

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		Pax1 硬節エンハンサーから探る脊椎動物に特有な中軸骨格獲得機構の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		Evolutionarily conserved Pax1 sclerotome enhancer and the common roles in diverse axial skeletogenesis of vertebrates.			
研究氏 代表 者	カナ CC	ミウラ	シゲノリ	研究期間 B	2015 ~ 2017 年
	漢字 CB	三浦	重徳	報告年度 YR	2017 年
	ローマ字 CZ	Miura	Shigenori	研究機関名	京都大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 助教			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、ゼブラフィッシュを用いて enChIP 法を実施し、水棲型硬節エンハンサー zPf1 に結合する転写制御因子の単離・同定を目指した。zPf1 エンハンサー近傍の配列を標的とする TALE タンパク質 4 種をデザインし、それらを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ 4 系統を取得した。F1 胚において、TALE タンパク質の発現は FLAG 抗体を用いて確認することができたが、F2 胚ではいずれのラインにおいても TALE タンパク質の発現レベルが著しく低下しており、enChIP に適したゼブラフィッシュ系統を樹立することができなかった。一方、中軸骨格形成における zPf1 エンハンサーの役割を明らかにするため、TALEN を用いてゼブラフィッシュ zPf1 欠失変異体の作製を試みた。TALEN インジェクション胚は、受精 24 時間後においてエンハンサー配列の欠失を PCR により確認することができた。受精卵 200 個に対してインジェクションを実施し、成魚まで生育した 28 匹について typing を行なったが、いずれにおいてもエンハンサー配列の欠失が認められなかった。CRISPR/Cas9 を用いても同様の結果であったことから、zPf1 エンハンサーを欠失したゼブラフィッシュは生育する過程で何らかの原因で致死になっていると考えられた。そこで、当初の計画には含まれないが、Pf1、Xe1、2つのエンハンサーをそれぞれ欠失したマウス変異体を CRISPR/Cas9 を用いて作製した。これらのエンハンサー欠失マウスでは、体節における Pax1 発現パターン及び脊椎形成に異常が認められ、Pax1 ノックアウトマウスと関連した表現型をそれぞれ示した。現在、進化上保存されたこれら2つの Pax1 硬節エンハンサーの役割と意義について引続き検証を行っている。</p>					
キーワード FA	Pax1	エンハンサー	硬節	enChIP	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要 EZ

We attempted to isolate and purify transcriptional regulatory factors that bind to Pf1 enhancer by utilizing engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) with zebrafish embryos. Using tol2 transposon system, we obtained 4 kinds of transgenic zebrafish line expressing FLAG-TALE protein that recognizes different zPf1-flanking sequence, respectively. TALE protein expression was confirmed using anti-FLAG antibody in F1 embryos but unexpectedly the expression was undetectable in F2 embryos with which enChIP was supposed to be performed. This lack of TALE expression made it difficult to carry out enChIP analyses with these zebrafish lines. In order to reveal the role of zPf1 enhancer in vertebral column formation, pairs of TALEN were microinjected into the fertilized zebrafish embryos to create deletion of zPf1 enhancer. Among 200 embryos only 28 embryos grew to maturity but neither of them showed zPf1-deleted genotype in PCR analysis. Similar results were observed when CRISPR/Cas9 system was used to delete zPf1 sequence, suggesting the possible lethality of zebrafish lacking zPf1 enhancer. We currently generated the Pf1 or Xe1 homozygote mutant mice and are analyzing functional roles of these enhancers during the formation of axial skeleton in vertebrates.