

Establishment of a live zebrafish embryo genotyping method and its application to genome editing

ゼブラフィッシュの遺伝型を調べる際には、成体の尾鰭を切断してゲノム DNA を調製するフィンクリップ法が一般的に利用される。しかし、この方法は成体になるまで飼育する時間とコストがかかるだけでなく、遺伝子改変実験では多数の F0 や F1 個体の飼育が必要になるという課題もある。これらの問題を解決するために、生きている胚の状態での遺伝型の判別を行う方法が複数存在するが、必ずしもその利用は広まっていはいない。その中でもプロテイナーゼ K を利用して胚表面組織から細胞を剥離して DNA を回収する方法は、簡単に大量のサンプルを低コストで処理できる利点があり、専用の機械が必要になる方法と比べても実験が行いやすい。一方、DNA 検出率と胚に損傷が生じるという問題があった。

そこで、本研究では細胞の分散に広く利用されるトリプシンを用いて、反応バッファー、反応条件、検出方法などを至適化することで、胚に対する影響を最小限に抑えた DNA の調製法と遺伝型の判別法の確立を目指した(図 1)。さまざまな調製条件を比較したところ、ゼブラフィッシュ 3 日胚にトリプシンを E2 胚飼育液(Ca, Mg 不含)に EDTA を添加する条件で反応させると、プローブ法の qPCR での検出に十分な量の DNA を得ることができた。その際 pH が 8 以上の Tris-HCl と 0.05~0.1 mM の EDTA をバッファーに加えると DNA の回収量が高まった。トリプシン処理の際には、48 ウェルプレートを用いて 400 rpm で 60 分間振動させると胚に影響を与えることなく DNA を回収することがわかった。さらに回収した反応液を 60 分間 37°C 条件下に置くことで DNA 収量が高まった。この方法で回収された DNA を用いて遺伝型の検出を行ったところプローブ法の qPCR および通常の PCR 法で遺伝型の判別が可能であった。さらに、プローブ法 qPCR のよる遺伝型の判別では、2 つの遺伝子の 4 アレルの同時判別も可能であった。

本手法を応用しゲノム編集操作を行った F0 胚の細胞の遺伝型を調べることで、生殖系列細胞でゲノム編集が生じ、そのアレルを F1 個体へ伝達することが可能な F0 個体の割合を高めることができる可能性がある。そこで、*sox11b* 遺伝子への複合タグのノックインを行うためのゲノム編集操作を行なった胚から DNA を調製し PCR を行ったところ、ノックインが生じたアレルを検出することが可能であることがわかった。今後、選別した F0 個体を飼育し、3 日胚由来の細胞と生殖系列細胞間で遺伝型の相関がどの程度あるかを調べる予定である。

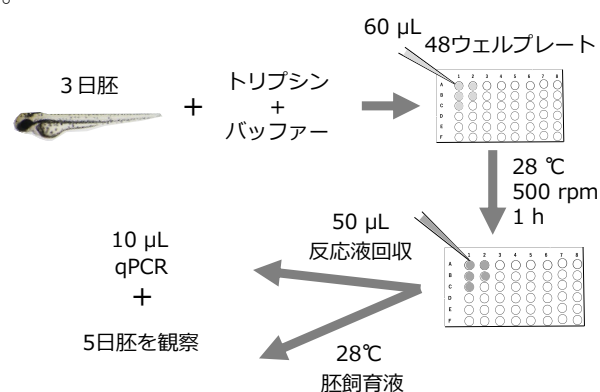


図 1 ジェノタイピング法の概要図

本研究ではゼブラフィッシュ胚とトリプシンを含むバッファーを 48 または 96 ウェルプレートに入れ 28 °C 400 rpm 1 時間でトリプシン処理を行い、反応後溶液を回収して qPCR を行うことでジェノタイピングを行った。また トリプシン処理後の胚は 28 °C で 2 日間飼育してトリプシン処理による影響を観察した。