

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) ショウジョウバエ極細胞の凍結保存法の開発
(英語) Developing cryopreservation method of Drosophila primordial germ cells

補助事業担当者 (日本語) 昆虫先端研究推進センター 教授 高野敏行
所属 役職 氏名： (英語) Center for Advanced Insect Research Promotion, Professor Takano,
Toshiyuki

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ショウジョウバエ極細胞の凍結保存法の開発
分担課題名： (英語) Developing cryopreservation method of Drosophila primordial germ cells

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人筑波大学 生命領域学際研究センター 教授 小林悟
所属 役職 氏名： (英語) University of Tsukuba, Life Science Center of Tsukuba Advanced Research
Alliance, Professor Kobayashi, Satoru

II. 成果の概要 (総括成果報告)

和文

多様なショウジョウバエ系統の効率的な保存のため、筑波大学と京都工芸繊維大学は極細胞の凍結保存を検討し、実際に極細胞の凍結保存が可能であることを示した。結果にもとづき、下記のようなプロトコールを作成した。

- 1) 内径 10-12 μm のガラスのニードルを用いて、シリコンオイル中の胚 (多核性胞胚) から極細胞を吸い取る。これを繰り返し、5つの胚から50個程度の極細胞をニードルに吸い取る。
- 2) 極細胞を氷晶防止剤と混合、余分な氷晶防止剤を除いた後、ニードルに吸い取り、ニードルごと速やかに液体窒素中で凍結する。

3) 融解は30℃に保温したシリコンオイル中で、できるだけ速やかに行う。

4) 凍結融解したニードル中の極細胞を胚（細胞性胞胚）の後極に移植し、成虫まで発生させる。

今後、実際に多数の系統を凍結保存するための課題を以下のようにまとめた。

1) 特に京都工芸繊維大学では実際の移植実験をはじめたばかりということもあり、技術の習熟度を高める必要がある

2) 凍結から移植、発生までの成功頻度を多くの系統で測定するとともに高める。安心、安定して系統保存するのに必要なニードル数を知るために必須である。実際の実験では、系統による違いも含め、成功率は変動する。この変動の幅を少なくし、効率を上げる努力をおこなう。

3) さらに多くの系統を用いての氷晶防止剤の改良の検討。これまでに試したなかでは最適の氷晶防止剤を特定しているが、さらに改良の余地は残されているかもしれない。また、系統による違いも検討する必要がある。

4) 大量のニードルを簡便に、安全に液体窒素中で保持、保存するための器具の開発。

英文

In order to preserve valuable and diverse *Drosophila* strains for a long term without mutational deterioration, we tried to cryopreserve primordial germ cells (PGCs) of *Drosophila* in liquid nitrogen. We collected and cryopreserved PGCs of two different *Drosophila* strains. We defrosted them, transplanted into host embryos, and successfully obtained multiple progeny carrying the donor genome. Based on our result, we have developed the following protocol for *Drosophila* PGC cryopreservation:

1) Repeatedly remove by suction PGCs from about five donor embryos using a single glass needle.

2) Treat the PGCs with cryoprotectant, remove excess cryoprotectant, remove again the PGCs into a new glass needle, and cryopreserve the needle in liquid nitrogen.

3) Remove the needle from liquid nitrogen storage and defrost in a 30° C **silicone-oil** bath.

4) Transplant PGCs into host embryos and let them develop.

Our study also identifies several key challenges for further development:

1) Improve PGC handling skills of operators

2) Improve the overall success rate from collecting PGCs through transplanting into host embryos and obtain the accurate estimate as well as its variance, which is vital for us to determine how many needles per line should be cryopreserved.

3) Test different types of cryoprotectants in multiple lines to get a better one.

