

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21374

研究課題名（和文）魚類卵子の凍結保存 -傷害メカニズムの解明から応用へ-

研究課題名（英文）Trial for cryopreservation of fish oocytes

研究代表者

枝重 圭祐 (Edashige, Keisuke)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授

研究者番号：30175228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：魚類卵子の凍結保存はいまだ成功していない。魚類の成熟卵子の細胞膜透過性は低い  
が未成熟卵子は細胞膜透過性が高いので、未成熟卵子の方が凍結保存しやすいと考えられる。しかし、未成熟卵  
子は高浸透圧に極めて弱い。そこで、ゼブラフィッシュ未成熟卵子を用いて、高浸透圧の傷害を回避する方法を  
しらべた。その結果、カルボキシペプチダーゼ阻害剤が傷害を大幅に軽減することがわかった。さらに、細胞質  
型カルボキシペプチダーゼ（CCP）のサブタイプうち、CCP5とCCP6の発現を抑制したところ、生存性が著しく向  
上した。したがって、CCP阻害により魚類未成熟卵子の高浸透圧的傷害を回避でき、凍結保存が可能になると考  
えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで魚類では主に胚の凍結保存の試みが行われている。しかし、魚類胚では細胞膜透過性が低く、凍結保存  
に必須の細胞の脱水・濃縮と耐凍剤の浸透等が十分できない。そのため、現在はレーザーを用いて一個一個超急  
速に融解する方法を用いて部分的な成功を収めているに過ぎない。一方、魚類卵子の凍結保存の試みはほとんど  
行われていない。今後、魚類の未成熟卵子の高浸透圧傷害を完全に克服できれば、大量に処理可能な実用的な魚  
類卵子の凍結保存の成功が期待できる。魚類精子の凍結保存は比較的容易なので、卵子の凍結保存に成功すれ  
ば、養殖魚の種苗生産や育種改良に大いに役立ち、水産業の発展に多大な貢献ができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fish oocytes have not been cryopreserved successfully. Immature fish oocytes  
would be more suitable for cryopreservation than mature oocytes because immature oocytes have much  
higher permeability to water and cryoprotectants than mature oocytes. However, the high sensitivity  
to hypertonic conditions makes them difficult to be cryopreserved. We examined the method to  
overcome the high sensitivity. A carboxypeptidase inhibitor from potato tuber improved the survival  
of immature zebrafish oocytes after the treatment with 0.5 M sucrose solution. The depression of the  
expression of cytosolic carboxypeptidases 5 and 6 markedly improved the survival of oocytes after  
the treatment with the sucrose solution. Therefore, the inhibition of cytosolic carboxypeptidases  
could enable the cryopreservation of immature fish oocytes.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：凍結保存 魚類卵子 高浸透圧傷害 カルボキシペプチダーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚類の卵子/胚は、哺乳類の卵子/胚と比べて体積が 1,000 倍以上と著しく大きく、表面積/体積比が小さく、凍結保存に不可欠な脱水と耐凍剤の浸透が不十分となり、凍結・融解時に細胞内に氷晶が形成されて死滅する。特に、胚と成熟卵子は細胞膜透過性が極めて低く、細胞の脱水・濃縮と耐凍剤の浸透が困難で、凍結保存は極めて難しい。これを克服するには、細胞膜透過性が高い未成熟卵子<sup>1)</sup>を用い、(1)細胞膜透過性をさらに向上させる、(2)不凍タンパク質を蓄積させて細胞内氷晶の形成/成長を抑制する(3)より小さい未成熟卵子を用いることが有効と考えられる。幸い、魚類精子は凍結保存が可能なので、魚類卵子が凍結保存できれば、簡単に遺伝資源を保存できる。申請者は、ゼブラフィッシュ未成熟卵子で水・耐凍剤チャンネルや不凍タンパク質を人為的に発現することに成功した。しかしながら、魚類の未成熟卵子は高浸透圧に極めて弱く、凍結保存液(耐凍剤を含むため浸透圧が高い)や 0.5 M シュクロースを添加した培養液で 5 分間処理するだけで 20 分以内に死滅してしまう<sup>2)</sup>。したがって、魚類卵子を凍結保存するためには、(4)未成熟卵子の凍結/融解過程における浸透圧的傷害の克服が不可欠である。

