

# 精製ペプチドを用いた卵巣の過冷却保存

広島大学大学院生物圏科学研究科・助教 星野 由美

## ■ 目的

生殖細胞の保存には凍結保存法が広く用いられている。凍結を伴う保存は、液体窒素中で半永久的に保存できるメリットがある一方で、保存液に含まれる凍害保護物質の細胞毒性や凍結障害による細胞へのダメージは、受精率や発生率を低下させる原因となっている。研究代表者は、凍結を伴わない細胞の保存法を追求し、植物由来の水結晶抑制物質が卵子の過冷却保存に有効であること示してきた。共同研究者である関西大学の河原秀久教授のグループは、氷晶形成抑制効果はアミノ酸組成に依存することを報告している。すなわち、有効なアミノ酸を同定できれば、簡便で安定した過冷却保存法を確立できる可能性がある。生殖細胞の凍結保存は一般的な技術になったが、近年では、卵巣機能の温存を目的に卵巣保存も注目されている。卵巣は複雑な構造で維持されているため、凍結保存の成功事例は極めて少なく、現在までのところ組織片での保存にとどまっている。そこで本研究では、過冷却促進効果のある化合物とアミノ酸(ペプチド)に着目して、卵巣の過冷却保存の可能性を追求することを目的とした。

## ■ 方法

過冷却促進物質としての効果が報告されているカフェインの構造を指標にして、抗氷核活性を比較し、候補化合物を選定した。同様に、抗氷核活性を期待できるアミノ酸の候補を選定した。過冷却促進効果を検証するため、化合物とアミノ酸およびそのペプチドは臓器保存液(UW液)に1mg/mlの濃度で添加した。卵巣は3週齢ICR雌マウスから摘出し、200 $\mu$ Lの保存液に卵巣1個を浸漬した。温度制御および維持には超低温アルミブロック恒温槽(クライオポーター)を使用し、 $-6 \sim -10^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で24時間の保存を行った。回復処理後、卵巣の健全性を評価するため、組織学的解析を行い、過冷却保存への有効性を検討した。

## ■ 結果および考察

化合物の抗氷核活性値を比較し、カフェイン、ヒポキサンチン、尿酸を候補物質として選定した。また、抗氷核活性の高いアミノ酸として、スレオニン、セリン、チロシン、フェニルアラニンを選定し、それぞれ重合度の異なるペプチドを作製した。それぞれの過冷却促進効果を検証し、いずれの化合物・ペプチドを添加した場合でも、 $-6 \sim -10^{\circ}\text{C}$ の温度条件では過冷却状態を維持できることを確認した。しかしながら、24時間保存後の卵巣では、卵胞膜の硬化と卵胞構造の崩れが認められ、低温障害による影響と考えられた。カフェインを含むコーヒー粕由来抽出物では、保存後の卵巣形態は未処理の卵巣と遜色なく維持されていた。コーヒー粕由来の抽出物には、ポリフェノールやクロロゲン酸などが含まれており、これらの物質が過冷却促進物質であるカフェインと相乗して、卵巣保存に機能したと考えられる。今回検討した化合物やアミノ酸(ペプチド)には過冷却促進効果が認められたことから、低温障害を軽減させるために不凍タンパク質や抗酸化物質と組み合わせることによって、効果の高い保存液の改良に繋がると考えられる。

## ■ 結語

本研究では、化合物やアミノ酸の構造特性を利用して過冷却状態を維持できることを示した。適切な条件を構築できれば、細胞・組織の低温障害を軽減できる可能性があり、卵巣の過冷却保存の実現も期待される。