4) Develop a holder for long-term preservation of needles in liquid nitrogen

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高野敏行、ショウジョウバエが先導する生命科学研究、産学官連携ジャーナル、2017年、3月号

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) ショウジョウバエ極細胞の凍結保存法の開発
(英語) Developing cryopreservation method of Drosophila primordial germ cells

補助事業担当者 (日本語) 昆虫先端研究推進センター 教授 高野敏行
所属 役職 氏名： (英語) Center for Advanced Insect Research Promotion, Professor Takano,
Toshiyuki

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ショウジョウバエ極細胞の凍結保存法の開発
分担課題名： (英語) Developing cryopreservation method of Drosophila primordial germ cells

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人筑波大学 生命領域学際研究センター 教授 小林悟
所属 役職 氏名： (英語) University of Tsukuba, Life Science Center of Tsukuba Advanced Research
Alliance, Professor Kobayashi, Satoru

II. 成果の概要 (総括成果報告)

和文

多様なショウジョウバエ系統の効率的な保存のため、筑波大学と京都工芸繊維大学は極細胞の凍結保存を検討し、実際に極細胞の凍結保存が可能であることを示した。結果にもとづき、下記のようなプロトコールを作成した。

- 1) 内径 10-12 μm のガラスのニードルを用いて、シリコンオイル中の胚 (多核性胞胚) から極細胞を吸い取る。これを繰り返し、5つの胚から50個程度の極細胞をニードルに吸い取る。
- 2) 極細胞を氷晶防止剤と混合、余分な氷晶防止剤を除いた後、ニードルに吸い取り、ニードルごと速やかに液体窒素中で凍結する。
- 3) 融解は30℃に保温したシリコンオイル中で、できるだけ速やかに行う。
- 4) 凍結融解したニードル中の極細胞を胚 (細胞性胞胚) の後極に移植し、成虫まで発生させ

る。

今後、実際に多数の系統を凍結保存するための課題を以下のようにまとめた。

- 1) 特に京都工芸繊維大学では実際の移植実験をはじめたばかりということもあり、技術の習熟度を高める必要がある
- 2) 凍結から移植、発生までの成功頻度を多くの系統で測定するとともに高める。安心、安定して系統保存するのに必要なニードル数を知るために必須である。実際の実験では、系統による違いも含め、成功率は変動する。この変動の幅を少なくし、効率を上げる努力をおこなう。
- 3) さらに多くの系統を用いての氷晶防止剤の改良の検討。これまでに試したなかでは最適の氷晶防止剤を特定しているが、さらに改良の余地は残されているかもしれない。また、系統による違いも検討する必要がある。
- 4) 大量のニードルを簡便に、安全に液体窒素中で保持、保存するための器具の開発。

英文

In order to preserve valuable and diverse *Drosophila* strains for a long term without mutational deterioration, we tried to cryopreserve primordial germ cells (PGCs) of *Drosophila* in liquid nitrogen. We collected and cryopreserved PGCs of two different *Drosophila* strains. We defrosted them, transplanted into host embryos, and successfully obtained multiple progeny carrying the donor genome. Based on our result, we have developed the following protocol for *Drosophila* PGC cryopreservation:

- 1) Repeatedly remove by suction PGCs from about five donor embryos using a single glass needle.
- 2) Treat the PGCs with cryoprotectant, remove excess cryoprotectant, remove again the PGCs into a new glass needle, and cryopreserve the needle in liquid nitrogen.
- 3) Remove the needle from liquid nitrogen storage and defrost in a 30° C **silicone-oil** bath.
- 4) Transplant PGCs into host embryos and let them develop.

Our study also identifies several key challenges for further development:

- 1) Improve PGC handling skills of operators
- 2) Improve the overall success rate from collecting PGCs through transplanting into host embryos and obtain the accurate estimate as well as its variance, which is vital for us to determine how many needles per line should be cryopreserved.
- 3) Test different types of cryoprotectants in multiple lines to get a better one.
- 4) Develop a holder for long-term preservation of needles in liquid nitrogen

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 0件)

該当なし

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

- (4) 特許出願
該当なし