

不凍タンパク質添加保存溶液を用いたマウス精子凍結融解後の精子形態の観察

安齋政幸^{1,2}, 山鹿優真³, 掛井友輝³, 堀光一郎³, 山崎脩杜³, 津田栄⁴, 松本和也^{1,2,3}

要旨

本研究では、マウス凍結精子保存溶液に添加される Skim Milk の代替保護物質として期待される不凍タンパク質(AFP)が凍結融解後の精子細胞膜に及ぼす影響を形態学的観察により評価した。その結果、AFP IIIが添加された場合において精子細胞膜の著しい損傷がないことを示した。さらに体外受精により40%以上の受精が可能であり正常に発生した。これらの結果から、マウス精子保存液へのAFP III添加が細胞膜の保護に効果を与える可能性を示した。さらに、その濃度は0.1 μ g/mLで調整されることが望ましいと考えられた。

キーワード：不凍タンパク質、マウス、凍結精子

1. 緒論

精子の凍結保存技術の確立は、多くの動植物における遺伝資源の長期保存を可能とし、研究資源としての精子の利用に大きく貢献している^(1,2)。また、凍結デバイスにおいては、ストロー方式やクライオチューブ方式そして極少数凍結カプセル式など多様な素材を用いたデバイスの熱伝導性の凍結融解精子に対する効果が示されている^(3,4)。

マウス精子の凍結保存技術は、1990年以降⁽⁵⁾に確立された技術であり、家畜精子の保存技術と比べ比較的歴史は浅いものの、ゲノム編集技術に代表される遺伝子改変技術の進歩によりこれまで以上に多くのマウス系統が樹立される現在において、飼育スペースの省力化、遺伝的形質の変化の防止、施設間の個体移動(輸送)を生殖細胞輸送に代替することによる輸送の簡易化といった極めて重要な課題を解決する手段となっている。これらの凍結保存法に用いられる凍害保護物質には、DMSOやGlycerolなどの細胞内透過型の保護剤や高分子量の糖類Skim Milkなどの細胞内非透過型の保護剤を用いることが一般的である。また、近年では凍結融解後に得られた運動能を保持した精子の先体膜への脂質流動を人為的に再開させ体外受精に用いる方法も開発されている⁽⁶⁾。Nishizonoらは、マウス精子における低温障害は、急速冷却において細胞膜外に付着する微細な氷晶形成あるいは細胞質内自由水の脱水が十分行われないことによる細胞質内氷晶形成による物理的破壊が原因となる形態学的損傷および運動能の顕著な低下であることを報告した⁽⁷⁾。

ウシやウサギそして魚類などの動物種では、凍害保護物質に不凍タンパク質(AFP)を添加した精子凍結保存技術の開発が進められている⁽⁸⁻¹⁰⁾。これらの報告では、不凍タンパク質が極低温下において形成される氷晶に結合して結晶化の成長を抑制することで、融解時における熱温度感作による再結晶化が精子形態に損傷を与えることを防ぎ、精子の生存性が高まることが示唆されている。

私たちが、このAFPを用いたマウス精子の冷蔵保存を行い、Raffinoseとの併用により最長5日目までは、冷蔵下において、運動性および精子頭部の細胞膜の完全性の保持に有効であることを確認している⁽¹¹⁾。一方、Koshimotoらは、マウス精子を-70 $^{\circ}$ Cにて冷凍保存する場合において、Raffinoseへ不凍タンパク質を添加した場合、濃度に比例

原稿受付 2020年1月29日

1. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂14-1

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷930

3. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷930

4. 産業技術総合研究所生物プロセス部門 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2-17-2-1

して生存率が低下することを報告した⁽¹²⁾。しかし、融解速度と再結晶化に対する温度域の感受性が精子形態に与える影響は不明な点が多い。本実験では、融解操作後に回収される精子膜の形態学的な観察により、マウス精子凍結保存操作における AFP 含有保存液の効果を検証した。