申請者は、ゼブラフィッシュを用い、未成熟卵子の高浸透圧液に浸漬すると細胞内カルシウム濃度が上昇することやネクロトシス阻害剤が高浸透圧傷害を軽減することを見出した<sup>3)</sup>。また、細胞膜や小胞体に発現しているカルシウムチャンネルの阻害剤やネクロトシスの各過程の阻害剤で処理すると高浸透圧傷害を有意に軽減したが、その程度は高くはなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、魚類未成熟卵子の高浸透圧傷害の分子メカニズムを明らかにし、魚類卵子の凍結保存の可能性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ・未成熟卵子の採取

成熟したメスゼブラフィッシュから消灯直後に卵巣を取り出し、直径約 0.7 mm の卵胞を採取し、未成熟卵子として用いた。そして実験に用いるまで 25 °C の 90%LM 液(pH 9.0) (以下 90% LM 液) でインキュベートした。

#### ・高浸透圧処理

未成熟卵子を 25 °C の 0.5 M シュクロースを含む 90%LM 液で 5 分間処理した。それから、25 °C の 90%LM 液で 20 分間培養した。

#### ・生存性の判定

20 ug/ml の propidium iodide を含む 25 °C の 90%LM 液で 10 分間染色し、生存性を判定した。

#### (1) ゼブラフィッシュ未成熟卵子の高浸透圧傷害への高浸透圧感受性チャンネルの関与

TRP チャンネルは細胞膜に発現し、細胞外のような刺激によって活性化し、陽イオンを細胞内に流入させるとともに、多岐にわたる細胞内情報伝達系の構成要素と複合体を形成する。これらの中には、TRPV1、TRPV4、TRPM2、TRPM7 あるいは TRPA1 のように浸透圧を感知するものが知られている。また、Piezo1 や Piezo2 も機械的圧力を感じ、陽イオンを細胞内に流入させることが知られている。そこで、これらの浸透圧感受性チャンネルを阻害あるいは発現を抑制して、これらのチャンネルが高浸透圧傷害に関わっているかどうかしらべた。阻害剤としては TRPV1 特異的阻害剤である AMG9810、TRPV4 特異的阻害剤である HC-067047、TRPM7 特異的阻害剤である NS8593 あるいは TRPA1 特異的阻害剤である HC-030010 を用いた。また、TRPM2 の double stranded-RNA を卵子に注入し、25 °C で 2 時間培養して TRPM2 の発現を抑制した卵子を作製した。これらの阻害剤で未成熟卵子を前処理あるいは発現を抑制してから高浸透圧処理し、生存性を判定した。また、Piezo1 特異的阻害剤の Dooku1 と Piezo2 特異的阻害剤の D-GSMTx4 は、卵子に直接注入してから高浸透圧処理し、生存性を判定した。

#### (2) ゼブラフィッシュ未成熟卵子における高浸透圧傷害へのプロテアーゼの関与

細胞死の過程では、細胞内のさまざまなプロテアーゼが関与している<sup>4)</sup>。そこで、ゼブラフィッシュ未成熟卵子の高浸透圧傷害に、どのようなプロテアーゼが関与しているかを、様々なプロテアーゼ阻害剤を用いてしらべた。エンドペプチダーゼの関与については、エンドペプチダーゼ阻害剤カクテルを用いてしらべた。エクソペプチダーゼの関与については、アミノペプチダーゼ阻害剤としてベスタチン(100 μM)、カルボキシペプチダーゼ阻害剤として Carboxypeptidase inhibitor from potato tuber (100 ug/ml) を用いた。未成熟卵子にこれらのプロテアーゼ阻害剤を注入してから高浸透圧処理し、生存性を判定した。

