

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14441

研究課題名（和文）ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存と個体再生法の開発

研究課題名（英文）Cryopreservation of Drosophila genetic resource using primordial germ cells

研究代表者

田中 大介（Tanaka, Daisuke）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター・研究員

研究者番号：60425593

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエは生命科学分野の研究で欠かすことのできない遺伝資源であり、その歴史は100年以上ある。ショウジョウバエの系統は全世界で10万系統を超えるが、全て継代飼育により維持されてきた。しかし、突然変異の蓄積など研究上支障が出る場合も多い。これまでショウジョウバエ胚を凍結保存する技術が論文として発表されているが、実用的な効率で保存することができず、本研究で開発された方法が唯一である。本研究では昆虫の始原生殖細胞をガラス針で吸い取り、超低温保存し、それをホスト胚に移植して、その始原生殖細胞に由来する子孫を得ることで系統を復活させる方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝学の研究において、ライフサイクルが短く明確な形質を示すモデル生物ショウジョウバエは20世紀初頭から用いられてきた。ショウジョウバエの系統保存は生物遺伝資源確保の観点から重要性が叫ばれている。16万種類を超える系統を維持するには、莫大な労力とコストを要する。発生学の分野で研究されてきた卵や精子の元となる始原生殖細胞に着目し、超低温保存する方法論を世界に先駆けて樹立した。同様の成功例は国際的にも報告がなく、個体の性質に左右されない世界初のショウジョウバエ保存技術である。本成果により、ショウジョウバエの系統維持が飛躍的に効率化され、国際的に貢献を果たすものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Using vitrification protocol, we successfully cryopreserved primordial germ cells from intact Drosophila embryos. This protocol appears to be a promising technique for cryopreservation of Drosophila genetic resources.

研究分野：生物資源保全学

キーワード：昆虫遺伝資源 ショウジョウバエ 始原生殖細胞 PGC 超低温保存 凍結保存 ガラス化 急速冷却

### 1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエ(以下、ショウジョウバエ)ゲノム情報データベース等が完備され、遺伝学的手法を用いて遺伝子機能を解析する格好のモデル生物であるため、生命科学分野の研究で欠かすことのできない遺伝資源であり、その歴史は100年以上ある。ショウジョウバエはライフサイクルが短く、2週間ごとに世代を更新する必要がある(24世代/年)。ショウジョウバエの系統は全世界で16万系統を超えるが、全て継代飼育により維持されてきた。しかし、突然変異の蓄積など研究上支障が出る場合も多い。これまで、ショウジョウバエの受精卵(長径0.5mm/短径0.2mm)に氷晶防止剤を浸透させ凍結保存する試みがなされてきたが(Mazur et al.) 解凍後の生存率が著しく低く、技術の確立には至っていない。これは、大きなサイズの卵を凍結する際の氷晶の生成によるものと考えられてきた。したがって、凍結保存技術の開発はここ数十年の悲願である。また、昆虫遺伝資源を安定的に長期保存する手法が開発できれば、ミバエなどの農業上有用な昆虫遺伝資源の長期保存法の開発に役立つと考えられる。

### 2. 研究の目的

ショウジョウバエの系統保存は生物遺伝資源の確保という観点から、特にその重要性が叫ばれている。しかしながら、系統の継代飼育においては、実験生物として有効な短いライフサイクルが、保存のコストや手間を増やす要因となっている。生命現象における遺伝子機能の解明からヒト疾患モデルとしての創薬ターゲットの探索まで、医学・生物学に対するショウジョウバエの貢献は大きい。系統を維持するには、莫大な労力とコストを要する。飼育中の突発的な事故等のリスクによる不安定性は研究活動の障害となっている。貴重な生物遺伝資源をフル活用して、最先端の医学・生物学に貢献するためには、ショウジョウバエに関する系統維持の安定化と効率化を可能とする技術がどうしても必要であった。

ショウジョウバエ受精卵は低温や凍結に対する耐性が低く、受精卵を凍結保存しようとする試みが報告されてきたが、これまで実用的な凍結保存に成功した例はない。ショウジョウバエの精子や卵子の元となる始原生殖細胞(Primordial Germ Cells: PGCs)は、発生学の研究分野において研究が進められているが、生物遺伝資源保存という観点で実験に用いられたことはない。そこで、これらの問題を克服するとともに、安定的に系統を保存するために、始原生殖細胞を凍結保存し、必要に応じてホスト個体に戻し子孫を得ることにより系統を復活させる新技術の開発を目的に研究をおこなった。