2. 材料と方法

2. 1 供試動物

供試動物として、成熟齢に達した ICR マウス (株) 紀和実験動物研究所)を用いた。マウスは、清浄度のある飼育施設へ搬入した後、12時間照明下 (明期:7:00-19:00、暗期:19:00-7:00) において1週間以上馴化した後に実験に供試した。飼育環境は、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50%とし、飼料 (CRF1R:オリエンタル酵母工業(株))を不断給餌し、飲料水は自由摂取させた。本実験における実験動物の飼養と管理および動物実験の立案や苦痛度の管理は、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

2. 2 精子保存液の調整

マウス精子保存液の調整は、中潟らの方法を基準に行った⁽⁵⁾。すなわち、18% Raffinose (Wako, 180-00012)、3% Skim Milk (Wako, 198-10605)となるように滅菌水 (Wako, 196-15645)へ溶解し遠沈後カゼインミセルを除去した保存液 R18S3 を凍結保存液として使用した。AFP 添加マウス凍結保存液の調整は、18% Raffinose 添加精子保存液に AFP III (産業技術総合研究所、津田栄先生より提供)を $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解した (R18+AFP)。次に、この溶液へ 12% Lactose (Nacalai, 20014-52)を添加した保存液を調整した (R18+L12+AFP)。

2. 3 マウス精子の凍結融解操作

成熟齢に達した ICR マウスを安楽死処分後、精巣上体尾部を回収した。次に各 $100\mu\text{L}$ の保存液中に組織を移し細切することで精巣上体尾部より精子を回収し、回収された精子を保存液中に懸濁した。精子懸濁液を精子ストロー (IVM, AAA201)へ充填して封入し、液体窒素ガス中で冷却した後、 -196°C 液体窒素中に浸漬した。融解操作は、 37°C 温水中にストローを浸漬することにより急速に融解する方法で行った。融解した精子は形態学的評価のため、HTF 培地内に導入し炭酸ガスインキュベーター内 (37°C , 6% CO_2 in air) で静置した。

2. 4 LIVE/DEAD® Sperm Viability Kitによる精子細胞膜の観察

凍結融解精子の細胞膜損傷の評価には、LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen, 18885254)を用いた⁽¹³⁾。SYBR14 および Propidium Iodide (PI)によりそれぞれ染色された各凍結融解精子をスライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡下 (BZ-X800, KEYENCE)および解析ソフトウェア (BZ-X800 Analyzer, KEYENCE)で精子頭部における細胞膜の正常性を検出しハイブリッドセルカウントで正常精子数および異常精子数を計測した。

2. 5 精子先体膜反応の観察

凍結融解精子の精子先体膜反応の観察は、Cheng らの方法⁽¹⁴⁾に準じて Peanut agglutinin Lectin-fluorescein isothioyanate (Lectin PNA-FITC)染色により行った。融解後、回収した精子を BSA 不含 HTF 培地に導入し、Lectin-PNA (Invitrogen, 1984050)を添加した。次に、Hoechst33342 (Dojindo, ND197)を添加後、スライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡下 (BZ-X800, KEYENCE)および解析ソフトウェア (BZ-X800 Analyzer, KEYENCE)を用いて観察後、ハイブリッドセルカウントにて精子数を計測した。

2. 6 精子中片部位におけるミトコンドリア膜電位の観察

凍結融解精子の精子中片部位に局在するミトコンドリア活性の観察は、JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Cayman Chem, 0457199)を用いて行った⁽¹⁵⁾。融解後、回収した精子を HTF 培地に導入し、JC-1 probe を添加した後、炭酸ガスインキュベーター内 (37°C, 6% CO₂ in air)で静置した。その後、スライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡下 (BZ-X800, KEYENCE)および解析ソフトウェア (BZ-X800 Analyzer, KEYENCE)を用いて観察した。

