

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14886

研究課題名(和文) 魚類卵子の凍結保存 -傷害の分子メカニズムから応用へ-

研究課題名(英文) Cryopreservation of fish oocytes -based on the mechanism of cell injuries during cryopreservation-

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・教授

研究者番号：30175228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：魚類卵子の凍結保存は成功していない。我々はゼブラフィッシュのStage IとStage IIIの卵子に水/耐凍剤チャンネルであるaquaporin 3と不凍タンパク質を発現させた。さらに高浸透圧傷害を回避するため、TRPチャンネルの非特異的な阻害剤であるルテニウムレッドで高浸透圧を感知するTRPチャンネルを阻害してからガラス化凍結した。Stage I卵子は融解直後に全て死滅していた。一方、Stage III卵子では融解直後は一部生存していた。しかし1時間後には死滅していた。無処理卵子は発育ステージにかかわらず融解直後にすべて死滅していた。魚類卵子の凍結保存の成功にはさらなる改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：Fish oocytes have not been cryopreserved successfully. We tried to vitrify immature zebrafish oocytes (Stage I and Stage III) expressed with an antifreeze protein and aquaporin 3, a water/cryoprotectant channel, and treated with ruthenium red. Ruthenium red is a nonspecific inhibitor of TRP channels and thus expected to inhibit hyperosmolarity-sensitive TRP channels. Without the expression and treatment, no oocytes survived just after warming, regardless of the growing stage. With the expression and treatment, no Stage I oocytes survived just after warming, but some Stage III oocytes survived. After 1 h of culture, however, the Stage III oocytes were not alive. Further studies are needed for successful cryopreservation of fish oocytes.

研究分野：繁殖学

キーワード：魚類 卵子 凍結保存 ゼブラフィッシュ

### 1. 研究開始当初の背景

魚類の卵子/胚の凍結保存は成功していない。魚類の卵子/胚の凍結保存が難しい理由は、体積が哺乳類の卵子/胚より 1,000 倍以上大きいため、表面積/体積比が小さく、凍結保存に不可欠な脱水や耐凍剤の浸透が不十分になるため、細胞内に氷晶が形成して死滅するからである。この問題を乗り越えるためには、(1) 細胞膜の水透過性と耐凍剤透過性を向上させる、(2) 不凍物質等を細胞内に蓄積させて細胞内氷晶の成長を抑制することが有効と考えられる。申請者らは、メダカやゼブラフィッシュの卵子に水/耐凍剤チャンネルを発現させ、卵子の細胞膜透過性を向上させることに成功した。また、不凍タンパク質の cRNA を注入して発現させることにも成功した。しかしながら、超急速ガラス化法で凍結しても、細胞内氷晶形成を完全には抑制することはできず、融解直後に全ての卵子が死滅した。これは、卵子は高浸透圧に対する感受性が極めて高く、保存液や耐凍剤除去液中に少糖類のような細胞非透過性耐凍剤を添加できないため、凍結/融解過程で細胞を十分に脱水/濃縮されないからと推測された。したがって、魚類の卵子/胚の凍結保存に成功するためには、上記に加えて(3) 細胞の凍結/融解過程における浸透圧的傷害の防ぎながら細胞をより脱水/濃縮することが不可欠である。

### 2. 研究の目的

(1) 浸透圧を感知する TRP チャンネルの阻害物質で同チャンネルを阻害することにより、ゼブラフィッシュ卵子の浸透圧的傷害が軽減されるかどうかを明らかにする。

(2) ゼブラフィッシュ卵子に水/耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質の cRNA を注入して水/耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質を同時に発現させ、細胞膜透過性が向上して細胞質の氷点が低下するかどうかをしらべる。

(3) メタノール、プロピレングリコール、スクロースおよびフィコールを含む保存液を用いて、水/耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質を同時に細胞内に蓄積させたゼブラフィッシュ卵子を、浸透圧感知チャンネルを阻害した状態でガラス化法により凍結保存する。

### 3. 研究の方法

成熟メスゼブラフィッシュの卵巣から直径 0.16 ~ 0.2 mm と 0.5 mm の卵胞を分離し、それぞれ Stage I と Stage III 中期 (以下 Stage III) の卵子とした。

