

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660270

研究課題名(和文)CAS冷却を用いたカイコの永久保存システムの構築に関する基盤研究

研究課題名(英文)Development of long term preservation for silkworm resources using CAS theory

研究代表者

伴野 豊 (Banno, Yutaka)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50192711

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)：カイコの長期保存にCAS冷却装置を応用可能であるか、受精卵と精巢を用いて検討した。受精卵ではCAS冷却による効果を認めたと、実用化に寄与するには至らないと判断された。精巢凍結には効果を認めなかった。そこで、目的達成への方法を変更し、胚子をガラス化凍結し、その有効性を検討した。その結果、カイコ胚子はガラス化凍結した後にも生存し、発育を進め、孵化することが判明した。しかし、エサである桑を食するまでには至らなかった。凍結後も生存し、孵化まで発育が進むので、今後条件を検討することで、目的達成の可能性はあると判断された。生殖層の凍結保存はエリサン、シンジュサンでも有効であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of CAS freezer was studied from the point of using long-term preservation of silkworm. It was examined using fertilized egg and testis. In fertilized eggs, the effect of CAS freezer was a bit recognized, but it was judged not to contribute to practical application. There was no effect on testis freezing. Therefore, changing the method to achieve the purpose, freezing the embryo vitrified, and tested its effect. It was shown that silkworm embryos survive even after vitrified freezing, proceeding development and hatching. However, they could not eat mulberry leaves. They survived even after freezing, and the growth progressed until hatching, so it was judged that there was a possibility of achieving the purpose by examining the conditions in the future. As second study, we evaluated the availability of the cryopreservation, which developed in the silkworm by using frozen ovary, for eri and ailanthus silkworms, and recognized positive results for both insect gonads.

研究分野：蚕糸学 家蚕遺伝学

キーワード：カイコ 長期保存 ガラス化凍結 CAS冷却 卵 生殖巢

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生殖医療や再生医療の進歩から、生殖質(精子・卵)や組織・臓器の凍結保存は全ての生物に可能な印象を与えている。しかし、その利用は哺乳類でもヒト等に限られ、昆虫では凍結障害が大きく成功例は少ない。多数の系統が存在するカイコでは古くから凍結保存に関する研究が行われ、精子や卵巣では最近、一部で可能となってきたが、蘇生率は低く改善が望まれていた。

2. 研究の目的

凍結障害は細胞中の水分子が冷凍過程で氷結晶となる際に発生する膨張等が原因とされる。本研究ではこれを回避する凍結保存方法の開発に取組む。凍結水分子を電磁場により振動させつつ冷凍させる CAS 冷却理論が注目されている。そこで、その有効性を検証しつつ、実用可能な永久保存システムの構築を目指す。また、本研究で開発した方法が他の昆虫種へも応用が可能であるか検証し、昆虫種保全にも貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

供試したカイコ系統は九州大学遺伝子資源開発研究センターで保存されている xe28 系統と p20 系統を交配した F1 世代、p24, p55 等である。エリサン、シンジュサンは信州大学より分譲を受けた。いずれもナショナルバイオリソースプロジェクトで維持されているリソースである。使用した CAS 冷却装置は(株)アビー社製 CAS フリーザー-LAB1 である。CAS 冷却は、 -30°C まで 1 分間につき、 0.5°C ずつ CAS フリーザー(株)アビー社製 LAB1) により温度を低下させ、その後液体窒素中に保存し、融解後の生存、成長の有無を確認した。ガラス化凍結実験においては、卵殻をメスで除殻し、グレース昆虫培地で培養することを基本に、種々のガラス化凍結に必要な試薬を加えた。多くの試薬の組合せを行ったので、その詳細は省略する。

4. 研究成果

本研究では、CAS 冷却はカイコの卵巣凍結保存の高度化に優れた効果があると予想して研究を計画した。まず、カイコの受精卵と精巣に関して CAS 冷却を用いて従来法と比較した。受精卵を用いた実験では、従来法では、マイナス 30°C を下回る冷却処理を行うと全て斃死した。一方、CAS 冷却装置を用いた場合は、 -30 においても、胚子がやや发育することを認めた。しかし、生存個体を得ることは出来なかった。精巣については、従来法よりも優れた結果は認めなかった。当初の予想とは異なり、CAS 凍結による凍結保存の高度化は困難であることが初年度の結果より判明したので、研究方法を変更し、ガラス化凍結を用いた凍結保存の高度化へと切り換えた。対象はショウジョウバエで凍結保存が報告されている胚子とした。ガラス化凍結では、ガラス化に必要となるエチレングリコールを主体とした凍結保護剤を胚子組織内に浸透させる必要がある。しかし、カイコには

