

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19250

研究課題名（和文）高浸透圧傷害克服による魚類と両生類の卵子の凍結保存

研究課題名（英文）Cryopreservation of oocytes by overcoming hypertonic injuries in fish and amphibians

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）：魚類や両生類の卵子は高浸透圧傷害を受けやすいため凍結保存ができない。魚類卵子では本傷害にカルボキシペプチダーゼが関与している。そこで、ゼブラフィッシュ未成熟卵子を用いて、傷害メカニズムをしらべた。その結果、本傷害には細胞質型カルボキシペプチダーゼ（CCP）1、CCP5、CCP6が関与し、その活性や発現を抑制することにより傷害が軽減されることがわかった。しかし、CCP阻害剤では凍結保存液による高浸透圧傷害は軽減できなかった。CCPはグルタミル化チューブリンを選択的に分解することにより傷害を引き起こしていると推察された。アフリカツメガエル未成熟卵子の高浸透圧傷害にもCCPが関与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類や両生類の卵子は高浸透圧傷害を受けやすいため凍結保存ができない。しかしながら、そのメカニズムはほとんど明らかではなかった。本研究により、高浸透圧傷害のメカニズムの多くが明らかとなった。さらに研究を進めれば、大量の卵子を一度に凍結保存できる実用的な凍結保存技術が開発できるであろう。もし、成功すれば、実験用小型淡水魚の系統保存だけでなく、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ている。同様の課題は両生類の卵子にもみられることから、実験用両生類の系統保存や世界的なツボカビ病蔓延により絶滅が危惧されている野生両生類種の保存法として役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cryopreservation of oocytes in fish and amphibians have not been succeeded, because of the high sensitivity to hypertonic conditions. Since carboxypeptidases have been suggested to be involved in the injuries of immature zebrafish oocytes, we examined the mechanism of the injuries using immature zebrafish oocytes. We found that cytosolic carboxypeptidase (CCP)1, CCP5 and CCP6 were involved in the injuries, and that the suppression of the expression improved the tolerance of oocytes to the injuries. However, injuries by a cryopreservation solution was not improved by an inhibitor for CCPs. CCPs would injure oocytes by degrading glutamate residues from polyglutamated tubulin in the cytoplasm. In immature *Xenopus* oocytes, CCPs were also involved in the injuries.

研究分野：応用動物科学

キーワード：凍結保存 卵子 魚類 両生類 プロテアーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚類胚ではいまだに実用的な凍結保存法はない。卵子については凍結保存の成功例はない。また、両生類では、卵子と胚のいずれも凍結保存の成功例はない。魚類の胚や卵子は体積が哺乳類卵子/胚と比べて極めて大きく表面積/体積比が小さいため、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・融解過程で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を用いることが有効と考えられる<sup>1)</sup>。しかしながら、魚類の未成熟卵子は高浸透圧感受性に極めて高く<sup>2)</sup>、ガラス化凍結保存液(高濃度の耐凍剤を含むため浸透圧が非常に高い)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。したがって、魚類卵子を凍結保存するためには、未成熟卵子の凍結/融解過程における高浸透圧傷害の克服が不可欠である。もし、本傷害を克服して卵子の凍結保存が可能になれば、魚類精子は凍結保存が可能なので、容易に遺伝資源を保存できる。これまでの申請者の研究から、ゼブラフィッシュ未成熟卵子を高浸透圧処理する前に細胞内カルシウム濃度の上昇を阻害<sup>3)</sup>したりカルボキシペプチダーゼ阻害剤で処理したりすると傷害が大きく軽減されることがわかった。カルボキシペプチダーゼによって引き起こされる急速な細胞死は、申請者の知る限り、これまで知られていない<sup>4)</sup>。おそらく、高浸透圧に短時間暴露されることにより細胞内のカルボキシペプチダーゼが活性化し、魚類卵子の持つ並外れた強靱さが失われることによって細胞が崩壊すると考えられる。両生類未成熟卵子も細胞が極めて大きく高浸透圧感受性が極めて高いが、魚類卵子と同様のメカニズムで傷害を受けると考えられる。

