

ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術の開発

酒巻 由梨奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小林 悟 (筑波大学 TARA センター)

背景・目的

様々な生命現象において遺伝子の機能を解析するためには、突然変異系統や強制発現系統が重要なツールとなる。これらの系統を遺伝資源として保存し、後世に残すことは、基礎研究の発展だけでなく、育種などの産業面においても重要である。

多くのモデル生物では、遺伝資源を安全に長期間保存する技術として凍結保存が使われている。凍結保存の場合、継代維持に要する時間や労力が削減できる上、長期に渡って継代を続ける間に起こる、自然突然変異の蓄積による表現型の変化を防止できるからである。

しかしながら、ショウジョウバエでは、未だ遺伝資源を凍結保存する技術が確立されておらず、10万を超える数の系統が継代飼育によって維持されているという現状がある。したがって、ショウジョウバエの系統を凍結保存する技術の開発は、ショウジョウバエを用いる研究分野において解決すべき喫緊の課題である。

ショウジョウバエの凍結保存に関する先行研究として、胚を凍結し、融解した後に発生させ子孫を得たという報告が2報あるが^{1,2}、いずれも追試が成功しておらず、実用化には至っていない。これは、凍結に適した胚の発生ステージが狭く限定されていて条件設定が難しいことや、後述するように胚は氷晶の形成なしに凍結するサンプルとして大きすぎることが原因だと考えられている。

一般に、サンプルを凍結し融解する際には、内部に氷晶を作らずに温度を下げ、上げる必要がある。氷晶ができてしまうと、細胞や組織がダメージを受け、破壊されてしまうからである。このとき、サンプルのサイズが大きいと、氷晶の生成を防ぐのがより困難となる。ショウジョウバエの胚の大きさは短径約0.2 mm、長径約0.5 mmであり、すでに凍結保存法が確立しているマウスの受精卵(直径約0.1 mm)と比較してもかなり大きい。先行研究について追試が成功していないのは、このように大きなサイズの胚を氷晶の形成なしに凍結する(発生ステージなどの)条件の設定が非常に難しいためと考えられる。

そこで当研究室では、胚に代わるサンプルとして、より小さい始原生殖細胞に着目した。始原生殖細胞は卵や精子のもとになる細胞であり、ショウジョウバエでは、胚から始原生殖細胞を取り出し、別の胚に移植し、子孫を得る技術が確立している^{3,4}。したがって、始原生殖細胞を凍結し、保存することができれば、系統を維持することが可能になる。当研究室で始原生殖細胞の凍結および移植を予備的に試みたところ、子孫を得ることに成功した。

本研究では、この予備的な成果をもとにして、この技術を実用化に近づけることを目的として、以下の実験を行った。

1. 当研究室の先行研究の追試を行う。
2. 凍結条件などを再検討し、凍結始原生殖細胞から高効率で子孫を得る方法を開発する。

方法

まず、マイクロマニピュレーターを用いて、donor (始原生殖細胞の供与体) の胚から始原生殖細胞をガラスキャピラリーに吸い

出し、集めた。donor の胚から得た始原生殖細胞を氷晶防止剤(凍結する際に細胞内で氷晶が生成するのを防ぐ目的で用いる)と混合したのち、凍結させた。

融解後、これらの始原生殖細胞を host (宿主) の胚の後極に移植し、これを P 個体とした。この P 個体中において、donor 由来の始原生殖細胞が正常に発生する割合を以下のように調べた。

- ① donor 由来の始原生殖細胞が胚の生殖巣に入る割合
- ② 成虫まで発生させた P 個体から、donor 由来の子孫が得られる割合

本研究では、donor として *EGFP-vasa* 系統(生殖系列で EGFP を発現する *EGFP-vasa* 遺伝子および眼の赤色素合成に必要な *w* 遺伝子を持つ系統)を用い、host として *yw* 系統(*EGFP-vasa* 遺伝子と *w* 遺伝子を欠いた系統)を用いた。始原生殖細胞が卵や精子になるためには、始原生殖細胞が胚の後極から移動し、生殖巣に入ることが必須である。host 胚の中では donor 由来の始原生殖細胞のみが GFP を発現するため、donor 由来の始原生殖細胞が生殖巣に移動しているか否かを観察できる(①の実験)。また、donor 始原生殖細胞由来の子孫は *w* 遺伝子を持つため、赤目の個体として識別できる(②の実験)。

結果・考察

凍結および融解を行わず、移植のみを行ったコントロール群と同様に、凍結および融解の後に移植を行った実験群においても、始原生殖細胞が胚の生殖巣に取り込まれていることが観察された。このことは、生殖巣への移動能に異常をきたすことなく、始原生殖細胞の凍結および融解処理を行うことが可能であることを示唆している。

またその後、移植した胚を親まで発生させ、その子孫を得たところ、コントロール群と比較して、実験群でも同程度の割合で donor 由来の子孫が得られた。以上の結果は、追試が成功したことを示している。

今後の展望

凍結保存技術の実用化に向け、操作を簡便化し汎用性を高めるため、host に不妊系統の利用を試みる。たとえば、*ovo^D* (発生過程で生殖細胞を消失する変異系統) や *oskar* (生殖細胞をつくらない変異系統) などの不妊系統を host として用い、凍結融解した始原生殖細胞の移植をした場合、得られる子孫がすべて donor 由来となるため、子孫を選別する過程を省略することができる。この場合、マーカーを持たない系統を donor として扱うことも可能となる。

参考文献

1. Steponkus et al. *Nature* 345, 170-172 (1990).
2. Mazur and Mahowald et al. *Science* 258, 1932-1935 (1992).
3. Kobayashi et al. *Nature* 380, 708-711 (1996).
4. Mukai et al. *MOD* 124, 570-583 (2007).