胚子を取り囲む卵殻と呼ばれる固い組織がある。これを取り除き、胚を生かしたまま、孵化させる必要がある。この技術は簡単な操作で行えるが、どのステージが本研究に適しているかは重要なポイントである。そこで、先ずは無凍結で、カイコの胚子培養に適した時期の検討を行った。その結果、胚子发育後半のステージ 24(剛毛発生期)前後が適していることが判明した。そこで、それ以降の実験ではステージ 24 を中心に行うこととした。ガラス化凍結法を適用する場合、問題はガラス化状態を作り出す高濃度なエチレングリコールが細胞死を引き起こす点である。これを軽減する条件設定がカギである。ショウジョウバエ胚子のガラス化凍結方法(Mazur et al., 1992)を参考に条件設定を行った。0.75M エチレングリコール(EG)液で 10 分間なじませた後、2M EG 液で 20 分間、次いで 8.5M EG 液で 8 分間処理し液体窒素で凍結したところ、融解後の培養で孵化個体を得られた。しかし、孵化幼虫は摂食することなく死亡した。ガラス化液で処理後、凍結処理を行わずに培養した場合でも、孵化幼虫が摂食することなく死亡した。このことは、ガラス化液に毒性があることを示す結果である。そこで、次に、孵化幼虫が摂食し、生存が可能となるガラス化液の EG 濃度を明らかにすることにした。各設定濃度の EG 液で処理後、凍結せずに培養を行なったところ、EG 濃度が 8M 以下では摂食して 2 齢以降まで生存できる個体を観察した。摂食した孵化個体の割合は、処理した EG 濃度の増加と共に減少した。また、5M 以上の EG で処理を行なった場合は孵化幼虫に勢いが無く、发育の遅れかがみられることから、ガラス化液に用いる EG の濃度を 4M に決定した。ここで、4M EG 液は液体窒素下でガラス化しないため、次に、スクロースおよびトレハロースを加えることで、ガラス化し得る溶液を調整し、それらの溶液で処理した除殻卵からの孵化幼虫が生存できるかどうかを観察した。その結果、4M EG を含むいずれの濃度のガラス化液で処理した場合でも、孵化幼虫が摂食して 2 齢以降まで生存できる個体を得た。引続き、同条件で凍結処理(液体窒素中での凍結)を行った。胚子は凍結後も生存、成長し、孵化を行うことを確認した。しかしながら、孵化した幼虫は桑を食することなく斃死した。胚子を用いたガラス化凍結技術の開発は今後も続けるべき研究課題であると判断される。

本研究では、カイコで開発した生殖巣を用いた凍結保存をエリサン、シンジュサンで応用性を試みた。その結果、両種において凍結保存が可能であることを見出した。

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 16 件全て査読有)
Fujii T, Ohnuma A, Banno Y, Abe H.

