む配列が EF1 $\alpha$ -mScarlet に置き換わっているか否かを確認した。

組換えが生じる部分を挟む形で設計した 2 組のプライマーを用いて PCR を実施したところ、PCR 産物が得られた。この PCR 産物をシーケンス解析した結果、2 か所の attP-attB 間で組換えが生じ、Gal4 を含む配列が EF1 $\alpha$ -mScarlet に置き換わっていることが明らかになった。13 匹中 3 匹から得られた次世代は、EF1 $\alpha$ -mScarlet が Gal4 と同じ向きに、13 匹中 2 匹から得られた次世代は、EF1 $\alpha$ -mScarlet が Gal4 と逆向きに置き換わっていた。

### (3)Gal4 の Cre への置換

phiC31 インテグラーゼによって、新しい遺伝子トラップシステムの Gal4 を任意の遺伝子に置換できることが示されたため、次に、gSAIzGFFMALF10A の Gal4 を組換え酵素 Cre 遺伝子に置換し、Cre が機能するか否かを検証した(図 4)。

図 4 で示した Cre を含むドナープラスミドを用いて、前述の方法に従い gSAIzGFFMALF10A の Gal4 を Cre に置換したトランスジェニックフィッシュを作製した。このトランスジェニックフィッシュを、東京科学大の

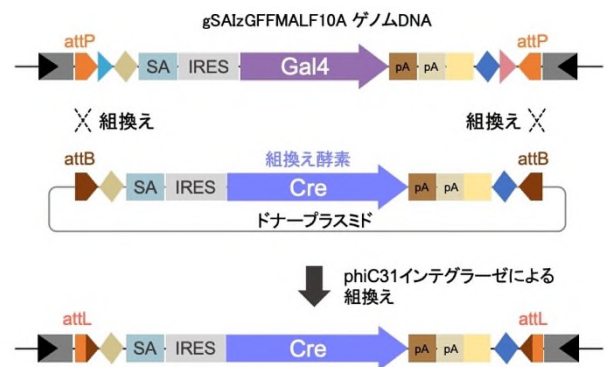


図 4. 新しい遺伝子トラップシステムにおける Gal4 の Cre への置換

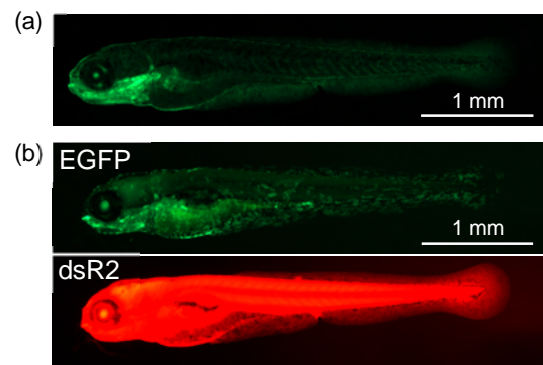


図 5. (a) gSAIzGFFMALF10A (5 日齢)  
(b) gSAIzGFFMALF10A の Gal4 を Cre に置き換えたトランスジェニックフィッシュと Tg(Olactb:loxP-dsR2-loxP-EGFP)の二重トランスジェニックフィッシュ(5 日齢)

川上 厚志 博士らによって開発されたトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg(Olactb:loxP-dsR2-loxP-EGFP)<sup>2)</sup>と掛け合わせ、二重トランスジェニックフィッシュを得た。この二重トランスジェニックフィッシュにおいて Cre を発現している細胞は EGFP を発現し、それ以外の細胞は dsRed2 を発現することとなる。

5 日齢の二重トランスジェニックフィッシュを蛍光実体顕微鏡下で観察した結果、EGFP の発現パターンが、gSAIzGFFMALF10A の Gal4 の発現パターンと一致していた(図 5(b))。このことから、Cre が組織特異的に発現し、機能していることが明らかになった。

### 3. まとめ

phiC31 インテグラーゼによって Gal4 を任意の遺伝子に置き換えることができる新しい遺伝子トラップシステムを開発した。今後、多色イメージングや疾患モデル作製等への活用が期待される。

## 謝辞

本研究は、国立遺伝学研究所・発生遺伝学研究室の川上 浩一 教授のご指導のもと行われました。伊藤 安希 技術員、白木 知也 特任助教、田辺 英幸 研究員、Amulya Vijay 特別共同利用研究員には、新しい遺伝子トラップ系統の作製にご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究で使用した *Tg(Olactb:loxP-dsR2-loxP-EGFP)* は、ゼブラフィッシュバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて提供されました。

また、本研究は令和 6 年度科学研究費補助金 (奨励研究: 課題番号 24H02585) の支援を受け実施しました。

## 参考文献

- 1) Asakawa, K., Suster, M.L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y. and Kawakami, K. (2008). Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(4), 1255-1260.
- 2) Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M., and Kawakami, A. (2012). Colored medaka and zebrafish: Transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka  $\beta$  - actin promoter. *Development, growth & differentiation*, 54(9), 818-828.