

平成 31 年 4 月 3 日

各報道機関 御中

## 哺乳類の核は常識を覆す極限温度に耐えられる -生命宇宙起源説を後押しする発見-

山梨大学生命環境学部および発生工学研究センターの若山清香助教、若山照彦教授らの研究グループは、 $-196^{\circ}\text{C}$ から  $150^{\circ}\text{C}$ までの温度負荷処理を行ったマウスの凍結乾燥精子から、顕微授精により多数の産仔を得ることに成功しました。今まで哺乳類がこのような条件で生き延びた例はなく、哺乳類には極限環境に対して耐性がないと考えられていました。しかし精子の核に限れば、哺乳類であってもクマムシなどの下等動物と同様に強い温度耐性を有し、生命の復活が可能なことを発見しました。この成果はイギリスの科学雑誌 Nature 姉妹誌の「Scientific Reports」（4月5日付け）にオンライン掲載されます。

### 本研究のポイント

- 極限環境には耐えられないと考えられていた哺乳類にも、核には強い温度耐性が有ることが分かった。
- 哺乳類の遺伝資源を大規模災害など有事の際でも安全に保存できる可能性を示した。
- 地球の生命の起源は隕石や小惑星由来とするパンスペルミア説の弱点を補強した。

### 1. 概要

高温／低温および真空のような極端な環境に対する耐性は、古細菌やイースト菌だけでなく、クマムシ（注1）やユスリカなどの下等動物で見つかっています。このような生物は乾眠状態（体から水分の大部分を排出した状態）になることで極限耐性を獲得し、環境が改善するまで生命を維持することが可能になります。一方、高等動物の多くは乾燥状態になることができず、低温では細胞内の水分の結晶化、高温ではたんぱく質の熱変性などが生じるため、極限状態では生き残ることができません。そのため、我々人類を含む哺乳類には極限耐性はなく、そのような環境にさらされた個体は死んでしまい生き返ることは不可能だと考えられてきました。

山梨大学の研究グループは、クローン技術による絶滅動物の復活や絶滅危惧種の救済技術の開発を行っています（注 Web1, 2）、遺伝子資源の安全な保全を目的に、フリーズドライ技術を用いた哺乳類精子の室温保存技術についても研究しています。本グループは1998年に世界で初めてフリーズドライで保存した精子から産仔を作ることになりましたが（Wakayama et al., Nature Biotechnology）、この時はわずか数か月間しか室温で保存できませんでした。しかし昨年、フリーズドライ精子を高真空で保存することで、机の引き出しの中で1年以上保存しておいた精子から産仔の作出にも成功して

います（注 WEB3）。また本グループは精子を国際宇宙ステーションで長期間保存する実験を行い、月の地下で哺乳類の遺伝子資源を永久に保存する案も示しました（注 Web4）。

このように遺伝子資源の室温保存技術は改良されてきており、震災などで電力や液体窒素の供給が止まってしまっても、哺乳類の遺伝子資源を保存することが可能となってきました。しかしもし地球規模の大災害が生じた場合、環境の悪化により保存はより困難になることが予想されます。月での保存も現在の科学力では現実的ではありません。そのため本グループでは、精子の極限環境に対する耐性を調べ、たとえ劣悪な環境となっても精子の長期保存が可能か調べる研究をしています。

## 2. 研究方法及び結果

本研究では、精子を凍結乾燥することでクマムシと同様な状態を人工的に作り出し、実験に使用しました。凍結乾燥された精子は細胞膜が傷つき細胞としては「死んだ」状態となりますが（図 1 a-b）、顕微授精（注 2）により産仔を得ることが可能です。

### （1）室温—超低温の急激な温度変化を繰り返した場合の精子の耐性について

フリーズドライ精子を $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫あるいは $-196^{\circ}\text{C}$ の液体窒素へ浸してから室温に戻す、という処理を10回繰り返した後で顕微授精を行い、1回処理と10回処理との間で産仔率を比較しました（図 1 e）。また同じ実験を別の3種類のマウス（BDF1、BCF1およびC57BL/6）でも繰り返しました（図 1 e）。その結果、出産成績はどの系統でも10回処理では1回処理に比べ若干の低下が見られましたが、十分な数の産仔を得ることに成功しました。この結果は、精子核には $-196^{\circ}\text{C}$ への急激な温度変化に対して強力な耐性があることを示しています。

### （2）精子の高温耐性について

フリーズドライ精子をオープンに入れ、30分間 $65^{\circ}\text{C}$ 、 $80^{\circ}\text{C}$ 、 $95^{\circ}\text{C}$ にさらした後、顕微授精により産仔が得られるか試みました（図 2 a、上段）。 $95^{\circ}\text{C}$ 処理を行っても精子の外見に目立った変化は見られませんでした（図 2 b-e）、精子のDNA損傷度は熱処理を行わなかった精子に比べて高くなっていました（図 2 h）。顕微授精により産仔の作出を試みたところ、新鮮精子の場合は人為的に卵子の活性処理を行った場合でも $65^{\circ}\text{C}$ が限界でしたが、フリーズドライ精子の場合、 $95^{\circ}\text{C}$ 処理を行っても産仔を得ることが可能でした。他のマウス系統（5種類）の精子にも $95^{\circ}\text{C}$ に耐性があることが確認できました。

### （3）精子が $95^{\circ}\text{C}$ に耐えられる限界時間について

次に、精子が $95^{\circ}\text{C}$ 処理にどのくらい長く耐えられるのかを調べるために、精子を30分から24時間オープンで過熱し、その後で顕微授精を行いました（図 2 a、中段）。しかし従来法では、2時間を超える $95^{\circ}\text{C}$ 処理では精子が焦げてしまい、顕微授精ができませんでした。焦げてしまう原因が培地に含まれる糖のメイラード反応（注 3）によるものだと考え、糖をトレハロース（クマムシなどの乾眠する動物が体内にため込む物質として知られている）に置き換えてフリーズドライ精子を作製してみました。その結果、過熱による焦げはなくなり、精子のDNA損傷度（注 4）も低下しました（図 3 c-e）。これらの加熱精子を用いて顕微授精を行った結果、最長で6時間、 $95^{\circ}\text{C}$ で過熱し続けた精子からでも産仔を得ることに成功しました（図 3 f, g）。

### （4）精子が耐えられる限界温度について

最後にフリーズドライ精子に $150^{\circ}\text{C}$ までの高熱処理を行い、産仔を得られる限界温度を求めました（図 2 a、下段）。この実験では、クマムシの高温耐性実験と同じく分単位で熱処理を行っています。

トレハロースを加えなかった場合、120°C処理では3分間が限界でしたが、トレハロースの添加により10分間加熱しても産仔を得ることができました。150°Cの加熱を行った場合でも3分間であれば多数の産仔を得ることができましたが、この温度ではトレハロースの効果はありませんでした。

これらの結果は、マウスの精子核には生物界最強と言われているクマムシに匹敵するほどの強い耐性があることを示しています。

### 3. 研究の成果

本研究によって、これまで哺乳類には極限環境に対する耐性がないと考えられてきましたが、それは生きている個体および細胞に関してであり、哺乳類でも核には下等動物に匹敵するレベルの強い極限耐性が備わっていることが初めて明らかになりました。ただし核は生命ではなく、発生工学技術を用いなければ生命を復活させることはできないため、生物としての耐性とは言えないかもしれません。しかしこの耐性能力は、哺乳類の遺伝子資源をたとえ劣悪な環境でも長期間安全に保存する、という目的のためには非常に重要な発見です。また、生命の起源としてパンスペルミア説（他の天体の微生物が隕石に付着して地球にやってきたとする説）（注5）が提唱されていますが、この説には隕石が地球に落ちてくるときの高温に生物は耐えられない、という弱点があり、また高等動物への進化も説明できません。本研究は、生命の素材となる核は、たとえ高等動物であっても高温耐性があることを示しているため、パンスペルミア説を部分的にサポートしていると研究グループは考えています。

### 4. 今後の期待

遺伝子資源は潜在的な利用価値のある遺伝素材であり、一度失われると二度と完全には復元できません。そのため簡単に保存できる植物の種子は全世界規模で保存が行われています（注6）。しかし動物の遺伝子資源は液体窒素や超低温冷凍庫が必要であり、維持コストが高だけでなく大規模な震災が起きた場合の対策は不可能でした。本グループが研究しているフリーズドライ精子は小さなガラスアンプルビン内で保存するため、軽くて場所を取りません。そして今回の発表およびこれまでの研究から、フリーズドライ精子であれば室温どころか劣悪な環境でも保存可能なことが分かってきました。

しかし長期保存技術では、保存後に確実に産仔が得られるという信頼性を得ることが不可欠です。そのため今後は、より長期間保存しても確実に産仔が得られること、出産率は低下しないこと、他の動物種でも可能なことなどの結果を出し信頼性を獲得することが重要です。本グループはこれらの問題を解決し、最終的には哺乳類の遺伝子資源も植物の種子と同様に半永久保存を可能にする技術の開発を目指しています。

原論文情報

**Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from  $-196^{\circ}\text{C}$  to  $150^{\circ}\text{C}$**

Sayaka Wakayama, Daiyu Ito, Yuko Kamada, Shigenobu Yonemura, Masatoshi Ooga, Satoshi Kishigami,

Teruhiko Wakayama

若山清香、伊藤大裕、鎌田裕子、米村重信（徳島大）、大我正敏、岸上哲士、若山照彦

<補足説明>

### ※1 クマムシ

緩歩動物門に属する動物の総称。乾眠状態になると非常に強い環境耐性を持つことから地球最強生物ともいわれている。しかし一部の例外種を除きほとんどの個体は 100℃で死んでしまう。

### ※2 顕微授精

精子をマイクロマニピュレーターを使って人為的に卵子の中へ注入し、受精させる技術。主に不妊治療で利用されている。

### ※3 メイラード反応

別名アミノカルボニル反応。糖とアミ化合物を加熱したとき見られる褐色物質（お焦げやプリンのカaramel）を生み出す反応。後期生成物は架橋形成や褐色変化が起こり、生体内ではタンパク質に障害を与えることなどから老化マーカーとしても知られている。

### ※4 精子の DNA ダメージの測定

本実験では、精子の DNA ダメージを測定するためにコメットアッセイを行った。この方法は、精子 DNA が損傷した場合、電気泳動することで DNA 断片がゲルの中を流れ、彗星のように尾を引く状態になり、その尾の長さを測定することで断片化の状態を測定できる。

### ※5 パンスペルミア説

地球の生命の起源に関する仮説のひとつ。生命は地球以外の天体で発生した微生物の萌芽が隕石にのり、地球に到達して広がっていったのではないかとする説。

### ※6 種子の保存：スバルバル種子貯蔵庫

ノルウェー領にあるスバルバル諸島において価値ある植物の種子が世界中から集められ保存されている。震災などで電力の供給が止まっても永久凍土のため低温が維持できる。

<https://www.regjeringen.no/en/topics/food-fisheries-and-agriculture/svalbard-global-seed-vaault/id462220/>

### 過去に行ったプレスリリースの Web アドレス

1. [http://www.cdb.riken.jp/jp/04\\_news/articles/081104\\_frozen.html](http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/081104_frozen.html)
2. <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/Wakayama%20lab/index.html>
3. <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/Wakayama%20lab/index.html>
4. <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/Wakayama%20lab/index.html>

(注) 別紙にはカラー写真等がありますので、ご入用の方は下記広報担当までお知らせください。

(本件に関する問い合わせ先)  
山梨大学大学院総合研究部生命工学専攻  
教授 若山 照彦 [twakayama@yamanashi.ac.jp](mailto:twakayama@yamanashi.ac.jp)  
助教 若山 清香 [sayakaw@yamanashi.ac.jp](mailto:sayakaw@yamanashi.ac.jp)  
TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827  
(広報担当)  
同 総務部総務課広報グループ  
TEL : 055-220-8006 FAX : 055-220-8799  
E-mail : [koho@yamanashi.ac.jp](mailto:koho@yamanashi.ac.jp)

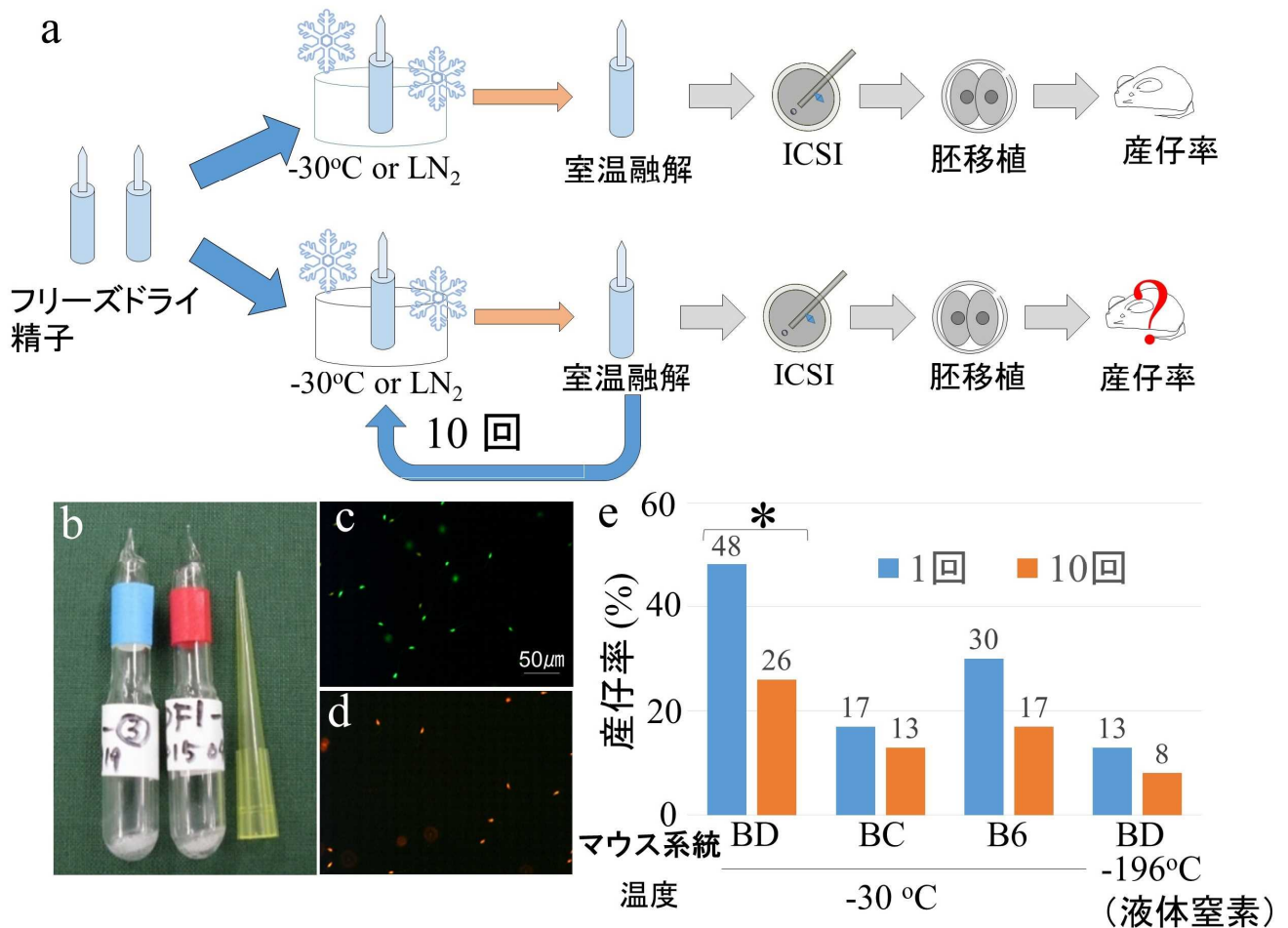


図1. フリーズドライ精子の室温—超低温の繰り返し処理とその耐性実験

a. 急激な温度変化に耐えられるかを実験するために室温から-30°Cまたは液体窒素 (LN<sub>2</sub>) へ冷やす処理を10回繰り返した後、顕微授精を行った。