### 2. 研究の目的

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による細胞死メカニズムを明らかにし、その傷害を軽減することが可能かどうかを明らかにし、凍結保存の可能性を探ることを目的とした。さらに、同様の特性を持つアフリカツメガエル未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズムについても明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 魚類未成熟卵子の高浸透圧傷害における細胞質型カルボキシペプチダーゼ(CCP)の役割  
ゼブラフィッシュの未成熟卵子における高浸透圧傷害に關与するCCPのサブタイプの特性をこころみた。ゼブラフィッシュ卵子ではCCPの6つのサブタイプのうちCCP1、CCP5およびCCP6のmRNAが比較的強く発現している<sup>5)</sup>。そこで、これらのCCPのdouble-stranded(ds)RNAをゼブラフィッシュ未成熟卵子に注入して2時間培養して発現を抑制してから25の0.5 M シュクロース液で5分間処理(高浸透圧処理)し、20分間培養してpropidium iodideで染色して生死判定し、高浸透圧傷害が軽減されるかどうかをしらべ、いずれのサブタイプが高浸透圧傷害に關与しているのかをしらべた。

(2) CCPによる魚類未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズム

魚類の卵子は、小さなものでも直径が1 mm 近くあり、指で押さえても容易に潰れないなど強靱なものが多い。CCPは細胞内にてポリグルタミル化により安定化した微小管を形成するチューブリン<sup>6)</sup>のポリグルタミル鎖やグルタミル化した側鎖を選択的に分解する<sup>7)</sup>。したがって、高浸透圧にさらされると細胞内のCCPが活性化してチューブリンのポリグルタミル鎖が選択的に分解され、チューブリンが脱重合して微小管が崩壊し、細胞の強靱さが失われることが考えられる。そこで、まず、チューブリンを脱重合させるデメコルチンを注入した後、短時間高浸透圧処理(25の0.5 M シュクロース液で3分間処理)し、生存率がさらに低下するかどうかをしらべた。さらに、チューブリンをポリグルタミル化するチューブリンチロシンリガーゼ様ファミリータンパク質(TTLL)の発現を抑制してチューブリンのポリグルタミル化を抑制することにより、短時間の高浸透圧処理後の生存率がさらに低下するかどうかをしらべた。

(3) 魚類卵子の高浸透圧傷害低減のこころみ

CCPを含むメタロプロテアーゼの阻害剤である1,10-phenanthrolineを未成熟卵子に注入して1時間培養後、高浸透圧処理して生存性が向上するかどうかをしらべた。さらに、同阻害剤を注入した後、25のガラス化保存液(15%メタノール、15%プロピレングリコールおよび0.5 M シュクロースを含む溶液)で1分間処理してから20分間培養して生存性をしらべ、凍結保存液による高浸透圧傷害が軽減されるかどうかをしらべた。

#### (4) 両生類未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズム

アフリカツメガエルの未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズムをしらべた。すなわち、成熟メス卵巣から stage V の卵子を含む卵子塊を Modified Barth's Saline に回収し、コラゲナーゼ処理したのちに濾胞細胞を取り除き、未成熟卵子を得た。それから 1,10-phenanthroline を注入して 1 時間培養してから 18 時間の 0.5 M シュクロース液で 10 分間高浸透圧処理し、10 時間培養して形態から生死を判定し、生存性が向上するかどうかをしらべた。さらに、CCP5 の dsRNA を注入して 8 時間培養して発現を抑制してから高浸透圧処理し、生存性が向上するかどうかをしらべた。

### 4. 研究成果

#### (1) 魚類未成熟卵子の高浸透圧傷害における CCP の役割

CCP1、CCP5、および CCP6 の dsRNA を注入すると、いずれの場合も、高浸透圧処理後の生存性が有意に向上した。特に CCP5 の発現を抑制した場合に大きく向上した。したがって、特に CCP5 が高浸透圧傷害に関与していると考えられた。