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエの始原生殖細胞を用いて超低温保存をおこなった。

産卵後 25±25 分の胚を定法により採卵した。続いて、25 で 100 分間インキュベートし、始原生殖細胞を形成させた。この結果、産卵後 125±25 分の胚が得られた。なお、ショウジョウバエの場合、産卵後 90 分で始原生殖細胞が形成される。また、産卵後 130 分で細胞化が開始され、産卵後 180 分で陥入が開始する。卵をメッシュ上に集め、卵殻を取り除き、ピンセットで卵をスライドガラス上の両面テープ上に並べ、シリカゲルを用いて乾燥させた。卵の上からシリコンオイルを滴下した。内径 10 ~12 μm のガラスキャピラリー針を用いて始原生殖細胞を吸い取った。スライドガラス上の両面テープ上に並べた約 10 個の胚から卵や精子の元となる始原生殖細胞を連続して吸い取った。ショウジョウバエ初期胚の後極からガラス製キャピラリー(毛細管)で採取し、胚の外側に始原生殖細胞を排出した。始原生殖細胞に等容量の氷晶防止剤を混合し、余分な氷晶防止剤を吸い取った。続いて、始原生殖細胞と凍結保護剤との懸濁液をガラスキャピラリーに吸い取り、集めた始原生殖細胞をキャピラリー内で氷晶の形成を抑え細胞が破壊されるのを防ぐガラス化処理する。具体的には、ガラス針ごと液体窒素中で急速冷却させガラス化(超低温保存)する。凍結防御剤として、DMSO、エチレングリコール、グリセロール、ショ糖、トレハロースを組み合わせてガラス液を作成した。

融解後に、別の胚(ホスト胚)に移植してホスト由来の始原生殖細胞が、卵または精子に分化し、交配によってドナー由来の子を産生できる検討した。

### 4. 研究成果

ショウジョウバエの卵に極く僅かに包含される「始原生殖細胞」に着目し、液体窒素を用いた超低温保存する方法論を世界に先駆けて樹立した。

凍結保護剤による処理と温度管理を厳密にした急速冷却法によりガラス化(非晶質)を進展させると凍結時のダメージが最小限になる。同時に、内径 10 ~12 μm のガラスキャピラリー針を用いた急速冷却(ガラス化)技術は保存細胞を利用する際に、室温程度に温めたシリコンオイル中で始原生殖細胞を急速に融解し、ホスト胚の後極に移植することができる。ガラスキャピラリー針を用いると、超急速昇温が可能となり始原生殖細胞の融解が安定的に進むという効果を生む。

最適な凍結保護剤の種類、濃度は、エチレングリコールを 20v/v% 含有し、スクロースを 1mol/L 含有するガラス化液が、特に移植の効率がよく、ドナー由来の F1 を産生する割合も高いことが明らかになった。これにより汎用性が高く(低細胞毒性)、高い生存率が得られる昆虫専用ガラス化液を開

発した。この結果は、実験例の凍結保存方法が十分に実用的である。

また、冷却速度、昇温速度等の条件検討をおこない最適処理条件を明らかにした。

超低温で保存した始原生殖細胞は、融解後正常な卵や精子に分化し、この始原生殖細胞を移植した雄と雌とを交配させることにより、元の系統の復元に成功した。超低温保存を行ったドナー由来 F1 ショウジョウバエの産生率はおおよそ半数であった。この産生率は、超低温保存せずに極細胞をホストに移植して得られるドナー由来 F1 産生率とほぼ同等の効率といえる。これは、ショウジョウバエ・コミュニティにとって画期的な保存技術となる。

本研究成果は、始原生殖細胞の凍結保存法および移植技術による系統復元技術は、世界にあるショウジョウバエの3大ストックセンターの1つである京都ストックセンターに技術移転され、実用化を目指し取り組まれている。これは、世界で初めての試みであり、国際的に貴重な生物遺伝資源の安定的な保存に貢献することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Miho Asaoka, Yurina Sakamaki, Tatsuya Fukumoto, Kaori Nishimura, Masatoshi Tomaru, Toshiyuki Takano-Shimizu\*, Daisuke Tanaka\*, and Satoru Kobayashi\* (\* Corresponding Authors): Offspring production from cryopreserved primordial germ cells in *Drosophila*. *Communications Biology* 4: 1159, 1-7, (<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02692-z>), October 2021.

[学会発表](計4件)

酒巻由梨奈、福元達也、田中大介、浅岡美穂、小林悟(2017)ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術の開発、動物学会

田中大介、福元達也、酒巻由梨奈、浅岡美穂、小林悟(2019)昆虫始原生殖細胞の超低温保存技術の確立、Cryopreservation Conference 2019

Miho Asaoka, Yurina Sakamaki, Tatsuya Fukumoto, Kaori Nishimura, Masatoshi Tomaru, Toshiyuki Takano-Shimizu, Daisuke Tanaka and Satoru Kobayashi, (2021) Cryopreservation of *Drosophila* primordial germ cells, 日本ショウジョウバエ研究会

浅岡美穂、西村香里、酒巻由梨奈、福元達也、田中大介、高野敏行、小林悟(2020)ショウジョウバエ系統の凍結保存技術の実用化、Cryopreservation Conference 2022

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 昆虫系統の凍結保存方法  
発明者: 小林悟、須藤美穂、酒巻由梨奈、田中大介、福元達也  
権利者: 筑波大学、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-218731  
出願年月日: 2016年11月9日  
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 昆虫系統の凍結保存方法  
発明者: 小林悟、須藤美穂、酒巻由梨奈、田中大介、福元達也  
権利者: 筑波大学、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
種類: 特許  
番号: 特許第 6860878 号  
取得年月日: 2021年3月31日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
ショウジョウバエ系統の凍結保存法を開発  
(2021年10月)  
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20211011140000.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
田中 大介 (TANAKA, Daisuke)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター・研究員  
研究者番号: 60425593

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者 ( )