

Title	GAL4-UAS expression system in zebrafish using the combination of GAL4 activators with attenuated toxicity and enhancer trapping
Author(s)	小倉, 絵里
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49295">https://hdl.handle.net/11094/49295</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 お 小 倉 絵 里

博士の専攻分野の名称 博 士 (生命機能学)

学 位 記 番 号 第 2 2 1 7 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 20 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

生命機能研究科生命機能専攻

学 位 論 文 名 GAL4-UAS expression system in zebrafish using the combination of GAL4 activators with attenuated toxicity and enhancer trapping  
(低毒性の GAL4 転写活性化因子とエンハンサートラップ法を利用したゼブラフィッシュにおける GAL4-UAS 発現システム)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 近藤 寿人

(副査)

教 授 河村 悟 教 授 濱田 博司

### 論 文 内 容 の 要 旨

A commonly used strategy for analyzing the function of a gene in the developing embryo is exploring phenotypic consequences of misexpression of the gene itself or its variants. In *Drosophila*, the GAL4-UAS system has been routinely used for misexpression in a tissue- and stage-specific manner. Recently, zebrafish has become a widely used model organism for studying vertebrate development. However, a technique to achieve spatial and temporal transcriptional control has been limited in zebrafish.

In this study, I have established the GAL4-UAS mediated enhancer trap method utilizing the SB transposon system in zebrafish. I found that in most cases GAL4VP16, which is the fusion protein of the yeast GAL4 DNA binding domain and the VP16 activation domain, caused developmental defects in zebrafish embryos even when its expression was mediated by enhancer trapping. Because toxicity of GAL4VP16 appears to mainly result from the highly active nature of VP16, I have constructed modified GAL4 fusion activators using the VP16 minimal activation domain and the NF- $\kappa$ B p65 activation domain.

To examine toxicity of the modified GAL4 activators, we observed morphology of embryos that had been injected with these mRNAs. When modified GAL4 activator mRNAs were injected at the concentration at which GAL4VP16 caused developmental defects, injected embryos developed normally. Then, we assessed transactivation potential of the modified GAL4 activators in zebrafish embryos by Luciferase assay. These modified GAL4 activators showed sufficient transactivation potential for the use in zebrafish.

By employing these modified GAL4 activators, I have succeeded in generating GAL4 enhancer trap lines that did not show any developmental defects. Especially, the use of two types of modified GAL4 activators that contained the dimerized VP16 minimal activation domain or the NF- $\kappa$ B p65 activation domain in combination with an appropriate promoter enable us to generate enhancer trap lines that can activate tissue-specific expression of reporter genes mediated through the GAL4-UAS system without background expression. I conclude that my improved GAL4 activators constructed in this study are suitable for binary expression systems in zebrafish.

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、脊椎動物ではじめて、GAL4-UAS 系による有効な遺伝子発現制御システムを確立した。遺伝子発現の可視化が容易で、遺伝学的な手法が機動性に富んだゼブラフィッシュを用いて、様々な特異性で GAL4 関連転写活性化因子を発現するエンハンサートラップ系統を樹立した。これらの系統の作出には Sleeping Beauty トランスポゾンを用いるなどの創意工夫がある。

ゼブラフィッシュ胚で十分な活性をもつとともに細胞毒性が抑制された、GAL4 由来転写活性化因子をデザインすることに研究の力点があった。GAL4 そのものはゼブラフィッシュ胚では活性が低すぎ、よく用いられる GAL4-VP16 は細胞毒性が著しく、胚発生の研究には適さない。申請者は、VP16 の活性化コア領域のみを多量体化して GAL4 の DNA 結合領域につなげるなどの方法で、初期の目標を達成した。

トラップ系統における GAL4 由来転写活性化因子の発現特異性が、トランスポゾン挿入ゲノム部位の近傍にある内在遺伝子の特異性を反映する例を明らかにして、本研究においてデザインされた遺伝子活性操作系が、実際にエンハンサートラップによるものであることも示した。

本研究は、脊椎動物の発生遺伝学に斬新な方法を導入したものであり、学位に値するものと認める。