

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430188

研究課題名(和文)哺乳類のフリーズドライ精子における高温耐性獲得に関する研究

研究課題名(英文)Study on mammalian spermatozoa freeze-dried to withstand high temperature storage

研究代表者

日下部 博一 (Kusakabe, Hirokazu)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60344579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのフリーズドライ精子を作製するとき使用する精子処理液(ETBSという)のpHを弱アルカリ付近(8.0～8.4)に設定するか、またはETBSに含まれるナトリウムイオンをカリウムイオンに代えてフリーズドライすれば、フリーズドライ精子の染色体(DNA)は、高温短期間暴露(40℃で1週間、50℃で3日間)または室温長期保存(25℃、1～8か月)に耐えることができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Chromosomes (DNAs) of freeze-dried mouse spermatozoa could withstand high temperature storage for short term (3 days to 1 week, 40 or 50 °C) or long term (1 to 8 months, 25 °C), when the spermatozoa were freeze-dried using EGTA/Tris-HCl-buffered solution (ETBS) adjusted its pH values to 8.0 to 8.4, or using sodium-free ETBS containing potassium ions.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：フリーズドライ 精子 高温保存 室温保存 染色体 DNA 受精卵 コメットアッセイ

1. 研究開始当初の背景

世界中で食品・医薬品などの製造分野でフリーズドライ製法が普及している。フリーズドライ製法は、その製品が本来もつ品質や活性を長期間安定に保つことができ、さらに輸送や運搬の時に、または災害や事故などによって低温の保存条件が維持できなくなった時に、一時的に高温条件に曝されても製品が劣化しにくいというメリットをもつ。

一方、哺乳類の配偶子(精子や卵子)の保存は、液体窒素による凍結保存が主流である。精子の場合、フリーズドライすると、精子を非凍結条件で保存(冷蔵または室温保存)できると考えられるが、マウスの精子をフリーズドライすると、精子の染色体に構造異常が誘発されやすい傾向があることから、我々は2001年にフリーズドライ用の精子処理液(ETBS: 50 mM NaCl+50 mM EGTA+10 mM Tris-HCl, pH 8.2~8.4)を報告した¹⁾。さらに2008年には、染色体ダメージを抑える効果が高い改良型 ETBS (50 mM EGTA+100 mM Tris-HCl, pH 7.7~7.9)を報告した²⁾。この改良型 ETBS はオリジナル型から NaCl を除いたよりシンプルな組成である。なお、ETBS に高濃度のカルシウムイオンキレート剤(EGTA)を加えている理由は、精子細胞膜破壊によってもたらされる精子由来ヌクレアーゼの活性化³⁾を抑えるためである。

マウスのフリーズドライ精子から受精卵を作製するときには、フリーズドライ精子に水を加える。しかし、水を加えても精子は動かないため、卵細胞室内精子注入法(ICSI)により未受精卵に注入する必要がある。受精卵の第一卵割中期で染色体標本作製すると、正常であれば精子由来または卵子由来の染色体が20本ずつ(計40本)観察できるが、フリーズドライ精子を室温(25°C)で保存すると、精子由来の前核が形成されなかったり、またはたとえ染色体が形成されたとしても切断型の構造異常や他の染色体との間に交換型の異常が誘発されたりすることがある。冷蔵(4°C)であれば、少なくとも1年間は染色体ダメージをもつ受精卵の頻度は増加しないが^{2),4)}、室温保存(25°C)の場合、わずか1~2か月の間で染色体ダメージの頻度は50%程度に急増する^{5),6)}。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、高温暴露(40°Cまたは50°C)に強いフリーズドライ精子の作製方法を考案し、さらにその方法によって作製されたフリーズドライ精子を室温長期間保存した場合、精子染色体が劣化しにくくなるかどうかを調べることである。

Kaneko ら(2003年)⁷⁾は、マウスの精子をフリーズドライするときの精子処理液の最適 pH は 8.0 であることを報告している。つまり、フリーズドライそのものに起因する精子の染色体ダメージのレベルは、精子処理液の pH によって変わることが示されている。