3. 結果

凍結融解後の LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit を用いた染色により、細胞膜完全性を保っていると判定された精子の割合を図 1 に示す。SYBR14 で染色された精子を細胞膜損傷なし、PI により染色された精子を細胞膜損傷ありと判定し(図 2)、細胞膜損傷がなかった精子の割合を細胞膜完全性と表記した。R18S3 保存液により保存された実験区において、細胞膜完全性がもっとも高かった。また、Skim Milk を除外した区では、AFP III を添加することにより、細胞膜完全性が向上することが明らかとなった。

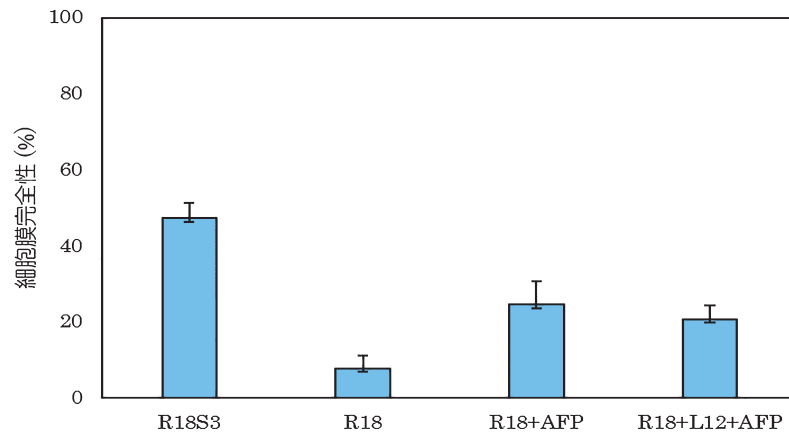


図 1. 各試験区で作製した凍結精子頭部の細胞膜完全性の評価

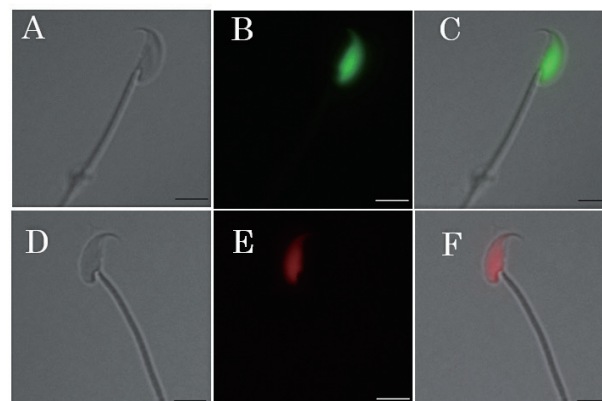


図 2. LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit により染色された凍結精子頭部

A, D: Bright field B: SYBR14 (Green) C: Merged (A-B) E: Propidium Iodide (PI, Red)
F: Merged (D-E) (Scale bar: 5μm)

Lectin PNA-FITC 染色によるマウス凍結融解精子の先体膜正常性の評価結果を図 3 に示す。融解後、先体膜の損傷が見られない精子は図 4 のように染色され、先体膜の損傷がみられない精子の割合を先体膜正常性(%)とした。いずれの区においても先体膜正常性は十分に保たれており、AFP IIIが凍結融解操作において先体膜の損傷を誘起しないことが示された。