- Structural analysis of spontaneous Z-W translocations in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. 85(3), 79-85. (2016) doi:10.11416/jibs.85.3_079
- Chen J, Xu J, Hino M, Yamashita M, Hirata K, Patil AA, Tatsuke T, Mon H, Banno Y, Kusakabe T, Lee JM. Co-expression of silkworm allatostatin-C receptor BNGR-A1 with its cognate G protein subunits enhances the GPCR display on the budding baculovirus. *J Asia-Pacific Entomology*. 19(3), 753-760. (2016) doi:10.1016/j.aspen.2016.07.007
- Fukumori H, Fujii T, Banno Y. In vitro culture and low temperature incubation tolerance of staged embryos of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Biotech Sericol*. 85(2), 49-53. (2016) doi:10.11416/jibs.85.2_049
- Fujii T, Yamamoto K, Banno Y. Molybdenum cofactor deficiency causes translucent integument, male-biased lethality, and flaccid paralysis in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 73, 20-6 (2016) doi:10.1016/j.ibmb.2016.03.008
- Hino M, Kawanami T, Xu J, Morokuma D, Hirata K, Yamashita M, Karasaki N, Tatsuke T, Mon H, Iiyama K, Kamiya N, Banno Y, Kusakabe T, Lee JM. High-level expression and purification of biologically active human IL-2 using silkworm-baculovirus expression vector system. *J Asia-Pacific Entomology*. 19(2), 313-317. (2016) doi:10.1016/j.aspen.2016.03.014
- Yuasa M, Kiuchi T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T. Identification of the silkworm quail gene reveals a crucial role of a receptor guanylyl cyclase in larval pigmentation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 68, 33-40. (2015) doi:10.1016/j.ibmb.2015.10.016
- Xu J, Zhang P, Kusakabe T, Mon H, Li Z, Zhu L, Iiyama K, Banno Y, Morokuma D, Lee JM. Comparative proteomic analysis of hemolymph proteins from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)-sensitive or -resistant silkworm strains during infections. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 16, 36-47. (2015) doi:10.1016/j.cbd.2015.07.003
- Masuda A, Xu J, Mitsudome T, Nagata Y, Morokuma D, Mon H, Banno Y, Kusakabe T, Lee JM. Mass Production of an Active Peptide-N-Glycosidase F Using Silkworm-Baculovirus Expression System. *Mol. Biotechnol.* 57(8), 735-45. (2015) doi:10.1007/s12033-015-9866-1
- Masuda A, Xu J, Mitsudome T, Morokuma D, Mon H, Banno Y, Kusakabe T, Lee JM. Improvement of Endo- β -N-acetylglucosaminidase H production using silkworm-baculovirus protein expression system. *J Asia-Pacific Entomology*. 18(2), 175-180. (2015) doi:10.1016/j.aspen.2015.01.006
- Morokuma D, Mon H, Banno Y, Kusakabe T, Lee JM. Differential N-Glycan Modifications of Human Alpha 1-Acid Glycoprotein (α 1AGP) Produced in Different Silkworm Strains using the Baculovirus Expression System. *J Insect Biotech Sericol*. 84(2), 49-53. (2015) doi:10.11416/jibs.84.2_049
- Fujii T, Abe H, Kawamoto M, Banno Y, Shimada T. Positional cloning of the sex-linked giant egg (Ge) locus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 24(2), 213-21. (2015) doi:10.1111/imb.12150
- Egi Y, Akitomo S, Fujii T, Banno Y, Sakamoto K. Silkworm strains that can be clearly destined towards either embryonic diapause or direct development by adjusting a single ambient parameter during the preceding generation. *Entomological Science*. 17(4), 396-399. (2014) doi:10.1111/ens.12073
- Yoda S, Yamaguchi J, Mita K, Yamamoto K, Banno Y, Ando T, Daimon T, Fujiwara H. The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. *Nat Commun*. 5, 4936 (2014) doi:10.1038/ncomms5936
- Kaneko F, Kawashita K, Matsumura H, Katagiri C, Ogawa N, Shirai K, Banno Y. Moisture Permeability of Cocoon Shells: Application of Thermogravimetric method to Small Biological Samples. *J Insect Biotech Sericol*. 83(2), 41-46. (2014) doi:10.11416/jibs.83.2_041
- Xu J, Kusakabe T, Yamamoto K, Suetsugu Y, Mon H, Li Z, Zhu L, Iiyama K, Banno Y, Yoshimura K, Lee JM. A novel third chromosomal locus controls susceptibility to *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(7), 3049-58. (2014) doi:10.1007/s00253-013-5437-1
- Fukumori H, Teshiba S, Shigeoka Y, Yamamoto K, Banno Y, Aso Y. Purification and characterization of cocoonase from the silkworm *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(2), 202-11. (2014) doi:10.1080/09168451.2014.878215

〔学会発表〕(計 17 件)

藤井 告, 山本和典, 田村 圭, 江口誠一, 西川和弘, 伴野 豊: クワコ染色体置換系統

とカイコの表現型の比較, 日本蚕糸学会第 87 回大会, 2017 年 03 月 22 日, 農林水産技術会議事務局 筑波産学連携支援センター (つくば市)