b-d. ガラスアンプルビンで保存されているフリーズドライ精子と、加水後の精子の生死判定

ガラスアンプルビンは10 cm程度の長さで、真空状態で密閉されている。凍結乾燥する前はほとんど生存していたが (c)、凍結乾燥後はすべて死滅していた (d)。

e 常温—超低温の繰り返し処理を行った精子による産仔率の比較

低温処理を1回および10回繰り返した後、顕微授精により産仔率を求めた。青棒は一回処理した精子による産仔率、オレンジ棒は-30°Cおよび-198°Cで10回処理を繰り返した精子による産仔率。縦軸は産仔率、横軸はマウス系統 (BD: B6D2F1, BC: B6C3F1, B6: C57BL/6)。10回低温処理を行っても、どの系統からでも産仔を得ることができた。

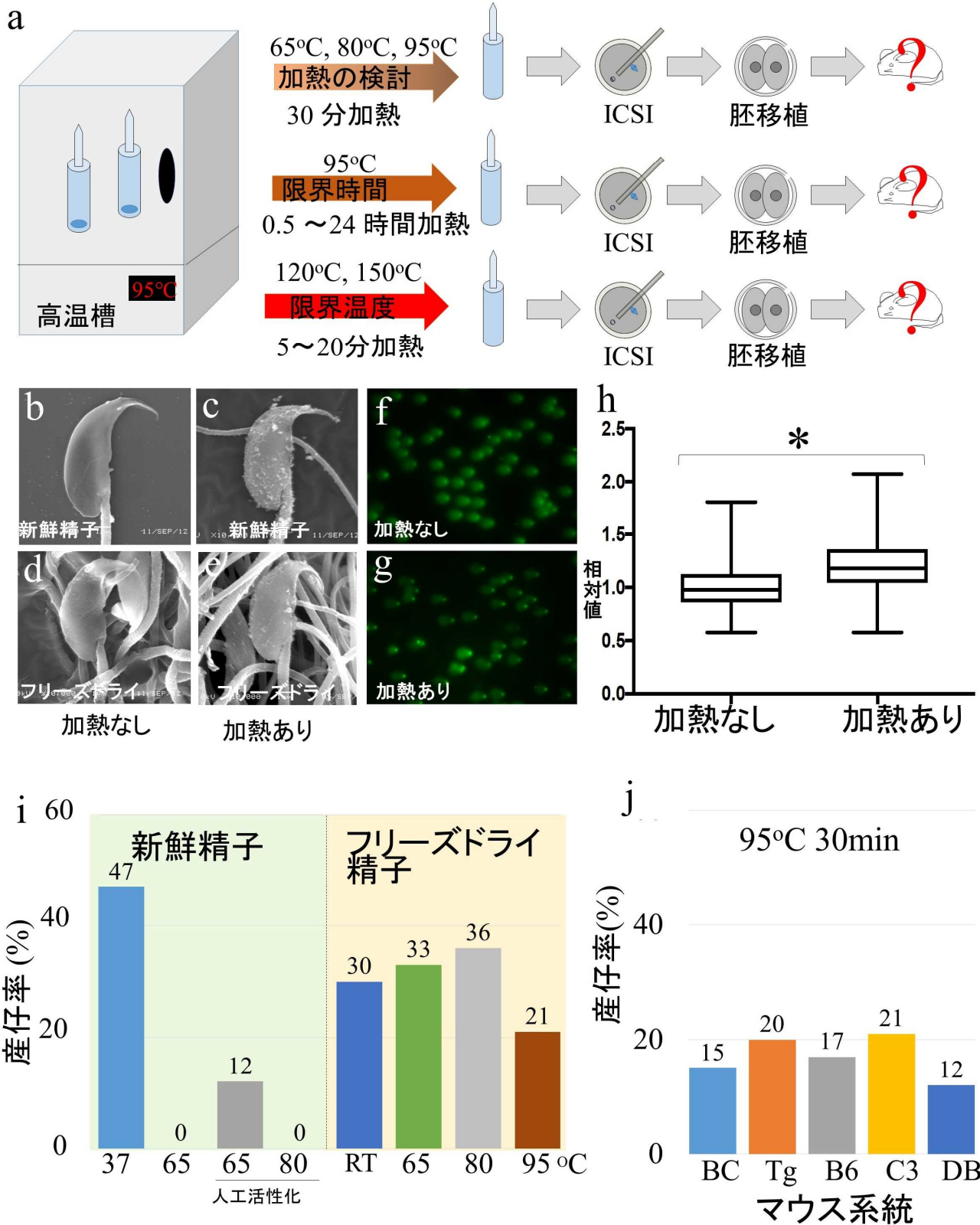


図2. フリーズドライ精子の加熱耐性実験

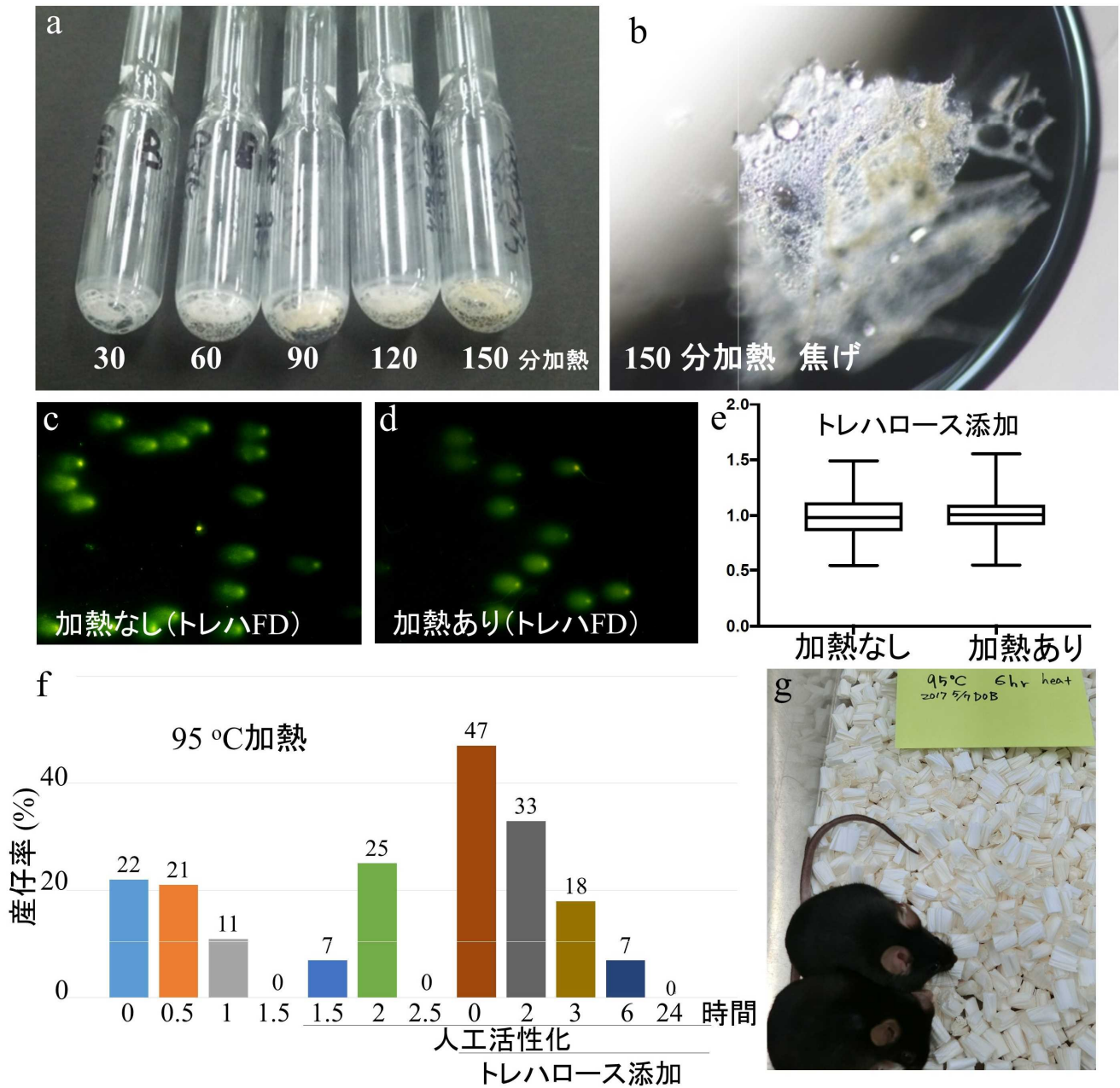
a オープンにフリーズドライ精子の入ったアンプルビンを入れ加熱処理を行った。上段は 65°C、80°C、および 95°C で 30 分間加熱処理、中断は 95°C で最長 24 時間加熱処理、下段は 120°C および 150°C で最長 20 分間加熱処理を行った。加熱処理後に顕微授精を行い、産仔率を求めた。加熱処理を行った精子の外見と DNA ダメージの測定。b-e は電子顕微鏡写真であり b、d は新鮮精子、c、e は凍結乾燥精子。