(1) ゼブラフィッシュ卵子の高浸透圧による傷害への TRP チャンネルの関与

TRP チャンネルの非特異的阻害剤であるルテニウムレッド (0 ~ 200  $\mu$ M) を添加した 90%LM 液で Stage I と Stage III の卵子を 25 で 60 分間前処理し、25 の 0.5 M ス

クローズを添加した高張な 90%LM 液 (pH 9.0) で 5 分間処理した。30 分間 25 の 90%LM 液で培養してから 20  $\mu$ g/ml Propidium iodide で 10 分間生死染色し、卵子の高浸透圧傷害に TRP チャンネルが関与しているかどうかをしらべた。

(2) ゼブラフィッシュ卵子における水/耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質の発現

水/耐凍剤チャンネルである aquaporin-3 (ラット由来、以下 AQP3) とウインターフラウンダー由来不凍タンパク質 (以下 AFP) の cRNA を Stage I と Stage III の卵子に注入して 12 時間培養した。それから、Stage I と Stage III の卵子を 25 の 10% プロピレングリコール添加 90%LM 液に 20 分間浸して顕微鏡像を撮影し、その断面積の変化から細胞膜の水透過性とプロピレングリコール透過性が向上しているかどうかをしらべた。また、Stage III 卵子をテフロンホモジナイザーで粉碎したのちに 10,000xg 上清を回収して細胞質画分とし、氷点降下型浸透圧計を用いて細胞質画分の浸透圧が上昇しているかどうかをしらべた。これらの結果から AQP3 と不凍タンパク質が卵子に十分発現しているかどうかを確認した。

(3) ゼブラフィッシュ卵子のガラス化凍結保存条件の検討

ゼブラフィッシュ卵子のガラス化凍結保存に適した条件をしらべた。まず 25 の 60 分間 50  $\mu$ M ルテニウムレッド添加 90%LM 液で Stage I を処理した。そして、5% (v/v) propylene glycol (以下 PG) + 5% (v/v) methanol (以下 MeOH) を添加した 90%LM 液 (前処理液) で 0 ~ 120 分間処理した。それから、25 の 90%LM 液に 30 分間入れて耐凍剤を除去した。そして生死染色により生存性を判定し、適した前処理条件をしらべた。

次に、Stage I 卵子を 25 の 50  $\mu$ M ルテニウムレッド添加 90%LM 液で 60 分間処理した後、25 の 15% (v/v) PG + 15% (v/v) MeOH を添加した FS 液 (0.2 M スクロースと 10% (w/v) フィコールを含む 90%LM 液) (ガラス化保存液) で 0 ~ 20 分間処理した。それから、25 の 1/2 希釈ガラス化保存液、1/4 希釈ガラス化保存液、および 90%LM 液に 5 分間ずつ入れて耐凍剤を除去した。そして、30 分間 25 の 90%LM 液で培養してから生死染色により生存性を判定し、適したガラス化保存液での処理条件をしらべた。

Stage III 卵子を、まず 50  $\mu$ M ルテニウムレッド添加 90%LM 液で 60 分間処理したのち、25 の前処理液で 0 ~ 240 分間処理した。それから、25 の 90%LM 液に 30 分間卵子を入れて耐凍剤を除去した。そして生死染色により生存性を判定し、適した前処理条件をしらべた。

次に、Stage III 卵子を 50  $\mu$ M ルテニウムレッドで 60 分間処理した後、25 のガラス

化保存液で0~10分間処理した。それから、25の1/2希釈ガラス化保存液、1/4希釈ガラス化保存液、および90%LM液に5分間ずつ卵子を入れて耐凍剤を除去した。そして25で30分培養した後に生死染色で生存性を判定し、適したガラス化保存液での処理条件をしらべた。

以上の実験により、Stage IとStage IIIの卵子の適した処理条件をしらべた。

#### (4) ゼブラフィッシュ卵子のガラス化凍結保存後の生存性

0.25 mlのウシ精液凍結用ストローを用いた通常のガラス化法で凍結した。AQP3/AFP高発現Stage I卵子では、まず25で60分間50 μMルテニウムレッド添加90%LM液で処理してから25の前処理液で20分間処理したのち、25のガラス化保存液で約2.5分間処理し、0.5 mlのストロー内のガラス化保存液中に導入した。ガラス化保存液での処理時間は液体窒素で凍結するまで全体で3分間とした。空気をストロー端まで吸引したのち、開口部を熱シーラーで密封し、液体窒素中に直接浸してガラス化凍結した。