#### (3) ゼブラフィッシュ未成熟卵子における高浸透圧傷害への細胞質型カルボキシペプチダーゼの関与

カルボキシペプチダーゼ阻害剤のみ高浸透圧傷害を大きく軽減したことから、細胞質型カルボキシペプチダーゼが未成熟卵子の高浸透圧傷害に大きな役割を果たしていると考えられた。脊椎動物の細胞質型カルボキシペプチダーゼには CCP1 から CCP6 の 6 つのサブタイプがある。そのうち、少なくとも CCP5 と CCP6 の mRNA は受精直後のゼブラフィッシュ卵子で発現していることが報告されている<sup>5)</sup>。そこで、CCP5 と CCP6 の double stranded-RNA を合成して未成熟卵子に注入し、25℃ で 2 時間培養して発現を抑制してから高浸透圧処理し、生存性を判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゼブラフィッシュ未成熟卵子の高浸透圧傷害への高浸透圧感受性チャンネルの役割

0.5 M シュクロースを含む 90% LM 液で未成熟卵子を 5 分間高浸透圧処理すると、20 分間後にはほとんどの卵子が死滅した。既知の浸透圧感受性 TRP チャンネルである TRPV1、TRPV4、TRPM7 および TRPA1 のいずれの特異的阻害剤で前処理しても、高浸透圧処理後はほとんどの卵子が死滅した。また、TRPM2 の発現を抑制しても生存性は向上しなかった。また、Piezo1 および Piezo2 の特異的阻害剤を注入しても、生存性は向上しなかった。

したがって、ゼブラフィッシュ未成熟卵子は、既知の浸透圧感受性チャンネルによる浸透圧感知とは異なるメカニズムで高浸透圧を感知して傷害を受けると考えられた。

##### (2) ゼブラフィッシュ未成熟卵子における高浸透圧傷害へのプロテアーゼの関与

エンドペプチターゼ阻害剤カクテルを注入しても高浸透圧処理後にほとんどの卵子が死滅した。アミノペプチターゼ阻害剤を注入しても、高張処理後の生存率は向上しなかった。一方、カルボキシペプチターゼ阻害剤を注入すると、高張処理後の生存率は大きく向上した。

したがって、卵子の高浸透圧傷害では、細胞内のカルボキシペプチダーゼの活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。

##### (3) ゼブラフィッシュ未成熟卵子における高浸透圧傷害への細胞質型カルボキシペプチダーゼの関与

細胞質型カルボキシペプチダーゼのうちゼブラフィッシュ卵子での発現が高い CCP5 の発現を抑制した卵子を高浸透圧処理すると、生存率は著しく向上した。また、同様に卵子で発現している CCP6 の発現を抑制した卵子を高浸透圧処理しても、生存率が大きく向上した。

したがって、ゼブラフィッシュの高浸透圧傷害には CCP5 の活性化が関与していると示唆された。また、CCP6 も高浸透圧傷害にある程度関与していると示唆された。

魚類の卵子や胚は物理的に極めて強靱で、指で押さえてもつぶれにくい。この強靱さには細胞骨格系が重要な役割を果たしていると考えられる。細胞の形態維持には微小管を構成するチューブリンのポリグルタミル化などの翻訳後修飾が重要な役割を果たしている<sup>6)</sup>。細胞質型カルボキシペプチダーゼはポリグルタミル化チューブリンを選択的に脱グルタミル化する<sup>7)</sup>ことから、高浸透圧により卵子内の本酵素が活性化することによりポリグルタミル化チューブリンが脱グルタミル化され、魚類卵子の強靱さが急速に失われて卵子が崩壊すると考えられる。

結論として、ゼブラフィッシュ未成熟卵子における高浸透圧傷害には細胞質型カルボキシペプチダーゼが強く関与しており、その活性化を抑制することにより、高浸透圧傷害を回避できると考えられた。これらの成果は、魚類卵子の凍結保存の成功につながるものと期待される。

