

「未熟胚をもちいた野生イネへの遺伝子導入」

佐藤 豊（国立遺伝学研究所）

形質転換実験は、遺伝子機能の解明や遺伝子機能の改変を行う分子遺伝学実験の根幹をなす技術である。植物では、ゲノム編集やそれを含む分子育種にも不可欠なステップであり、その利用の範囲は広がりつつある。一方、植物の形質転換は実験系統や主要作物を中心に開発されているため、これら以外の植物については情報が少なく、形質転換実験を使う分子遺伝学的アプローチの研究進展に大きな妨げとなっている。野生イネは元来野生の遺伝資源であることから、栽培イネに比べるとはるかに実験材料としては扱いづらい。また、実験手技に関しての情報が少ない。このような状況において、イネコミュニティの研究者にとって、野生イネ遺伝資源を用いた形質転換法の開拓は重要である。そこで、NBRP 基盤技術整備プログラムにおいて、以下の二つの実験を行なった。（１）未熟胚を用いた遺伝子導入系への近縁・遠縁野生イネの応答を調べる。（２）野生イネにおいてもゲノム編集が可能であることを実証する。イネのゲノム編集過程では、アグロバクテリウムの感染を介した形質転換を経るが、そのためにはイネ細胞を一旦脱分化させたのち、再分化処理を行うことで植物体を再生させる必要がある。これまでの予備実験から、栽培イネで確立された再分化・脱分化の条件が必ずしも野生イネには機能しないことがわかっている。本ワークショップでは、野生イネの形質転換系を確立に関する、NBRP 基盤技術整備プログラムの成果を報告する。

「ゾウリムシ属の凍結保存技術の開発」

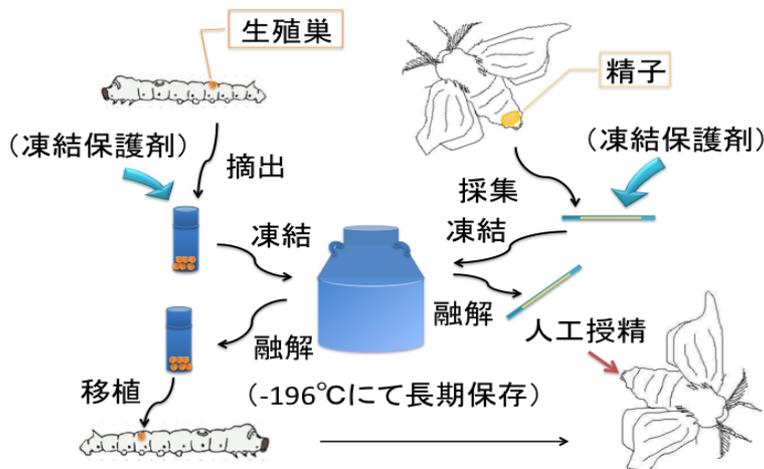
藤島 政博（山口大学）

細胞分裂回数に依存した寿命をもつゾウリムシ(*Paramecium*)属の凍結保存は、これを研究に用いる研究者の長年の夢であったが、先行研究での生存率は不安定で、実用化には改善が必要であった。ゾウリムシ属の種・syngen・接合型の標準となる株の永久保存、同一株の長期安定供給と老化の特定時期の保存と供給、継代培養期間に生じる変異蓄積の回避、宿主外培養が困難な細胞内共生微生物の宿主ごとの凍結保存を可能にするために、簡易な方法で凍結解凍後に稔性のある細胞を安定して高い生存率で得られる技術の開発を行なった。その結果、DMSO 等を含む凍結液に定常期初期細胞を懸濁し、長さ 3cm、容量 10 μ L の細いガラス管に封入して-80 度や液体窒素で急速凍結後、35 度の温湯で解凍することで、3 種 (*P. caudatum* の 7 種全ての syngen の 9 株、*P. woodruffi* 1 株、*P. bursaria* の共生クロレラを保有する 1 株)で、解凍後に安定して 10-70%の細胞が遊泳を開始し、その 10%以上をクローン化できる技術を開発した。*P. caudatum* では凍結 1 年後でも同程度の回収率で生細胞が得られ、実用化を開始した。この技術開発は、平成 29-30 年度の NBRP 基盤技術整備プログラムの支援を得て、芳賀信幸（石巻専修大学）、秋山佳丈、渡部広機（信州大学）との共同研究で実施した。

「実用段階に達したカイコの凍結保存技術とその有用性」

伴野 豊（九州大学）

カイコの長期保存は受精卵で行われるが、その可能期間は1年が限度である。このため、古くから長期保存の挑戦は試みられて来た。卵巢凍結や精巣凍結、凍結精子での保存が可能なのは1980年代後半から徐々に報告されるようになったが、低率で、実用は困難視されていた。このような中、NBRPでは第2期からカイコを対象に実用化に取り組んだ。系統保存には雌雄を対象にする必要があり、過去の研究成果から雌については卵巢を、雄については精子を対象にした。具体的な操作方法の概略は図の通りである。移植卵巢と宿主の輸卵管とが結合するかが鍵となるが、当初は、失敗の連続であった。操作方法、凍結保護剤の改善等により、改良され、現在では8割の系統で凍結保存が可能となっている。野蚕への応用も進めた結果、エリサン、シンジュサンでは卵巢、精巣を利用した保存が可能であることが判明した。テントウムシを対象に研究を行っている研究者が、我々が開発した方法を適用したところ、有効であることが示された。NBRPで実用化した技術が他の昆虫種の長期保存にも貢献できないかと期待している。



「ゲノムを一括で復元できるショウジョウバエ始原生殖細胞の
凍結保存技術」

高野敏行、西村香里、山本志織、都丸雅敏、佐貫理佳子
(京都工芸繊維大学・昆虫先端研究推進拠点・ショウジョウバエ遺伝資源研究部門)

小林悟、浅岡美穂
(筑波大学・生存ダイナミクス研究センター)

田中大介
(農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター)

現在、欧米および日本のショウジョウバエ・ストックセンターには合わせて 18 万を超える系統が維持されており、ストックセンターの保有能力の限界に近づいている。一方で、ショウジョウバエは系統作出が容易なために、さらに新たな系統の作出も精力的に進んでいる。そのため毎年、多くの系統が已むなく廃棄されている。もちろん、より“良い”系統への置換は進められるべきであるが、必ずしも置換が可能である、あるいは“不適切”として廃棄されるものばかりではない。実際、将来どのような利活用につながるか予測はいたって困難である。凍結保存は系統作出が容易であるショウジョウバエにおいてこそ、廃棄等による系統喪失を防ぎ、しかも保存中の変質、劣化も進行させないもっとも有力な保存法となりえる。そのため、2016 年度から NBRP 基盤技術整備プログラムの支援を得て、始原生殖細胞の凍結保存法の開発と実用化を進めてきた。現在、47 系統、471 本のニードルを凍結保存中である。2020 年度には、無配偶子個体を産生する変異体系統を作出し、面倒な交配なしに一括で全染色体（ゲノム）を復元できる技術へと高度化に成功した。今後は保有系統の保存だけでなく、ユーザーへの凍結保存サービスの提供を開始する計画である。

「トランスポゾンを用いた遺伝学的方法論による

有用ゼブラフィッシュ系統の開発」

川上 浩一（国立遺伝学研究所）

小型熱帯魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、(1)多数の個体の繁殖・飼育が容易である、(2)体外受精し胚が透明であるため、発生過程の胚の観察・操作が容易である、(3)世代時間が比較的短い、等の特長をもつため、脊椎動物の生命現象を遺伝学的に解析するためのモデル動物として世界中で研究に用いられている。しかしながら 1990 年代後半頃には、トランスジェニックフィッシュ作製方法は、非常に効率がわるいものであった。我々はこれまでの研究で、メダカゲノム由来の Tol2 因子を用いて、効率の良いトランスジェニックゼブラフィッシュ作製法の開発に成功した。さらに、Tol2 転移システムを用いて遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法、Gal4-UAS 法等、遺伝学的方法論の開発に成功してきた。

我々は、これらの方法論を駆使して過去 15 年間にわたって大規模なスクリーニングを行い、組織・細胞・器官特異的に Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュ系統の開発を行ってきた。これらトランスジェニックフィッシュを用いると、興味の対象である組織、細胞について自由自在に可視化、操作、活性の計測等を実施することができる。本研究では有用トランスジェニックフィッシュ系統の開発を強力に推進してきた。ここでは、我々の方法論やスクリーニングの概要とフィッシュ系統の生命科学への貢献について紹介する。

「ニワトリ始原生殖細胞の培養と凍結保存」

中村 隼明^{1,2}

(¹ 広島大学大学院統合生命科学研究科,

² 広島大学日本鶏資源開発プロジェクト研究センター)

ニワトリを含む鳥類では、卵のサイズが極めて大きいため、凍結保存が技術的に不可能である。このため、ニワトリでは、初期発生において出現する卵・精子の前駆細胞である始原生殖細胞の操作による独自の発生工学的手法が発展してきた。ニワトリでは、胚体外で出現した始原生殖細胞が生殖原基へ移動する過程で一時的に血流中を循環する。この特性を利用して、始原生殖細胞を血中から取り出して他の胚の血流中へ移植することにより、機能的な卵・精子へ分化させることができる。さらに、ニワトリ始原生殖細胞の凍結保存や培養が可能になったことにより、ニワトリリソースの半永久的な保存への道が拓かれた。しかし、ニワトリ始原生殖細胞の凍結保存液の組成はほとんど検討されておらず、改善の余地が残されていた。また、先行研究において開発されたニワトリ始原生殖細胞の培養法は一部の品種にしか適用されなかった。本ワークショップでは、NBRP 基盤技術整備プログラムにおける研究を通して改善したニワトリ始原生殖細胞の培養法と凍結保存法について実演を交えて紹介する。