AQP3/AFP高発現Stage III卵子では、50 μMルテニウムレッドを添加した25の前処理液で60分間処理したのち、25のガラス化保存液で約2.5分間処理し、ストロー内のガラス化保存液中に導入した。ガラス化保存液での処理時間は液体窒素で凍結するまで全体で3分間とした。空気をストロー端まで吸引したのち、開口部を熱シーラーで密封し、液体窒素中に直接浸してガラス化凍結した。

いずれの発育段階の卵子も25の水にストローを浸して融解し、1/2希釈ガラス化保存液、1/4希釈ガラス化保存液、および90%LM液に5分間ずつ入れて耐凍剤を除去した。耐凍剤除去直後と25で60分間培養後の形態と生死染色により生存性を判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゼブラフィッシュ卵子の高浸透圧による傷害へのTRPチャンネルの関与

Stage I卵子を12.5 μMから200 μMのルテニウムレッドで60分間処理すると、高張処理による生存性の低下が軽減された。また、Stage III卵子においても25 μM~200 μMのルテニウムレッドで処理すると、高張処理による生存性の低下が有意に軽減された。したがって、ゼブラフィッシュ卵子の高浸透圧による傷害に浸透圧感受性のTRPチャンネルが関与していることが示唆された。

そこで、凍結保存では25の50 μMルテニウムレッド添加90%LM液で60分間処理したStage IとStage IIIの卵子を用いることにした。

##### (2) ゼブラフィッシュ卵子における水/耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質の発現 AQP3とAFPのcRNAを注入したStage I

卵子とStage III卵子のいずれも、水注入卵子と比べて25の10%プロピレングリコール添加90%LM液中での収縮と膨張が速まった。AQP3が発現し、水透過性と耐凍剤透過性が上昇したことが確認された。

また、AQP3とAFPのcRNAを注入したStage III卵子の細胞質画分の浸透圧は水注入卵子の細胞質画分と比べて浸透圧が上昇し、AFPが発現していると考えられた。

そこで、AQP3とAFPのcRNAを注入して発現させたStage I卵子とStage III卵子を凍結保存に用いた。

##### (3) ゼブラフィッシュ卵子のガラス化凍結保存条件の検討

Stage I卵子を前処理液で処理した場合は、20分間処理で生存性がやや低下し、60分間以上処理すると生存性が60%以下と大きく低下した。ルテニウムレッド処理によって生存性が向上した。ガラス化保存液で処理した場合は、3分間処理で低下しはじめ、10分間処理で大きく低下(約30%)した。ルテニウムレッド処理により生存性はやや向上した。したがって、Stage I卵子では25のルテニウムレッド添加90%LM液で60分間処理した後に、25の前処理液で20分間、25のガラス化保存液で3分間処理するのが適していると考えられた。

Stage III卵子を前処理液で処理した場合は、120分間処理で生存性がやや低下し、240分間処理すると生存性が約60%と大きく低下した。ルテニウムレッド処理によって生存性が全体的に向上した。ガラス化保存液で処理した場合は、1分間処理で低下し、7分間処理で大きく低下(30%以下)した。ルテニウムレッド処理により生存性は明らかに向上し、3分間処理では100%生存していた。

したがって、Stage III卵子では25のルテニウムレッド添加前処理液で60分間前処理した後に25のガラス化保存液で3分間処理するのが適していると考えられた。

##### (4) ゼブラフィッシュ卵子のガラス化凍結保存後の生存性

Stage I卵子では、融解直後と60分間培養後の形態から生存性を判定すると、AQP3/AFPの発現やルテニウムレッド処理にかかわらず、融解直後に約50~60%が生きており、60分後も約30~40%が生きていた。しかしながら、生死染色により生存性を判定すると、AQP3/AFPの発現やルテニウムレッドの処理にかかわらず、融解直後に全て死滅していた。

