

平成22年 6月12日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300147
 研究課題名（和文）実験用小型淡水魚類卵子の凍結保存：耐凍剤チャンネルの人為的発現によるアプローチ
 研究課題名（英文）Cryopreservation of laboratory fish oocytes

研究代表者

葛西 孫三郎（KASAI MAGOSABURO）
 高知大学・教育研究部自然科学系・教授
 研究者番号：60152617

研究成果の概要（和文）：魚類卵子を凍結保存するには、サイズが小さくて細胞膜透過性が高い、未熟な未成熟卵子が適している。まず、ゼブラフィッシュの Stage III 中期卵子の体外成熟培養系を開発した。次いで、Stage III 中期卵子に一時的に水・耐凍剤チャンネル（aquaporin 3）を発現させると、成熟率～孵化率を低下させずに細胞膜透過性を向上できることを明らかにした。しかし、卵子のガラス化凍結保存には成功しなかった。

研究成果の概要（英文）：For the cryopreservation of fish oocytes, immature oocytes with smaller size and high membrane permeability are suitable. First, we developed a reliable method for *in vitro* maturation of immature zebrafish oocytes at middle stage III. Then, we showed that exogenous expression of water/cryoprotectant channel (aquaporin 3) in middle stage III oocytes increases the permeability to water and cryoprotectants without decreasing the rates of maturation and development till hatching. However, we did not succeed in the vitrification of oocytes..

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：凍結保存，魚類卵子，水チャンネル，ゼブラフィッシュ，細胞膜透過性

1. 研究開始当初の背景

実験用小型淡水魚類であるゼブラフィッシュやメダカでは、様々な系統が樹立されて遺伝学や発生学の研究に広く利用されている。しかしながら、魚類の受精卵を凍結保存する方法は開発されていないために、各系統

は継代繁殖によって維持されている。魚類の精子は凍結保存することができるので、卵子あるいは受精卵を凍結保存できれば、系統を維持するためのコストを著しく下げることができる。魚類の卵子や受精卵の凍結保存が難しい原因は、哺乳類の卵子や受精卵と比べ

て体積が著しく大きいために、体積に対する表面積の割合が小さく、耐凍剤の透過と水の流出が不十分で細胞質を十分濃縮できないために、細胞内に氷晶が形成されることによると考えられる。魚類の卵子や受精卵を凍結保存するためには、細胞膜透過性を高める必要がある。

2. 研究の目的

マウスの卵子・受精卵の耐凍性は、卵子や初期分割胚では低い、桑実胚では大きく高まる。我々は、その原因が、水透過性と耐凍剤透過性が高まることによることを明らかにしてきた。すなわち、哺乳動物胚の耐凍性が発育ステージによって異なる主要な原因は、細胞膜透過性の違いによると考えられる。したがって、サイズが大きい魚類の卵子や受精卵を凍結保存するためには、細胞膜透過性を著しく高めることが必要であると考えられる。ゼブラフィッシュやメダカでは、成熟卵子と受精卵の水透過性と耐凍剤透過性は極めて低いのに、未成熟卵子の透過性は比較的高い。そこで、ゼブラフィッシュの未成熟で小型の未成熟卵子 (Stage III 中期卵子) に、水・耐凍剤チャンネルである aquaporin 3 (以下 AQP3) の cRNA を注入してチャンネル・タンパクを大量に発現させることによって、水透過性と耐凍剤透過性を一時的に向上させることを試みた。しかし、魚類の未成熟卵子の体外培養系が確立されておらず、未成熟卵子を正常に成熟させることができなかった。そこで、まず、ゼブラフィッシュの未成熟卵子を体外で正常に成熟させることができる培養系を開発した。次に、未成熟卵子に AQP3 の cRNA を注入した後に成熟培養し、成熟率、受精率、および孵化までの発生率に影響を与えることなく細胞膜透過性を高めることができるかどうかを調べた。最後に、AQP3 を発現させた未成熟卵子のガラス化凍結を試みた。

3. 研究の方法

未成熟卵子として、成熟雌ゼブラフィッシュから、LH サージ直前にある Stage III 終期卵子 (直径 0.65~0.75 mm) と、より未熟で小型の Stage III 中期卵子 (直径 0.50~0.60 mm) を採取した。また、未成熟卵子の正常な成熟能は、成熟率だけでなく、授精後の受精率および発生培養後の孵化率によって判定した。

(1) Stage III 後期卵子の体外成熟法の開発

Stage III 後期卵子を、1 µg/ml の 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) を添加した LM 液を用いて、さまざまな条件で成熟培養し、正常な成熟に適した浸透圧、pH、培養時間、およびウシ血清アルブミン (BSA) 添

加の効果について調べた。

(2) Stage III 中期卵子の体外成熟法の開発

実験(1)の結果を基に、Stage III 中期卵子の体外成熟法を開発した。すなわち、Stage III 中期卵子を 20%ウシ胎仔血清 (FCS) および 10 IU/ml eCG を添加した 90%LM 液 (0.5% BSA 添加、pH 9.0、26°C) 中で 6 時間前培養した。それから、1 µg/ml DHP を添加した 90%LM (0.5%BSA 添加、pH 9.0、26°C) で 270 分間成熟培養し、卵子の成熟能を調べた。

(3) Stage III 中期卵子における AQP3 の人為的発現

Stage III 中期卵子に、水・耐凍剤チャンネルである AQP3 の cRNA を注入した後に 6~12 時間培養して AQP3 を発現させた。発現卵子と無処理の卵子を、25°C の 8.5%エチレングリコール、10%グリセロール、9.5% DMSO あるいは 10%プロピレングリコールを添加した 90%LM 液 (0.5%BSA 添加、pH 9.0) に浸し、その体積変化から水透過性と耐凍剤透過性を調べて、AQP3 の発現によって細胞膜透過性が向上するかどうかを調べた。一部の卵子は、cRNA を注入して 20% FCS と eCG を添加した 90%LM 液 (0.5% BSA 添加、pH 9.0、26°C) で 6 時間培養した後、1 µg/ml DHP を添加した 90%LM (0.5% BSA 添加、pH 9.0、26°C) で 270 分間成熟培養し、卵子の成熟能を調べた。

(4) AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子のプロピレングリコール毒性に対する感受性

AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子を 25°C の 10%プロピレングリコール添加 90% LM 液 (0.5%BSA 添加、pH 9.0) に 1 時間浸し、プロピレングリコール除去後に培養して、成熟能を調べた。また、卵子を 25°C の 40%プロピレングリコール、Ficoll PM-70 およびシュクロースを含む 90%LM 液 (0.5%BSA 添加、pH 9.0) (ガラス化溶液) で 1~3 分間処理した後にプロピレングリコールを希釈・除去し、除去直後の形態と培養後の成熟能によって毒性の影響を調べた。

(5) AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子のガラス化凍結保存

AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子を、25°C の 10%プロピレングリコールを含む 90%LM 液 (0.5%BSA 添加、pH 9.0) で 60 分間前処理した後、30%あるいは 40%プロピレングリコールを含むガラス化保存液で処理した。次いで、卵子を直径 0.6 mm の白金のループ (クライオループ) 上に乗せ、ガラス化溶液に移してから 2 分後に液体窒素に浸して凍結保存した。ループを 25°C の

15%プロピレングリコールを含む90%LM液(0.5%BSA添加、pH 9.0)に浸して卵子を融解し、同液に30分浸した後に90%LM液(0.5%BSA添加、pH 9.0)に30分間浸してプロピレングリコールを除去した。融解直後とプロピレングリコール除去過程での卵子の形態によって生存性をしらべた。

4. 研究成果

(1) Stage III 終期卵子の体外成熟法の開発

Stage III 終期卵子を、従来から用いられている成熟培養法で体外成熟させた場合では、多くが成熟したが、ほとんど受精・孵化しなかった。そこで、受精と孵化を正常な成熟の指標として、Stage III 終期卵子の成熟培養に適した条件をしらべた。その結果、1 µg/ml DHP と 0.5%BSA を添加したアルカリ性(pH 9.0)の90%LM液(0.29 Osmol/kg)で270分間培養して成熟させると、高率に受精(70%)・孵化(63%)させることができることを見出した。

(2) Stage III 中期卵子の体外成熟法の開発

Stage III 中期卵子を、Stage III 終期卵子の成熟に適した方法で培養した結果、成熟率と授精後の受精率は、それぞれ38%と30%にとどまった。そこで、20%FCS および 10 IU/mL eCG を添加した90%LM液(0.5%BSA添加、pH 9.0)で6時間前培養したのち、Stage III 終期卵子の成熟に適した方法で培養した結果、成熟率(86~89%)と受精率(59~73%)は大きく向上した。また、一部の受精卵は培養後に孵化した(8~13%)。このように、Stage III 終期卵子より小型のStage III 中期卵子を正常に体外成熟させることができた。

(3) Stage III 中期卵子における AQP3 の人為的発現

Stage III 中期卵子に AQP3 を発現させた結果、水透過性と耐凍剤透過性は約2倍向上した。この卵子の成熟率、受精率、孵化率は、いずれも AQP3 cRNA を注入しなかった卵子の値と比べて有意な差はなかった。したがって、AQP3 の人為的発現は、Stage III 中期卵子の透過性を高める有効な手段と判断できる。

(4) AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子のプロピレングリコール毒性に対する感受性

実験(3)において、AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子の耐凍剤透過性に、耐凍剤による大きな違いはみられなかった。そこで、メダカの未成熟卵子に対する毒性が最も低かったプロピレングリコールを、ゼブラフィッシュ Stage III 中期卵子の凍結に適した耐凍剤として選択し、その毒性をしらべた。25°C

の10%プロピレングリコール添加90%LM液(0.5 M BSA 添加)に1時間浸しても、AQP3 発現の有無にかかわらず、成熟率、受精率、孵化率はほとんど低下しなかった。しかし、40%プロピレングリコール、Ficoll PM-70 およびシュクロースを含むガラス化保存液に25°Cで1~3分間浸した場合には、成熟率および受精率は著しく低下し、孵化した卵子は無かった。AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子のプロピレングリコール毒性は比較的低いと思われるが、高濃度のプロピレングリコールを含むガラス化溶液で処理するときには、注意を要することがわかった。

(5) AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子のガラス化凍結保存

AQP3 を発現させた Stage III 中期卵子を、プロピレングリコールベースのガラス化溶液を用いてクライオループで超急速ガラス化凍結した結果、AQP3 を発現させても、全ての卵子が融解後に細胞膜が破裂して死滅した。したがって、細胞内氷晶形成による傷害を受けたと推察された。ゼブラフィッシュ卵子の凍結保存を実現するためには、さらに小さい未成熟卵子を用い、細胞膜透過性をさらに向上させることによって、細胞内氷晶形成を防ぐ必要があると考えられる。

従来、魚類卵子は凍結保存できないと考えられてきた。我々の一連の研究は、より小型の未成熟卵子を用い、細胞膜透過性を人為的・一時的に向上させることによって凍結保存を可能にしようとするもので、先駆的な試みである。現在のところ、成功には至っていないが、著者らの研究の後、さらに未熟な卵子の凍結保存と体外成熟培養系に関する研究が報告された。我々の着想と研究が、これまで不可能と考えられてきた魚類の卵子の凍結保存の可能性を示したからであろうと考えられる。細胞膜透過性をさらに向上させ、さらに未熟で小型の卵子を正常に体外成熟させることができれば、魚類卵子の凍結保存が実現すると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Eri Hotta, Yukiko Kobayashi, Kaori Ito, Go Egawa, Shinsuke Seki, Hiroshi Honda, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Equilibrium vitrification of mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 82(2), 444-450, 2010. 査読有
- ② Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Ryoma Tsuchiya, Delgado M. Valdez Jr.,