福森 寿善, 西川和弘, 田村 圭, 山本和典, 太田幸一, 藤井 告, 伴野 豊, 梶浦善太: 生殖巣凍結保存技術のエリサン・シンジュサンへの応用, 日本蚕糸学会第 87 回大会, 2017 年 03 月 22 日, 農林水産技術会議事務局 筑波産学連携支援センター (つくば市)
近藤 勇介, 上村 望, 溝口 喬之, 安藤 俊哉, 伴野 豊, 山本 公子, 山口 淳一, 藤原 晴彦: カイコ紋様突然変異体

Zebra(Ze:Bombyx mori)における紋様形成機構の解明, 日本蚕糸学会第 86 回大会, 2016 年 03 月 18 日, 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス(京都市)

伴野 豊, 福森 寿善, 長崎 紀代美, 簀原 由布子, 藤井 告: カイコ凍結保存技術の高度化に向けた CAS フリーザーの有効性の検証 (予報), 日本蚕糸学会第 86 回大会, 2016 年 03 月 17 日, 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス(京都市)

福森 寿善, 長崎 紀代美, 田村 圭, 山本和典, 西川 和弘, 藤井 告, 伴野 豊: 精巢を用いたカイコ凍結保存の可能性, 日本蚕糸学会第 86 回大会, 2016 年 03 月 17 日, 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス(京都市)

藤井 告, 長崎 紀代美, 福森 寿善, 山本和典, 田村 圭, 江口 誠一, 西川 和弘, 伴野 豊: 石亀蛹の遺伝学的解析と効率的保存方法の開発, 日本蚕糸学会第 86 回大会, 2016 年 03 月 17 日, 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス(京都市)

藤本 章晃, 嵯峨 新樹, 伊藤 克彦, 伴野 豊, 安河内 祐二, 佐原 健: カイコ体色遺伝子 Bm の変異系統における逆位領域の探求, 日本蚕糸学会第 86 回大会, 2016 年 03 月 17 日, 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス(京都市)

竹田津 桜, 門野 敬子, 伴野 豊, 小林 淳: クワコの蛹期間調節遺伝子同定を目的とした染色体置換カイコ系統の作製, 日本蚕糸学会第 85 回大会, 2015 年 09 月 27 日, 北海道大学農学部(札幌市)

山本 和典, 藤井 告, 田村 圭, 西川 和弘, 江口 誠一, 太田 幸一, 伴野 豊: 姫日油蚕(ohi)に見られる特異な形質発現と原因遺伝子領域の絞り込み, 日本蚕糸学会第 85 回大会, 2015 年 09 月 27 日, 北海道大学農学部(札幌市)

藤井 告, 山本 公子, 伴野 豊: キサンチン酸化酵素の注射で皮膚が不透明化する油蚕の遺伝学的解析, 日本蚕糸学会第 85 回大会, 2015 年 09 月 27 日, 北海道大学農学部(札幌市)

福森 寿善, 長崎 紀代美, 簀原 由布子, 藤井 告, 伴野 豊, 持田 裕司, 竹村 洋子: 除殻卵胚子の凍結保存の可能性, 日本蚕糸学会第 85 回大会, 2015 年 09 月 26 日, 北海

道大学農学部(札幌市)

広瀬 義躬, 横山 岳, 松尾 和典, 伴野 豊: チョウ目昆虫の卵寄生蜂のカイコ卵への寄生には卵の硬さとサイズが影響する, 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会, 2015 年 03 月 27 日, 山形大学小白川キャンパス(山形県山形市)

佐原 健, 鈴木 一生, 安河内 祐二, 伴野 豊: 染色体異系統を用いてカイコ突然変異の原因遺伝子にせまる, 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会, 2015 年 03 月 28 日, 山形大学小白川キャンパス(山形県山形市)

〔図書〕(計 3 件)

伴野 豊, 清水長正, 澤田結基, 日本の風穴, 古今書院, 2016.09.01.

新開孝(著)伴野豊(監修), ぜんぶわかるカイコ, ポプラ社, 1-68, 2015.06.01.

森脇和郎編(伴野 豊一部担当), 小さくて頼もしいモデル生物, 羊土社, 101-109, 2014.04.01.

〔産業財産権〕

なし。

取得状況

無し。

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴野 豊 (BANNO, Yutaka)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 50192711

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 協力研究者

福森寿善(FUKUMORI, Hirohisa)

九州大学・大学院農学研究院・学術研究員

研究者番号: 40774592