さらに Kawase ら(2005年)⁸⁾によって、保存温度に依存した胚発生率の低下が報告され、保存温度をいくつか設定することにより、短期間で長期保存の影響を予測できることが示された。本研究においてはこれら2つの先行論文を参考にして、ETBS の pH を 5.0~8.4 に設定してフリーズドライ精子を作製し、そのフリーズドライ精子を極端に高い温度(50°C)に3日間だけ置き、フリーズドライ精子の DNA ダメージを単一細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)により調べた。また、同様の条件で保存した精子から卵細胞質内精子注入法(ICSI)により受精卵を作製し、第一卵割中期で染色体ダメージを調べた。コメットアッセイと受精卵アッセイの結果から、ダメージが最も少ない pH 条件を決定し、その条件で作製したフリーズドライ精子を、今度は室温長期間保存(25°C、1か月間)し、染色体ダメージのレベルを調べた。

なお、本研究では ETBS に含まれる金属イオンにも着目した。ETBS に含まれる EGTA は、これまでは水酸化ナトリウム(NaOH)を加えて溶解させてきたため、ETBS にはナトリウムイオン(Na⁺)が含まれている。本研究では EGTA を溶解させるアルカリ剤を NaOH ではなく水酸化カリウム(KOH)を使用することにより、完全に Na⁺フリーだがその代わりにカリウムイオン(K⁺)を含む新しい ETBS (K-ETBS)を調製した。K-ETBS で作製したフリーズドライ精子に対する高温短期間保存(50°C、3日間)と室温長期間保存(25°C、7か月間)の影響を、NaOH で調製した ETBS (以後、Na-ETBS と表記する)を用いたときの結果と比較した。

3. 研究の方法

(1) フリーズドライ精子

7週齢~12週齢のマウス(B6D2F₁, 日本チャールスリバー)から精巣上体尾部の切除片を採取した。それを NaOH と塩酸(HCl)で pH 5.0~8.4 に調整した Na-ETBS (50 mM EGTA+100 mM Tris-HCl) または KOH と塩酸(HCl)で pH 6.0~8.4 に調整した K-ETBS (50 mM EGTA+100 mM Tris-HCl) に加えた。精子を 37°C で 10 分間スィムアップさせ、その精子懸濁液を 3 日間冷蔵(4°C)することにより、精子を ETBS で前処理した。精子懸濁液(100 µl)をガラスアンプルに加え、液体窒素で凍結させた後、直ちに凍結乾燥機(Labconco、型式: Freezone 2.5)に装着し、4時間真空状態を維持(133×10⁻³mbar 以上の陰圧)し、水分を蒸散させたのちに真空状態を維持したまま熔封した。

Na-ETBS で作製したフリーズドライ精子は、冷蔵(4°C、3日間)、高温条件(50°C、3日間)、室温条件(25°C、3日間または1か月)で保存した。K-ETBS で作製したフリーズドライ精子については、冷蔵(4°C、3日間または7か月)、高温短期間保存(50°C、3日間)または室温長期間保存(25°C、7か月間)を

行った。また、7か月間の冷蔵（4℃）の途中で、日本の夏の最高気温付近である 40℃に1週間または1か月間だけ置いた。

(2) 単一細胞ゲル電気泳動法（コメットアッセイ）

フリーズドライ精子のガラスアンプルをカットし、100 μlの水を加えた。コメットアッセイは、Kusakabe と Tateno (2011年)の方法⁹⁾に一部修正を加えて実施した。30 μlの精子懸濁液を70 μlの1%低融点アガロース/PBSに加え、それを予め1%アガロース/PBSでスメアしたスライドガラス上に滴下し、カバーガラスをかけた。冷蔵（4℃）して固化させた後、カバーガラスを除去し、細胞溶解液 [10 mM DTT, 2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl(pH7.4)] に加えて2時間冷蔵（4℃）した後、37℃で1時間置いた。300 mM NaOH溶液で1分間処理した後、TAE緩衝液で10分間電気泳動（10mA, 12V）した。エタノールに加えて固定し、風乾した。SYBR Goldで染色して得られた画像を画像解析ソフト（CometAnalyzer, Youworks Co.）で画像解析し、DNAダメージのレベルを“% of DNA in the comet tail”（% tail DNA）として表した。

(3) 第一卵割中期における染色体分析（受精卵アッセイ）

加水したフリーズドライ精子を、過排卵誘起したマウス（7週齢～12週齢雌、B6D2F₁、日本チャールスリバー）から採取した未受精卵に卵細胞質内精子注入法（ICSI）¹⁰⁾により注入した。ICSI終了後の卵を修正型CZB培地¹¹⁾で培養した。ICSI終了から5～6時間経過後、0.1 μg/mlのコレセミドを含む修正型CZB培地に移し、更に12～16時間経過後に漸進固定空気乾燥法¹²⁾により第一卵割中期で染色体標本作製した。4%ギムザで染色した標本を光学顕微鏡で観察し、構造的染色体異常を検出した。

(4) 受精卵の胚発生の観察

フリーズドライ精子に由来する受精卵の一部は、ICSI終了後4～5日間培養し、胚盤胞形成率を調べた。さらに、別の受精卵を2～4細胞期胚まで培養し、偽妊娠マウス（Crlj:CD-1(ICR)、日本チャールスリバー）の卵管に移植し、妊娠18日目における正常胎仔の発生率を調べた。

4. 研究成果

(1) DNAダメージ

図1は、Na-ETBSで作製したフリーズドライ精子を50℃で3日間保存したときのDNAダメージをコメットアッセイで調べた結果である。フリーズドライ精子を4℃で3日間保存しても、DNAダメージのレベル（% tail DNA）は、酸性域のpH 5.0と6.0におい

てやや高いレベルを示したものの、それら以外のpHではほぼ20%程度となり、低く抑えられた。一方、50℃で3日間保存すると、酸性域のpH 5.0と6.0においては80%のDNAダメージレベルを示したが、これは検出ソフトの測定限界であり、極めて強いDNAダメージを表している。これらの高いダメージレベルは、Na-ETBSのpHに依存して低下した。

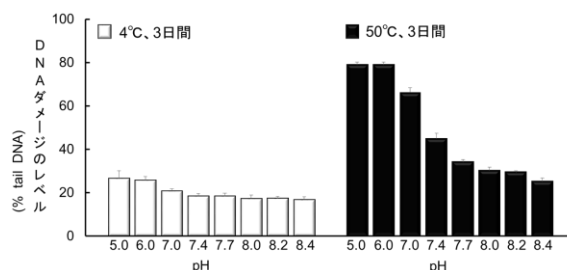


図1 Na-ETBSで作製したフリーズドライ精子を用いたコメットアッセイ

図2は、K-ETBSで作製したフリーズドライ精子を高温短期間保存（50℃、3日間）したときのDNAダメージレベルを示し、図1のNa-ETBSにおける一部のデータと比較した結果である。Na-ETBSとK-ETBSともにpH 7.7～8.4において、同じpHでは同程度のダメージレベルを示した。ただし、酸性域（pH 6.0）におけるダメージレベルはK-ETBSの方が小さかったため、同じpHであれば、どの精子処理液でも同程度の高温耐性を示すかどうかを結論づけるためには、他のアルカリ剤（例えばアンモニア等）についても検討する必要があると思われる。

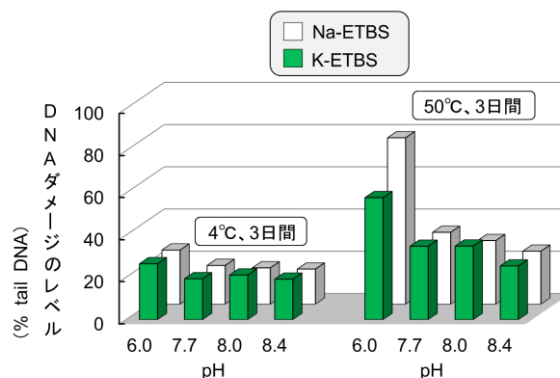


図2 Na-ETBSまたはK-ETBSで作製したフリーズドライ精子を用いたコメットアッセイ

ただし、pHに依存してDNAダメージのレベルが低下することは両ETBSに共通していることから、精子をフリーズドライするとき

には精子処理液の pH を高めに設定すれば、できあがったフリーズドライ精子は高温に対して耐性をもつようになることが判明した。

(2) 染色体ダメージ

フリーズドライ精子をマウスの未受精卵に注入して受精卵の第一卵割中期で染色体分析した結果を図 3 に示す。Na-ETBS で作製したフリーズドライ精子を 50°C で 3 日間保存した場合、4°C で 3 日間保存したときよりも染色体ダメージをもつ受精卵の頻度が各 pH において高くなったが、酸性域 (pH 5.0) では酸の影響のため、4°C 保存においても 99% という極めて高いダメージレベルとなった。4°C と 50°C 保存ともにダメージレベルは pH に依存して低下し、pH 8.0 以上ではほぼ一定となった。なお、pH 7.7 以下の 4°C 保存サンプルにおいては、コメットアッセイの結果とは異なり、ダメージレベルが高い結果となった。両アッセイ結果に矛盾が生じた理由は、コメットアッセイが DNA ダメージのみを検出するのに対し、染色体ダメージは DNA 以外のターゲット、すなわち精子細胞膜や精子核のタンパク質に対するダメージが構造的染色体異常として現れ、それらを検出している可能性があるためと解釈される。

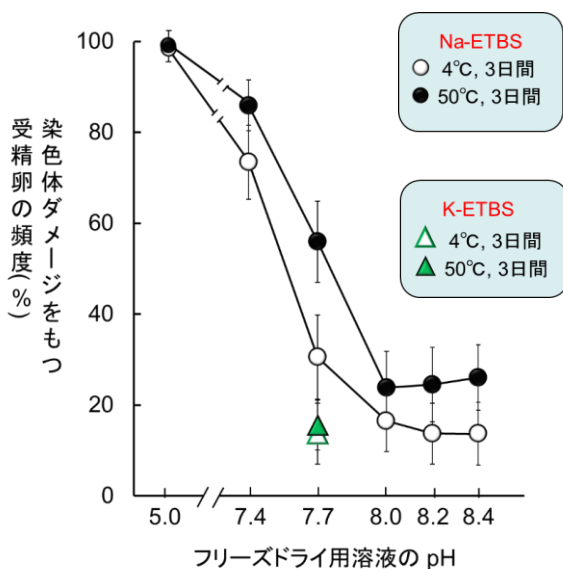


図 3 Na-ETBS または K-ETBS で作製したフリーズドライ精子による受精卵の染色体ダメージ

一方、K-ETBS で作製したフリーズドライ精子については pH 7.7 のみのデータを示す。K-ETBS (pH 7.7) で作製したフリーズドライ精子を 4°C と 50°C で 3 日間保存すると、

Na-ETBS よりも低めの pH (7.7) であっても染色体ダメージのレベルが 20% 未満に抑えられた。しかも Na-ETBS に比べ、高温保存に対する影響がきわめて少ないことがわかった。つまり、フリーズドライ溶液として Na-ETBS を使用するときには、溶液の pH を 8.0 以上に設定すべきであるが、K-ETBS を用いる場合は少なくとも 7.7 まで下げることができることを意味する。フリーズドライ前に精子を採取するときは、より生理的条件に近い pH の方がスィムアップ法による回収がしやすく、さらにフリーズドライ精子が卵を活性化させる能力もアルカリの影響が少ない方が維持されやすい (未公表データ) ため、今後、K-ETBS が高温耐性を発揮できる pH の下限を調べる必要がある。

Na-ETBS の pH を 8.2 に設定してフリーズドライ精子を作製した場合、低い pH (7.7) で作製したときと比べ、高温短期間保存 (50°C、3 日間) に対する影響だけではなく、室温長期保存に対する影響が軽減される可能性も示唆された (図 4)。その理由は、pH 7.7 の場合、室温 (25°C) で 1 か月間保存しただけで、染色体ダメージをもつ受精卵の頻度が 45% に急増するが、pH 8.2 では 20% に抑えられていたからである。

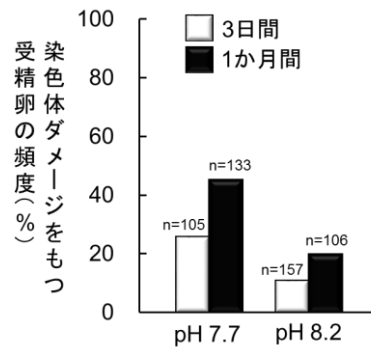


図 4 Na-ETBS で作製後、室温保存 (25°C) したフリーズドライ精子による受精卵の染色体ダメージ

さらに、K-ETBS (pH 7.7) で作製したフリーズドライ精子は、同じ pH 付近 (pH 7.7 ~ 7.9) の Na-ETBS で作製したフリーズドライ精子よりも室温長期保存 (25°C) に対する影響を受けにくいことが判明した (図 5)。つまり、ETBS の pH 以外にも ETBS に含まれる一価の金属イオンの種類が、フリーズドライ精子染色体の高温耐性獲得に大きく影響することが示唆された。

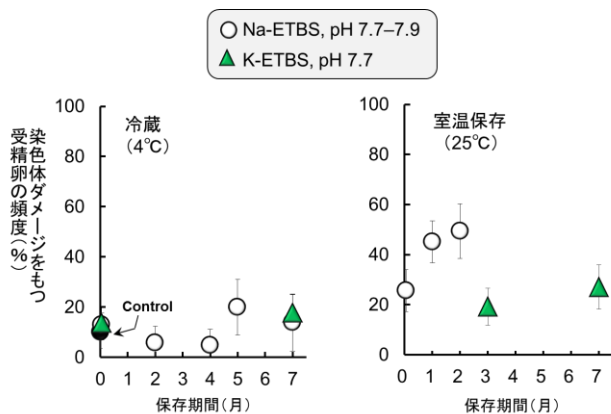


図5 Na-ETBSまたはK-ETBSで作製後、長期間保存したフリーズドライ精子の染色体ダメージ

(3) 胚発生

K-ETBS (pH 7.7) で作製したフリーズドライ精子については、高温耐性および室温長期保存の影響を、受精卵の胚盤胞形成率および妊娠 18 日目の正常胎仔への発生を調べることもよっても評価した (図 6)。冷蔵 (4°C) で 7 か月間保存した場合の胚盤胞形成率 (82%) と胎仔発生率 (52%) は、同じく冷蔵 (4°C) だが途中で日本の夏の最高気温付近 (40°C) に 1 週間だけ曝しても低下しないことがわかった。ただし、1 か月曝した場合は有意 ($P < 0.05$) な低下が認められた。また、25°C で 7 か月間保存した場合、受精卵の胚盤胞形成率は 63% に低下するが、胎仔発生率 (44%) は、冷蔵 (4°C) で 7 か月間保存したときと比べて有意差はなかった (Fisher's exact probability test, $P \geq 0.05$)。つまりこの結果は、K-ETBS (pH 7.7) で作製したフリーズドライ精子を室温で長期保存 (25°C、7 か月) しても染色体が劣化しにくいという結果 (図 5) をサポートしている。

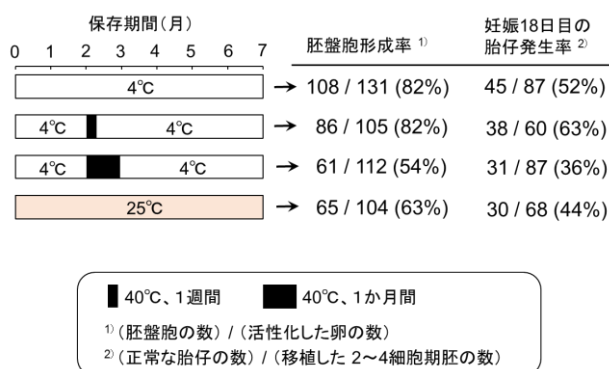


図6 K-ETBS で作製後、長期保存 (7 か月間まで) したフリーズドライ精子による受精卵の胚発生率

今後は K-ETBS の pH を 8.0 以上に、または 7.7 未満に調整し、染色体ダメージのレベルがどうなるかを調べる必要があると思われる。

また、pH を 8.2~8.4 に調整した Na-ETBS でフリーズドライ精子を作製し、8 か月間冷蔵または室温保存した場合、妊娠 18 日目の正常胎仔への発生率はそれぞれ 55% (移植した 2~4 細胞期胚の数: 40) および 29% (移植した 2~4 細胞期胚の数: 106) となった。しかし、同一の保存期間内に行った実験ではないこともあり、Na-ETBS (pH-8.2-8.4) と K-ETBS (pH 7.7) のどちらが高温・室温保存に適した精子処理液であるかを、発生率の結果のみから結論づけることは現時点では難しいと思われる。

(4) pH と金属イオンの変更によるフリーズドライ精子の高温耐性獲得について

Na-ETBS で作製したフリーズドライ精子は、冷蔵以下の低温保存であれば年単位または半永久的に保存することも可能である。しかし、いったん室温に暴露されると、DNA/染色体ダメージが時間とともに蓄積する。そのダメージを抑制する手段として、本研究開始時には Na-ETBS の pH に着目した。もちろん、Na-ETBS の pH を高く設定することは、Na-ETBS 中の水素イオン濃度を低くすることであり、このことは水素イオン濃度と温度に依存して進行するフェントン反応 (DNA にダメージを与える活性酸素種のヒドロキシラジカルを生じる)¹³⁾ を起こりにくくする効果はあるかもしれない。また、低い pH と高い温度に依存した DNA の酸分解¹⁴⁾ や、低い pH 依存性ヌクレアーゼの存在¹⁵⁾ (精子では見つかっていない) など、細胞の周りの低 pH 環境がその細胞の DNA またはタンパク質に与える影響は様々である。ただし、真空乾燥状態で保存された精子にどのような種類の染色体劣化反応が進行するのかは特定できていない。