#### < 引用文献 >

- Valdez et al. Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology*, 2005, 50, 93-102.
- Valdez et al. A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3. *J Reprod Develop*, 2013, 59, 205-213.
- Higashimoto et al., 2017, Mechanism by which immature zebrafish oocytes are injured by hypertonic conditions. *WCRB2017*, 2017.
- Salvesen et al. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. *FEBS J*. 2016, 283, 2577-2598.
- Lyons et al. Zebrafish cytosolic carboxypeptidases 1 and 5 are essential for embryonic development. *J Biol Chem*. 2013, 288, 30454-30462.
- Jennetta et al. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20, 71-76.
- Kimura Y. et al. Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 22936-22941.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Qiu Juan, Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Ogura Atsuo, Koshimoto Chihiro, Matsukawa Kazutsugu, Edashige Keisuke | 4. 巻<br>98              |
| 2. 論文標題<br>Equilibrium vitrification of mouse embryos using low concentrations of cryoprotectants                        | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Cryobiology  | 6. 最初と最後の頁<br>127 ~ 133 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.cryobiol.2020.11.015  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Qiu Juan, Matsukawa Kazutsugu, Koshimoto Chihiro, Edashige Keisuke  | 4. 巻<br>67              |
| 2. 論文標題<br>Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages using low concentrations of cryoprotectants | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproduction and Development   | 6. 最初と最後の頁<br>109 ~ 114 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1262/jrd.2020-152   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sugishita Yodo, Meng Lingbo, Suzuki-Takahashi Yuki, Nishimura Sandy, Furuyama Sayako, Uekawa Atsushi, Tozawa-Ono Akiko, Migitaka-Igarashi Junko, Koizumi Tomoe, Seino Hibiki, Natsuki Yasunori, Kubota Manabu, Koike Junki, Edashige Keisuke, Suzuki Nao | 4. 巻<br>37              |
| 2. 論文標題<br>Quantification of residual cryoprotectants and cytotoxicity in thawed bovine ovarian tissues after slow freezing or vitrification   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Human Reproduction   | 6. 最初と最後の頁<br>522 ~ 533 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/humrep/deab274  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Qiu Juan, Edashige Keisuke  |
| 2. 発表標題<br>Equilibrium Vitrification of 2-cell mouse embryos using low concentrations of cryoprotectants |
| 3. 学会等名<br>57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology（国際学会）                                      |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Edashige Keisuke, Mori Natsu, Yoshino Nanako, Qiu Juan, Koshimoto Chihiro, Matsukawa Kazutsugu |
| 2. 発表標題<br>Mechanism of chilling injury in pig oocytes  |
| 3. 学会等名<br>57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (国際学会)                                      |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Qiu Juan, Koshimoto Chihiro, Matsukawa Kazutsugu, Edashige Keisuke                       |
| 2. 発表標題<br>Equilibrium vitrification of mouse oocytes using lower concentrations of cryoprotectants |
| 3. 学会等名<br>58th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (国際学会)                                |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大久保 早季, 松川 和嗣, 越本 知大, 枝重 圭祐 |
| 2. 発表標題<br>ゼブラフィッシュ未成熟卵子の低温傷害のメカニズム    |
| 3. 学会等名<br>第114回 日本繁殖生物学会大会            |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

〔図書〕 計1件

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>枝重圭祐 (鈴木直 編集)  | 4. 発行年<br>2021年           |
| 2. 出版社<br>医歯薬出版  | 5. 総ページ数<br>288 (うち11ページ) |
| 3. 書名<br>新版 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践：第4章 凍結生物学 Cryobiology (基礎) |                           |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                              | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 越本 知大<br><br>(Koshimoto Chihiro)<br><br>(70295210)   | 宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・教授<br><br><br><br>(17601)    |    |
| 研究分担者 | 松川 和嗣<br><br>(Matsukawa Kazutsugu)<br><br>(00532160) | 高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・准教授<br><br><br><br>(16401) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |