

## 先端技術動向

### 第 68 回低温生物工学会に参加して

開催日：令和 5 年 6 月 17 日～18 日

参加方法：web 参加

参加報告者：家畜バイテクセンター 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 68 回低温生物工学会においても食品科学、物理化学、動植物学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

##### ・トレハロースによる細胞凍結保存研究から緩慢凍結法の本メカニズムに迫る

トレハロースによる細胞凍結保存研究から緩慢凍結法の本メカニズムに迫る。

細胞の凍結保存技術は凍結保護剤 (CPA) の発見により畜産・水産業で利用され、技術発展してきた。特に大量の細胞を凍結可能な緩慢凍結法は広く利用される。このメカニズムは①細胞外水の凍結によって生じる浸透圧差による細胞内水の脱水、②脱水による細胞内の濃縮と氷晶化の抑制 (ガラス化) と一般に理解される。しかし、現状では凍結不可能な細胞種は多く、また一部の CPA は細胞毒性が知られる。すなわち、上記メカ

ニズムの理解は完全ではなく、毒性のない CPA の開発が望まれる。発表者らはこれまでトレハロースにより、特に緩慢凍結法の本メカニズムの解明を検討されており、これまでの成果を概報された。具体的内容は①トレハロースは細胞膜非透過性 CPA であるが、トレハローストランスポーター (TRET1) を発現させた細胞は細胞内にトレハロースを輸送可能となる。トレハロースを輸送した TRET1 発現細胞において凍結保護効果の向上を確認したこと、②細胞膜にアクアポリン 4 (AQP4) を発現させた細胞は膜の透水性を高めることが可能になる。この細胞により、CPA によって異なる細胞の脱水効果 (凍結速度への依存性など) の検討を継続していること、③現在判明しているトレハロースの物性の 3 点について発表された。

##### ・超瞬間凍結法における二糖類による細胞生存率の向上

発表者らは CPA を使用しないインクジェットによる超瞬間凍結法を開発している。本方法は微小液滴を臨界冷却速度以上で冷却することにより、氷晶形成前にガラス化状態としている。解凍も急速に行うことにより CPA を使用した従来法と同等の生存率

を得られているが、インクジェット吐出の調整やガラス化した液滴の取扱には熟練が必要で安定した生存率が得られない課題がある。そこで本発表はガラス化を安定させるため、トレハロースおよびスクロースを添加した凍結液でマウス繊維芽細胞を凍結してその有用性を評価された。結果は、0.57M のトレハロースおよびスクロース水溶液での方法は、糖を添加しない方法より高い生存性が得られた(90.6±3.2%, /86.3±4.8%, vs 64.1±2.3%)。また、この結果は10%DMSOを用いた緩慢凍結法の生存率(83.4±2.3%)よりも高い結果となった。この結果から糖添加による超瞬間凍結法により従来法では凍結できなかった細胞の凍結保存実現の可能性が示唆された。

#### ・タンパク質に対する双性イオン水溶液の凍結保護能力

タンパク質水溶液の凍結保存は安定性の低いタンパク質を長期保存するために重要な技術である。発表者らは近年、合成双性イオン(OE2imC3C)の希薄水溶液を用いた糖転移酵素 N-acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V) をディープフリーザーにより凍結保存できたと報告した。その結果、10wt% OE2imC3C 水溶液中で保存した GnT-V の活性は、20%グリセロール水溶液を使用する既法

より高値であった。しかし、OE2imC3C 水溶液の凍結保護能力の詳細は未解明である。そこで本発表では示差走査熱量測定法(DSC)および振動分光法を用いて、OE2imC3C 水溶液(0-30wt%)の融解過程と水分子および OE2imC3C の状態について研究された。その結果、DMSO やグリセロール水溶液よりも OE2imC3C 水溶液の融点および融解エンタルピーが測定範囲内では低いことと不凍結水分率が低いことが判明した。不凍結水分率が低い要因を分析するため、298K での各水溶液の水分子のラマン OH 伸縮スペクトルの測定を行われた。その結果、濃度依存的に OE2imC3C に水和した水分子の分子種が増加することが判明した。結果を総括すると、① OE2imC3C はグリセロールまたは DMSO に比べ水分子と強く水和していること、② OE2imC3C の  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  部分は水分子と強く水素結合しており、gauche 体が支配的であることが判明した。すなわち、希薄 OE2imC3C 水溶液の凍結保護能力は、OE2imC3C の  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  部分と水分子の強い相互作用によって生じる不凍結水分率割合の多さに起因することが示唆された。

報告日：令和5年6月19日