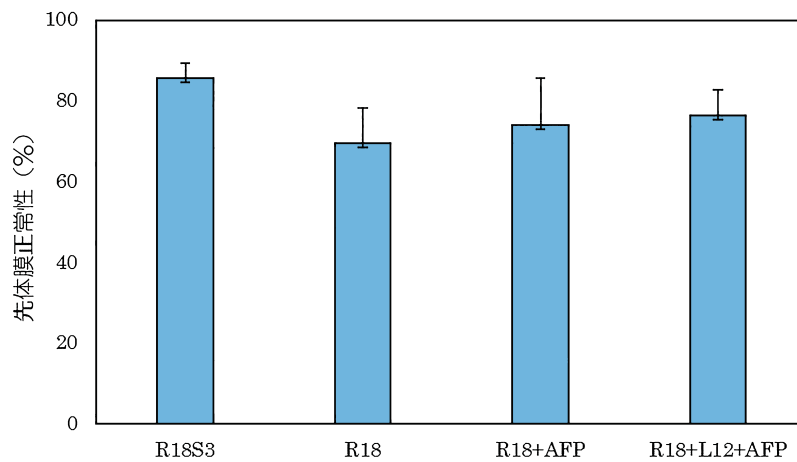


図 3. マウス凍結融解精子を用いた先体膜正常性の評価

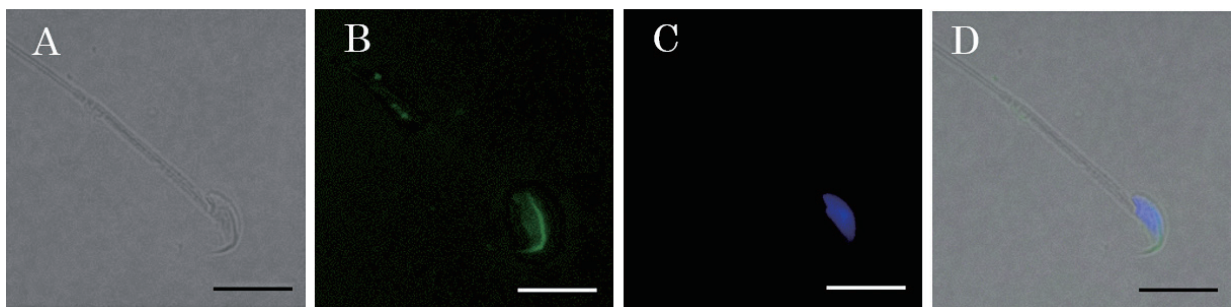


図 4. Lectin PNA-FITC 染色されたマウス凍結融解精子先体膜

A: Bright filed B: Lectin-PNA (Green) C: Hoechst (Blue) D: Merged (Scale bar: 10µm)

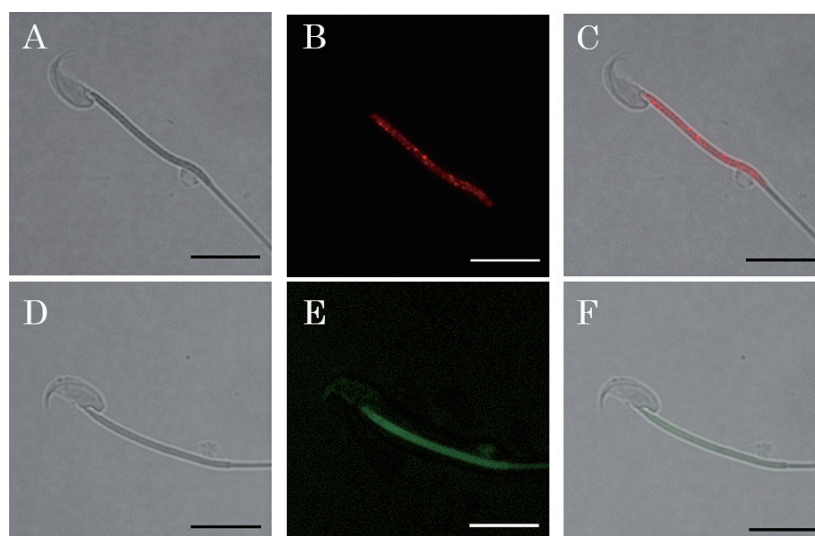


図 5. マウス凍結融解精子ミトコンドリアの JC-1 染色

A, D: Bright filed B: Live sperm (Red) C: Merged (A-B) E: Dead sperm (Green)
F: Merged (D-E) (Scale bar: 10µm)

精子中片部位への細胞膜損傷について、ミトコンドリア膜電位差を指標に評価した。ミトコンドリア活性が高い精子および低い精子はそれぞれ赤および緑で染色され(図 5)、ミトコンドリア活性が高い精子の割合を図 6 に示す。AFP を添加した区では、R18S3 を比較して、ミトコンドリアの高い割合は低下するが、Raffinose のみの添加で凍結保存されたものと比較して、良好な結果が得られた。