本研究期間の後半には、キレート剤 (EGTA) を溶解させるためのアルカリ剤を NaOH から KOH に変更した。ETBS 中にある Na⁺ を K⁺ に代えるとフリーズドライ精子染色体の高温耐性が高まる理由については未だ不明であり、今後の検討課題である。しかし、Na⁺ と K⁺ は、染色体のテロメア DNA (TTAGGG) が造る特殊な構造 (G-quadruplex) の安定化に関わっていることが知られている^{16,17)}。もしかすると、高温・室温保存でフリーズドライ精子染色体が安定化するためには通常の細胞内環境 (K⁺ 環境) の方が、Na⁺ 環境よりも適しているのかもしれない。

<引用文献>

1) Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, & Yanagimachi R. (2001) Maintenance of

- genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13501–13506.
- 2) Kusakabe H, Kamiguchi Y & Yanagimachi R. (2008) Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod* 23, 233–239.
 - 3) Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E & Ward WS. (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 26, 272–280.
 - 4) Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG & Yanagimachi R. (2003) Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod* 69, 2100–2108.
 - 5) Kusakabe H. (2011) Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa. *Reprod Med Biol* 10, 199–210.
 - 6) Kusakabe H & Tateno H. (2011) Characterization of chromosomal damage accumulated in freeze-dried mouse spermatozoa preserved under ambient and heat stress conditions. *Mutagenesis* 26, 447–453.
 - 7) Kaneko T, Whittingham DG & Yanagimachi R. (2003) Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68, 136–139.
 - 8) Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K & Suzuki H. (2005) Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 72, 568–573.
 - 9) Kusakabe H & Tateno H. (2011) Shortening of alkaline DNA unwinding time does not interfere with detecting DNA damage to mouse and human spermatozoa in the Comet assay. *Asian J Androl* 13, 172–174.
 - 10) Kimura Y & Yanagimachi R. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52, 709–720.
 - 11) Chatot CL, Ziomek A, Bavister BD, Lewis JL & Torres I. (1989) An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 86, 679–688.
 - 12) Mikamo K & Kamiguchi Y. (1983) A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In *Radiation-induced chromosome damage in man* (ed. Ishihara T & Sasaki MS), New York: Alan R. Liss, 411–432.
 - 13) Muir ML, Giacomoni PU & Tachon P. (1993) Modulation of DNA breakage induced via the Fenton reaction. *Mutat Res* 295, 47–54.
 - 14) Leung EM, Deng K, Wong TY & Chan W. (2016) Determination of DNA adducts by combining acid-catalyzed hydrolysis and chromatographic analysis of the carcinogen-modified nucleobases. *Anal Bioanal Chem* 408, 953–961.
 - 15) Famulski KS, Macdonald D, Paterson MC & Sikora E. (1999) Activation of a low pH-dependent nuclease by apoptotic agents. *Cell Death Differ* 6, 281–289.
 - 16) Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA & Yang D. (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* 34, 2723–2735.
 - 17) Fletcher TM. (2003) Telomere higher-order structure and genomic instability. *IUBMB Life* 55, 443–449.
5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
- [学会発表] (計 3 件)
- ① 目下部 博一、高温・室温保存したフリーズドライ精子における染色体異常誘発の抑制、日本卵子学会 シンポジウム 1 (招待講演)、2016 年 5 月 14 日、新潟市
 - ② 目下部 博一、立野裕幸、フリーズドライ精子作製の精子処理液の pH と精子染色体異常の誘発について、財団法人染色体学会 第 65 回 (2014 年度) 年会、2014 年 10 月 24 日、25 日、倉敷市
 - ③ 目下部 博一、フリーズドライ精子における染色体異常生成とその抑制、日本生殖医学会 シンポジウム 2 (招待講演)、2013 年 11 月 15 日、神戸市
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
目下部 博一 (KUSAKABE, Hirokazu)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60344579