

ノックインゼブラフィッシュの構造解析

竹内 靖 (基礎生物学研究所 技術課)

TAKEUCHI Yasushi : Analysis of the genetic structure of transgenic zebrafish with a knocked-in gene

Knock-in zebrafish generation is a routine part of my work. We introduce a fluorescent protein gene upstream without disrupting the gene. Larvae from fish selected for fluorescence in the target area are subjected to analysis. As a preliminary step, we conduct PCR-based structural analysis of the region containing the fluorescent protein gene before proceeding to the main analysis .

1. 実験の概要

日常的にノックインゼブラフィッシュを作成している。遺伝子は破壊せず、上流に蛍光蛋白質を発現する遺伝子を導入する事が多い (図 1)。受精直後の 1 細胞期胚にインジェクション (2 種類の sgRNA ,donor plasmid ,Cas9 mRNA) を行う。目標の部位が光る魚を選択・飼育した後に稚魚を用いて解析を行う。解析を行う前に PCR を用いて蛍光蛋白質遺伝子が入っている部分の構造解析を行っている。具体的には入っている遺伝子の数と向き決定である。今回は経験したことない現象を経験したので報告したい。

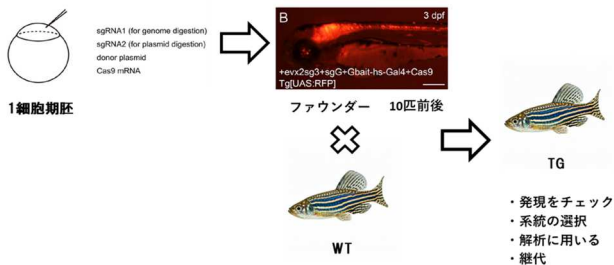


図 1

2. 実験方法

構造を決めるための PCR が確立されているので、それを利用する。具体的には標的遺伝子の前後に 1 ペア、導入した遺伝子上に 1 ペアのプライマーを作成する。それらを用いて 6 通りの PCR 反応を行い導入した遺伝子の構造を決定する。(図 2)

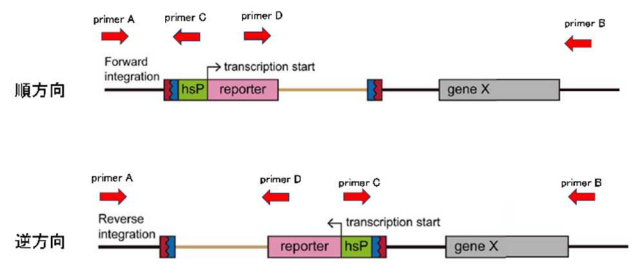


図 2

3. 解析例 1

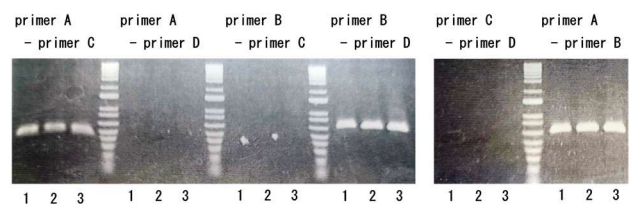


図 3

primer A, B がゲノム上、primer C, D トランスジーン上に設計してある。従って、primer A - primer C と primer B - primer D が増幅される場合はその導入方向は順向である。また、primer C, D トランスジーン上に設計してあるのでこの組み合わせの PCR 反応が増える場合は同方向に 2 個以上のトランスジーンが導入されている事を示している。primer A, B の組み合わせはポジティブコントロールである。

以上の事から、図 3 を読み解くと全てのサンプルは順方向のシングルコピーとなる。(図 4)

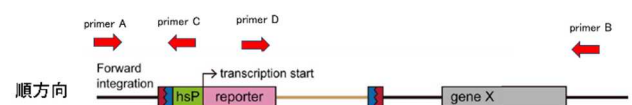


図 4

4. 解析例 2-1

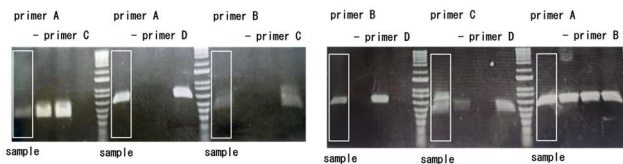


図 5

図 5 で左端のサンプルについて説明したい。このサンプルは 3 個のエンブリオから抽出した DNA から構造を解析した。このサンプルでは全ての PCR 反応が増幅している。従ってこの結果からは正確な構造は決定できない。

色々な構造が考えられるが、方向が逆のトランスジーンを含めて 3 個以上の遺伝子が入っている事になる。その 1 例を下図に示す。(図 6)

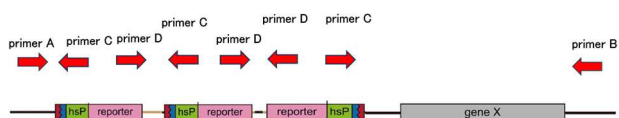


図 6

5. 解析例 2-2

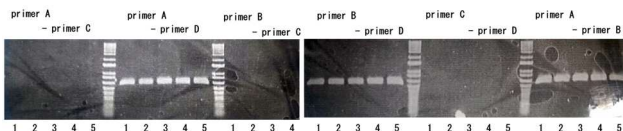


図 7

解析例 2-1 の子を解析したものが上図である。これらのサンプルはそれぞれの鱭から抽出した DNA から構造を解析した。一見して分かるように全てのサンプルが逆向き・シングルコピーである。

2-1 の解析と照らし合わせると、何が起きているのか非常に分かりにくい。

まず、前提として 2-1 は 3 匹の胚から DNA を抽出したのに対して、2-2 では成長した KI ゼブラフィッシュの鱭から抽出している。

仮説のひとつとして、2-1 のサンプルに 2 種類の構造の KI ゼブラフィッシュが入っているというものである。(図 8)

これで 2-1 は説明できる。通常 1 回のインジェクシ

ョンでは 1 つの構造しか取らないと考えがちである。ゼブラフィッシュは細胞分裂が 40 分で起こり、内部ではそれ以前に DNA の倍化が終了している。つまり見た目は 1 細胞期胚でも DNA が倍化している時間がある。そのタイミングで両方にトランスジーンが導入されたファウンダー由来であったと推測できる。

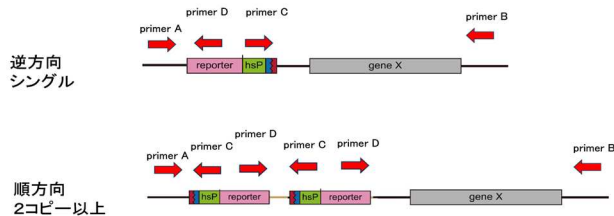


図 8

6. まとめ

- 一匹のファウンダーから 2 種類の KI フィッシュが得られた可能性が高い。
- 1 細胞期胚の後半では DNA の複製が終わり、分離が始まっている。その両方に遺伝子導入が起きた可能性が高い
- タンデムに reporter 遺伝子が入った TG は数が少ないか、成魚まで育たなかった可能性がある。

謝辞

東島研究室の皆様に感謝します。

参考文献

- 1) 2014) Yukiko Kimura et al."Efficient generation of Knock-in transgenic zebrafish carrying reporter / driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering " (Sci.rep.)