Y 染色体イメージング法による家畜哺乳動物の雌雄産み分け技術の開発

徳島大学大学院医歯薬学研究部総合研究支援センター動物資源研究部門・助教　岡村　永一

■　目　的

畜産分野では生産性向上の観点から、家畜動物の簡便で精度の高い雌雄産み分け技術が強く望まれている。しかし性選別凍結精子や受精卵のバイオプシー法といった既存の方法は、精度やコスト面で満足度が低く、新技術の開発が求められている。本研究では近年報告された CRISPR イメージング法を応用し、受精卵内で Y 染色体上の雄性特異的 DNA 領域を可視化することで、全く新しい原理に基づいた雌雄産み分け法の開発を目指した。

■　方　法

可視化の標的とする雄性特異的配列をバイオインフォマティクス解析により探索し、特異性が高く、かつ、多コピーな 7 領域を決定した。*In vitro* transcription 法、及び、人工 RNA 合成によって dCas9-EGFP mRNA、および、gRNA を準備した。4 週齢の C57BL/6J 雌マウスに過排卵誘導処理を施し、卵管膨大部から未受精卵を採取した。これを C57BL/6J 雄マウスの精巣上体尾部から採取した精子と共培養することで体外受精を行ない、受精卵を得た。受精卵への RNA 導入は顕微注入法、及び、エレクトロポレーション法により実施した。これを CO2 インキュベーター内で体外培養し、胚盤胞期まで経時的に共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

■　結果および考察

まず、既に培養細胞内での可視化が報告されているテロメア領域を標的とした gRNA を用い、受精卵内で CRISPR イメージング法が再現可能か検討した。顕微注入法によって RNA を導入したところ、2 細胞期胚から 8 細胞期胚にかけて、核内に輝度の高い蛍光シグナルが数十確認された。このシグナルは染色体末端に配置していたことから、テロメア領域が選択的に可視化されていることが確認でき、マウス受精卵で CRISPR イメージング法が実施可能であることが示された。次に、雄性特異的配列を標的とする RNA を導入した。しかし、いずれの発生段階においても明確な蛍光シグナルは観察されず、最適な標的配列の探索には更なるスクリーニングが必要であることが示された。最後に、受精卵への RNA 導入法としてより簡便なエレクトロポレーション法が適用可能か検討した。異なる 2 種類のパルスジェネレータを使用し、RNA 濃度・電圧・パルス幅・パルス回数等の条件を検討したが、いずれの場合にも受精卵核内にシグナルは観察されなかった。従って、蛍光を検出するために十分な RNA の導入にはさらなる条件検討が必要であることが示唆された。

■　結　語

CRISPR イメージング法は新しい技術であり、哺乳動物受精卵へと応用した例は未だ報告されていない。本研究によって、初めて受精卵核内の特定の DNA 領域を可視化できることが明らかとなった意義は大きい。今後、より最適なプローブを開発することによって、雌雄判別への応用が期待される。