「ニワトリ始原生殖細胞の遺伝子改変への応用」

西島 謙一（名古屋大学）

始原生殖細胞（primordial germ cell, PGC）は将来精子・卵子になる唯一の胚細胞である。近年ニワトリでは精製 PGC の *in vitro* 培養が可能となっており、遺伝子改変やゲノム編集への応用例が増えつつある。我々の最初の例では、PGC 特異的な発現を示す PRDM14 遺伝子座に EGFP 遺伝子をノックインしたニワトリの作製に成功している。エレクトロポレーションにより CRISPR/Cas9 とノックインベクターを PGC に共導入し、プロモーターレスのノックインベクターが内在性の PRDM14 プロモーターの制御下 EGFP を発現することを利用し、目的細胞をセルソーターにより回収した。この細胞をレシピエント胚に移植することで EGFP ノックイン PGC に由来する精子を持つ生殖腺キメラニワトリを作製した。成熟後、精子における EGFP コピー数の高い個体を野生型の雌個体と交配することによって遺伝子改変個体を得た。この系統の初期胚を解剖し、生殖腺を抗体染色したところ、PGC のマーカーである SSEA-1 陽性細胞で期待通り EGFP が発現していることが確認された。現在、NBRP で提供している様々なニワトリ系統の PGC を培養し凍結保存する事業を精力的に進めており、今後培養した PGC を利用して様々な形質を持つニワトリ系統の遺伝子改変が可能となることが期待される。

「ラット生殖工学技術の開発と研修による新規利用者拡大」

守田 昂太郎（京都大学）

第4期 NBRP「ラット」は、2019～2020年度の基盤技術整備プログラムに採択され、効率の良いラットリソースの保存法の開発と新規利用者の拡大を目的に、次の5つの課題に取り組んだ。①複数の系統から体外受精由来の産仔を得ること、②「簡単な」KO/KIラット作製技術の開発、③ラット生殖工学技術研修の実施、④最適な精子凍結・融解方法の開発、⑤凍結融解精子で人工授精・体外受精法の確立である。

2019年度は前任の本多らの研究により、幅広い系統のラットから安定的に過剰排卵を誘起させ、体外受精に成功するだけでなく、非常に高効率なゲノム編集技術を確立したことを報告し（Honda et al., *Sci. Rep.*, 2019）、初年度から①及び②を達成することができた。③に関しては、同年度にラット生殖工学技術研修を開始し、月1回のペースで研修を行った。2020年度は新型コロナウイルスの影響により研修を中断せざるを得なかったが、2021年度6月から研修を再開して現在までに9回（参加者22名）行うことができた。研修の受講者からは実際に自身の研究室でも体外受精が成功し、産仔を得ることができたとの報告も受けている。④及び⑤に関しては理研 BRC の小倉、持田らとの共同研究により、卵黄を用いない保存液を開発し、凍結保存された精子で体外受精を行った結果、39～100%の受精率が得られ、産仔率に関しては23～62%と新鮮精子を用いた体外受精と同程度の割合であった。以上のことから、マウスと比べて遅れていたラットの生殖工学技術は飛躍的に改善され、研修による技術の普及も進んでいると言える。

「マウス個体で機能するタンパク質分解デグロンシステムの

技術開発」

相賀 裕美子（国立遺伝学研究所）

新規技術の開発は、研究に新展開をもたらす。遺伝子ノックアウト技術は、遺伝子機能を分析するための重要な方法で、最近の Cas9 テクノロジーの導入により、あらゆる動物種であらゆる遺伝子ノックアウトを生成することが可能になり、機能喪失の研究が驚異的なスピードで促進された。しかし、タンパク質の安定性が予想外に長いため *in vivo* で表現型の出現が遅れることが多い。さらに、遺伝子ノックアウトは不可逆的で、一過的な遺伝子機能の解析は困難である。これらの困難を克服するために、タンパク質ノックアウト技術が望まれていた。植物のオーキシンによる蛋白分解系、いわゆる AID (auxin-inducible degron) 法は、酵母や培養細胞ですでに一般的な技術として多くの研究に用いる。また個体レベルでも、線虫やゼブラフィッシュですでに導入されている。しかし哺乳類であるマウス個体でこのシステムが機能するかどうか不明であった。野生型の OsTIR1 を用いた AID 系のマウスへの導入は不可であったが、OsTIR1 (F74G) 変異体を用いることにより、マウス系統の作成に成功した。この変異体用に開発されたオーキシン類似体 5-Ph-IAA をマウスに腹腔内投与することにより 4 時間以内に AID タグを含むレポータータンパク質の分解が可能である。現在、内因性タンパク質への影響を調べるために、AID タグ付きタンパク質を発現するマウス系統をいくつか作成している。この会議では、この重要なテクノロジーと可能なアプリケーションを紹介したい。