

## 先端技術動向

### 第67回低温生物工学会大会（Web開催）に参加して

開催日：令和4年6月25～26日

参加方法：オンライン視聴

参加報告者：家畜バイオテクセンター 済木 京

#### 1. はじめに

本学会は理学、農学、工学、医学、薬学、化学、物理化学、動植物学という幅の広い研究対象を議論とするため、異分野横断の学会となっている。今回参加した第67回低温生物工学会においても食品科学、昆虫学、動植物学や医療分野までと多分野のセミナーおよび発表があり、その中から、ウシ体外受精卵の保存方法の検討に対して参考となる発表について視聴した。

#### 2. 概要

##### ・新しい凍結保存剤としての人工イオン（金沢大学生命理工学系：黒田浩介）

金沢大学にて開発された双性イオン液体（zwitterionic liquid(ZIL)）であるOE2imC3Cについての報告で細胞凍結保存技術や非水溶性薬剤の溶媒として用いられるDMSOは、細胞毒性が問題とされる。OE2imC3CはDMSOと同程度の濃度で、ヒト線維芽細胞の凍結保存後の生存細胞が認められ、その凍結保護効果が報告された。また、OE2imC3Cは現時点で判明している範囲においてはDMSOと異なり、細胞内に取り込まれないため低毒性と推察されていた。ただし、DMSOとの併用では凍結保存による細胞内外の両方での凍結保護作用について有用性も検証

されている。DMSOは細胞内に移行する際に周囲の物質を伴って移行することがある。この作用でOE2imC3Cが細胞内に移行する可能性とその毒性については未検証との発表であった。

##### ・トレハロースを用いたアクアポリン4発現CHO細胞の凍結速度依存性（北海道大学：松尾董他）

トレハロースは細胞親和性が高いものの細胞膜非透過性の凍結保護剤であり、細胞内外の浸透圧差によって細胞内水を脱水して細胞内の凍結氷晶を間接的に抑制している効果がある。しかし、この方法で凍結保存できない細胞も存在しており、その凍結保存メカニズムは解明されていない。また一方、トレハローストランスポーターを発現させた細胞を用いて細胞内にトレハロースを輸送すると凍結保存効果が向上することが報告されている。加えて、細胞膜に存在する水透過性を高めるアクアポリン(AQP4)を発現させた細胞を用いた凍結保存研究も行われている。そこで本研究ではAQP4発現/非発現CHO-K細胞を凍結保護剤なし、10%DMSO、500mMトレハロースの3種類の培養液で $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ から $-200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ （約 $2\text{K}/\text{min}$ ～約 $155\text{K}/\text{min}$ ）の凍結速度で凍結した結果

を報告された。その結果、低速凍結 (<30K/min)では AQP4 発現/非発現 CHO-K 細胞間の生存率に差はなく、DMSOの方がトレハロースより生存率が高い結果となり、脱水の効果よりも凍結保護剤の効果の方が大きいことが推察された。また、急速凍結 (80K/min)では AQP4 発現 CHO-K 細胞が AQP4 非発現 CHO-K 細胞より生存率が高く、DMSO とトレハロースの生存率に差がない結果となり、脱水の効果の方が大きいことが推察された。この結果から脱水と凍結保護剤のそれぞれの効果は凍結速度により変化することが考察されることを報告された。

・日本産越冬性昆虫オオクワガタ由来不凍タンパク質の発見北海道大学低温科学研究所：山内彩加林他)

不凍タンパク質 (Antifreeze protein, AFP) は 0℃以下で氷結晶の成長を抑制し、過冷却状態を安定化させる (氷結晶成長抑制)。また 4℃以下では細胞の脂質二重膜に結合することによって低温障害から

細胞を保護し、その生存期間を延長することが可能である。AFP はこれまで低温環境下で生息する魚類、植物および昆虫から発見されている。氷点下で生存可能な越冬性昆虫は日本国内にも生息するが、この AFP に関する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究は越冬性甲虫であるオオクワガタに着目した結果を報告された。24 時間 -5℃環境下においたオオクワガタの幼虫の体液から AFP が合成されていることが判明し、この AFP は 150 μM で約 3℃の TH 活性 (熱ヒステリシス活性：融点と凝固点の差)を示し、高活性型 AFP であることが判明した。また、興味深いことにオオクワガタの AFP は既報 (第 66 回低温生物工学会) のチャイロコメノゴミムシダマシの幼虫のもつ AFP と非常に似通ったアミノ酸構成 (立体構造)、DNA 配列であることが判明したことを報告された。

報告日：令和 4 年 6 月 27 日