Stage III卵子では、融解直後と60分間培養後の形態から生存性を判定すると、AQP3/AFPの発現やルテニウムレッド処理により融解直後の生存性が約75%から100%へと向上した。しかしながら、いずれの場合も60分後にはほとんどが死滅(0~5%)していた。一方、生死染色により生存

性を判定すると、AQP3/AFP を発現させた上でルテニウムレッドで処理した場合のみ、一部の卵子（約7%）が生存していた。しかしながら、60分後には全て死滅していた。

これらの結果から、高浸透圧感受性 TRP チャンネルを阻害することにより、凍結保存液の高浸透圧による傷害を低減できることがわかった。また、細胞膜透過性を向上させ、不凍タンパク質を発現させ、高浸透圧傷害を軽減させると、卵子の耐凍性が向上することもわかった。しかしながら、ゼブラフィッシュ卵子の凍結保存を成功させるためには、さらなる改良が必要である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Toshikiyo Takahashi, Kouya Sasaki, Tamas Somfai, Takashi Nagai, Noboru Manabe, Keisuke Edashige. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. The Journal of Reproduction and Development, 62, 209-212, 2016. 査読有. DOI: 10.1262/jrd.2015-149

### 〔学会発表〕(計11件)

枝重圭祐. 哺乳動物胚の細胞膜透過性 - 凍結保存における重要性 -. 第60回日本生殖医学会学術講演会. 2015/4/26-29. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

枝重圭祐. 平衡ガラス化法による受精卵の凍結保存. 第60回低温生物工学会大会. 2015/5/30-31. 東京工科大学八王子キャンパス (八王子市)

枝重圭祐. ガラス化凍結保存後の胚の生存性に関わる要因. 第22回日本胚移植研究会. 2015/8/27-28. 高知大学物部キャンパス (高知県南国市)

岩野弘暉, 小木曾貴季, 白水貴大, 川原学, 枝重圭祐, 高橋昌志. 発情周期別ウシ子宮内膜における TRP チャンネルの発現動態. 日本畜産学会第120回大会. 9/11-12. 酪農学園大学 (北海道江別市)

細川真美, 竹中由布, 枝重圭祐, 松川和嗣. アスコルビン酸 2 リン酸は暑熱ストレスに暴露されたウシ体外受精胚の作出率を改善する. 日本畜産学会第120回大会. 9/11-12. 酪農学園大学 (北海道江別市)

田村慎之介, 小西裕子, 枝重圭祐, 赤木悟史, 松川和嗣. 長期保存フリーズドライ体細胞を用いたウシ核移植胚の作出. 日本畜産学会第120回大会. 9/11-12. 酪

農学園大学 (北海道江別市)

枝重圭祐. 卵子および胚の低温生物学的特性とガラス化凍結保存に関する研究. 第108回日本繁殖生物学会大会. 2015/9/17-20. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県宮崎市)

福嶋和貴, 近藤詩織, 平川猛, 岩原悠樹, 横堀誠也, 越本知大, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 平衡ガラス化法によるマウス卵子の凍結保存の試み. 第108回日本繁殖生物学会大会. 2015/9/17-20. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県宮崎市)

横堀誠也, 竹下純隆, 福嶋和貴, 岩原悠樹, 越本知大, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 平衡ガラス化法を用いたゼブラフィッシュ胚のガラス化凍結保存の試み. 第108回日本繁殖生物学会大会. 2015/9/17-20. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県宮崎市)

岩原悠樹, 北山みずほ, 新見沙織, 福嶋和貴, 横堀誠也, 越本知大, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 温度感受性 TRP チャンネルの哺乳動物卵子における低温傷害への関与. 第108回日本繁殖生物学会大会. 2015/9/17-20. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県宮崎市)

Keisuke Edashige. Equilibrium vitrification, a new novel cryopreservation method. 第42回日本低温医学会総会. 2015/11/26-27. ホテル日航金沢 金沢アートホール (石川県金沢市)

### 〔図書〕(計1件)

Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Membrane permeability and aquaporins. In "Vitrification in assisted reproduction, 2nd edition, (Tucker MJ, Liebermann J. eds.)" CRC Press, Boca Raton, 2015, pp47-54.

## 6. 研究組織

### (1) 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・教授  
研究者番号：30175228

### (2) 研究分担者

松川 和嗣 (MATSUKAWA Kazutsugu)  
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：00532160