- Bo Jin, Takao Hara, Naoya Saida, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. *Reproduction*, 135(3), 285-292, 2008. 査読有
- ③ Bo Jin, Kenji Kusanagi, Makiko Ueda, Shinsuke Seki, Delgado M. Valdez Jr., Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*, 56(3), 233-240, 2008. 査読有
- ④ Bo Jin, Chihiro Yamasaki, Naoko Yamada, Shinsuke Seki, Delgado M. Valdez Jr., Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. The mechanism by which mouse spermatozoa are injured during freezing. *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 265-269, 2008. 査読有
- ⑤ Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Takao Hara, Naoya Saida, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. The permeability to water and cryoprotectants of immature and mature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology*, 54(1), 121-124, 2007. 査読有
- ⑥ Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Takao Hara, Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Exogenous expression of rat aquaporin-3 enhances permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Reproduction and Development*, 53(3), 597-603, 2007. 査読有
- ⑦ Keisuke Edashige, Satoshi Ohta, Mitsunobu Tanaka, Tatsunaga Kuwano, Delgado M. Valdez Jr., Takao Hara, Bo Jin, Sei-ichi Takahashi, Shinsuke Seki, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biology of Reproduction*, 77(2), 365-375, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 28 件)
- ① Bo Jin, Eri Hotta, Yukiko Kobayashi, Kaori Ito, Go Egawa, Shinsuke Seki, Hiroshi Honda, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Equilibrium vitrification of mouse embryos. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo.
- ② Keisuke Edashige, Delgado M. Valdez Jr., Hiroshi Honda, Yu Nishikado, Bo Jin, Magosaburo Kasai. Survival of oocytes in antral follicles of vitrified mouse ovaries. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo
- ③ Keisuke Edashige, Bo Jin, Ryu-ichi Higashiyama, Jun-ichi Yonezawa, Masashi Miyake, Sei-ichi Takahashi, Ken-ichi Yazawa, Magosaburo Kasai. Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes -its relevance to their tolerance to cryopreservation-. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo.
- ④ Shinsuke Seki, Keisuke Edashige, Peter Mazur. Effect of the expression of aquaporins 1 and 3 in mouse MII oocytes on the nucleation temperature for intracellular ice formation. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo.
- ⑤ Delgado M. Valdez. Jr., Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Bo Jin, Masahiro Yoshimura, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Permeability to water and cryoprotectants of zebrafish (*Danio Rerio*) oocytes at mid stage III. The 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte.
- ⑥ Keisuke Edashige, Takao Hara, Yasunori Kawai, Masahiro Yoshimura, Bo Jin, Delgado M. Valdez, Jr., Magosaburo Kasai. The pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. The 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte.
- ⑦ Keiji Mochida, Chihiro Koshimoto, Keisuke Edashige, Kentaro Aizawa, Kyuichi Taguma, Akihiko Ohta, Atsuo Ogura. Effects of raffinose concentration and methyl-beta-cyclodextrin on IVF with cryopreserved C57BL/6 sperm. The 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte.
- ⑧ Shinsuke Seki, Bo Jin, Tsuchiya Ryoma, Toshimitsu Kouya, Takao Hara, Delgado M. Valdez Jr., Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Exogenous expression of rat aquaporin-3 enhances

- permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). The 5th Annual Conference of the Asia Reproductive Biotechnology Society. Nov. 27-Dec. 1, 2008, Kunming.
- ⑨ Bo Jin, Kenji Kusanagi, Makiko Ueda, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Intracellular ice formation in vitrified mouse morulae during warming. The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, January 7-9, 2007, Kyoto.
- ⑩ Keisuke Edashige, Satoshi Ohta, Mitsunobu Tanaka, Tatsunaga Kuwano, Delgado M. Valdez Jr., Takao Hara, Bo Jin, Sei-ichi Takahashi, Shinsuke Seki, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin-3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara.
- ⑪ Shinsuke Seki, Kouya Toshimitsu, Ryoma Tsuchiya, Delgado M Valdez Jr., Bo Jin, Naoya Saida, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Cryobiological properties of immature oocytes assessed by the ability to be fertilized and to develop to term. The 44th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-August 1, 2007, Lake Louise.
- ⑫ Delgado M. Valdez Jr., Seki Shinsuke, Takao Hara, Naoya Saida, Yu Nishikado, Kasai Magosaburo, Edashige Keisuke. Assessment of the cryoprotectant permeability and cryoprotectant toxicity of aquaporin 3-expressing immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes. The 44th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-August 1, 2007, Lake Louise.
- ⑬ Keisuke Edashige, Satoshi Ohta, Tomomi Kajino, Tatsunaga Kuwano, Bo Jin, Delgado M. Valdez Jr., Shinsuke Seki, Magosaburo Kasai. The role of urea transporters in the movement of cryoprotectants across the plasma membrane in mouse morulae. The 44th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-August 1, 2007, Lake Louise.
- ⑭ Chihiro Koshimoto, Yuuki Schichi, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai, Keiji Mochida, Akio Shinohara. Simple technique to improve motility and fertility in frozen C57BL/6J mouse sperm. The

44th annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-August 1, 2007, Lake Louise.

〔図書〕（計2件）

- ① Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Movement of water and cryoprotectants in mouse oocytes and embryos at different stages: relevance to cryopreservation. In "Fertility Cryopreservation", (Ri-Cheng Chian and Patrick Quinn, eds.), pp16-23, 2010, Cambridge University Press, Cambridge.
- ② Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Vitrification in animal reproduction: vitrification of embryos using conventional straws with an ethylene glycol-based solutions. In "Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual and Trouble-Shooting Guide", (Michael J. Tucker and Juergen Liebermann, eds.), pp75-85, 2007, Informa Healthcare, London.

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛西 孫三郎 (KASAI MAGOSABURO)
高知大学・教育研究部自然科学系・教授
研究者番号：60152617

(2)研究分担者

枝重 圭祐 (EDASHIGE KEISUKE)
高知大学・教育研究部自然科学系・教授
研究者番号：30175228
越本 知大 (KOSHIMOTO CHIHIRO)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授
研究者番号：70295210