f, g はコメットアッセイ。h はコメットアッセイによる DNA ダメージの比較。新鮮精子（コントロール：1）に対して熱処理精子は有意にダメージが増加している

i, 30 分間熱処理を行った精子による産仔率。新鮮精子の場合、たとえ人為的に卵子を活性化しても 65°C が限界だったが、凍結乾燥精子の場合、95°C に加熱しても産仔を得ることができた。

j, 5 種類のマウス系統で 95°C 30 分フリーズドライ精子を加熱し、ICSI による産仔率を検討したところ、どの系統でも同じように十分な熱耐性を持つことが分かった。





### 図3. 95°C加熱の限界時間の検討

aは加熱時間が長くなるにつれ、サンプルが焦げていく様子を表す。bは顕微鏡下で観察した様子。

c、d、eトレハロース添加したフリーズドライ精子は、加熱処理（95°C30分）を行っても、未非加熱区と比較してもダメージの増大が少なかったことを証明。eは図2のhのように有意差がなくダメージが軽減されている。

f、95°Cで加熱した際、どのくらいの時間までフリーズドライ精子が受精能を持つことができるかを検討した。横軸は時間。人工的に活性化を行ったら2時間でも産仔を得られたが、トレハロースを添加するとさらに6時間まで延長した。

g. 95°C 6時間加熱のサンプルより生まれた産仔。



**表 1. 加熱の限界温度の検討**

処理温度	トレハロースの有無	処理時間	使用した卵子数	顕微授精に成功した卵子数	2細胞期へ発生した胚数 (%)	出産数 (%)
120 °C	-	3 min	100	85	75 (88)	5 (7)
		5 min	160	130	111 (85)	0
150 °C	-	3 min	100	80	42 (52)	1 (2)
120 °C	+	5 min	60	31	29 (93)	16 (55)
		10 min	60	39	28 (71)	8 (28)
		>20min	160	124	44 (35)	0
150 °C	+	3min	97	87	82 (94)	51 (61)
		>5min	120	94	60 (64)	0

耐熱温度の限界を見るために 120°C および 150°C の加熱を行った。120°C の加熱の場合、従来法では 3 分間が限界だったが、培地にトレハロースを添加すると 10 分間加熱しても産仔を得ることができた。一方 150°C の加熱ではトレハロースの有無にかかわらず 3 分間が限界だった。