#### (2) CCP による魚類未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズム

ゼブラフィッシュ未成熟卵子をデメコルチン処理して微小管系を壊してから短時間高浸透圧処理すると、生存性がさらに有意に低下した。ゼブラフィッシュ卵巣で発現している TTLL のうち、特に mRNA の発現量が多い TTLL1、TTLL4 および TTLL6 の dsRNA を注入して短時間高浸透圧処理をしたところ、いずれも卵子の生存性が大きく低下した。したがって、魚類未成熟卵子では TTLL によるチューブリンのグルタミル化によって微小管系の強靭さが維持されて高い浸透圧耐性が保たれているが、高浸透圧処理により CCP が活性化して微小管系の強靭さが急速に損なわれて細胞が崩壊すると考えられた。

#### (3) 魚類卵子の高浸透圧傷害低減のしくみ

1-10 フェナントロリンを卵子に注入してから高浸透圧処理すると生存性は大きく向上した。しかしながら、25 時間のガラス化保存液 (30% 耐凍剤、0.5 M sucrose、30% Ficoll PM-70) で 1 分間処理したところ、ほとんどの卵子が死滅した。CCP 阻害剤の効果が不十分で、この条件では凍結保存液のような極めて浸透圧が高い溶液による傷害を十分回避できないと考えられた。今後、CCP 阻害をより効果的にする方法の開発が必要と考えられる。

#### (4) 両生類未成熟卵子の高浸透圧傷害メカニズム

アフリカツメガエルの未成熟卵子も高浸透圧感受性が高く、18 時間の 0.5 M sucrose 液で 10 分間処理するとほとんどが死滅した。1,10-phenanthroline を注入すると高浸透圧傷害が大きく軽減されたことから、両生類未成熟卵子の高浸透圧傷害にも CCP が関与していると示唆された。そこで、CCP5 の dsRNA を注入して発現を抑制してから高浸透圧処理すると生存性が大きく向上した。したがって、両生類卵子の高浸透圧傷害にも CCP が重要な役割を果たしていると考えられた。もし魚類卵子の凍結保存法を開発できれば、同様の方法で両生類卵子の凍結保存は可能になると考えられる。

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 CCP の活性化が主要な役割を果たしており、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、魚類卵子や両生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1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Qiu Juan, Matsukawa Kazutsugu, Edashige Keisuke	4. 巻 113
2. 論文標題 Equilibrium vitrification of oocytes using low concentrations of cryoprotectants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 104586 ~ 104586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cryobiol.2023.104586	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazutsugu Matsukawa, Takafumi Kameda, Nanami Kohri, Luca Palazzese, Keisuke Edashige, Pasqualino Loi
2. 発表標題 Pregnancies from bovine nuclear transfer embryos using freeze-dried somatic cells
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野つかさ、亀田崇史、下島小麦、郡七海、枝重圭祐、松川和嗣
2. 発表標題 ウシ単為発生胚の初期発生における雌性インプリンティングの変化
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川光朗、兼光珠里、松川和嗣、枝重圭祐
2. 発表標題 マウス卵子の透明帯の耐凍剤透過特性
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下島小麦、亀田崇史、水野つかさ、武田久美子、緒方和子、郡七海、枝重圭祐、松川和嗣
2. 発表標題 フリーズドライ技術を用いたウシ精子の保存が胚発生に与える影響
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Edashige, Yanuar Achadri, Nanako Yoshino, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa
2. 発表標題 Chilling injury in pig oocytes is correlated with lipid mediators
3. 学会等名 60th annual meeting for the Society of Cryobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 枝重圭祐
2. 発表標題 哺乳動物の卵子と胚の凍結保存のメカニズムと融解後の生存性に係る要因
3. 学会等名 第64回日本卵子学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ゼブラフィッシュ未成熟卵子の高浸透圧傷害に関わるカルボキシペプチダーゼ
2. 発表標題 山岡花帆、大久保早季、Yanuar ACHADRI、松川和嗣、枝重圭祐
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松川和嗣、亀田崇史、竹中由布、池上正紘、枝重圭祐
2. 発表標題 フリーズドライ線維芽細胞を用いたウン核移植胚の体内発生能
3. 学会等名 第131回日本畜産学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 枝重圭祐	4. 発行年 2024年
2. 出版社 近代出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 生殖補助医療-胚培養の理論と実際- 第8章第1節凍結理論	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	越本 知大 (Koshimoto Chihiro) (70295210)	宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・教授  (17601)	
研究分担者	松川 和嗣 (Matsukawa Kazutsugu) (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  (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
---------	---------