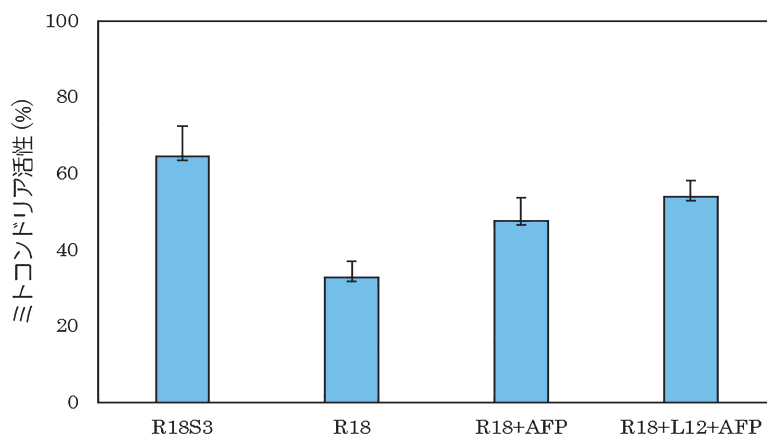


図 6. マウス凍結融解精子のミトコンドリア活性の評価

凍結融解精子を用いた体外受精⁽⁶⁾の受精成績を表 1 に示す。R18+AFP 保存液で凍結されたマウス精子の体外受精成績は 41% (45/109)、R18+L12+AFP 保存液では 46% (39/84)であり、R18S3 保存液を使用した場合(68%; 105/155)と比較し低率であったものの、Raffinose のみを添加した R18 区と比較して成績が大きく向上しており、AFP IIIの添加が有効であることが明らかとなった。

表 1. 不凍タンパク質添加マウス精子保存液を用いた体外受精成績

凍結保存溶液	供試卵子数	受精数 (%)	2 細胞期発生数 (%)
R18S3	155	105 (68)	102 (98)
R18	103	10 (9)	10 (100)
R18+AFP	109	45 (41)	43 (98)
R18+L12+AFP	84	39 (46)	39 (100)

n=5

4. 考察

マウス精子保存液には、冷却過程における精子細胞膜内外の水分子による氷晶形成から細胞を保護するための様々な耐凍物質の添加が試されてきた。現在ではその標準化が進み、R18S3 保存液が一般的に使用されるに至っている⁽²⁾。この保存液には、精子細胞膜の保護に細胞膜非透過型の Skim Milk を添加しているが、乳清成分に存在する各カゼイン成分の分子量が高く、カゼインミセルの表面に水分子が共局在することによる凍結時への疎水性の崩壊や酸性化(酸性ゲル化)により細胞膜へ影響を及ぼす⁽⁶⁾。さらに、Skim Milk は飽和状態での使用が困難であり、多くのホエイタンパクが含まれることで分子量にも多くの違いが生じており、複合的

に精子細胞膜の保護効果は認められるものの、その詳細は明らかではない⁽¹⁷⁾。私たちは、Skim Milk の代替保護物質として AFP に着目し、凍結保存液の開発を進めてきた。現在のところ、異なるアミノ酸組成および高次構造を持つ4つのAFP、AFP I (分子量; 3,300)、AFP II (分子量; 20,000)、AFP III (分子量; 7,000)、そして分子量 11,000 のAFP IVが存在することが知られている⁽¹⁸⁾。今回の検討において、AFP IIIと Raffinose を組み合わせて添加した凍結保存液でマウス精子凍結保存を実施し精子形態を観察したところ、AFP IIIが細胞膜ダメージを軽減することが明らかとなった。また、体外受精操作における受精能獲得に必要な先体反応を誘起する上で必要な精子先体膜中のコレステロールの除去に Methyl- β -cyclodextrin (MBCD)を用いた⁽¹⁹⁾ところ、Raffinose 単一で凍結されたマウス精子での MBCD 非添加培地における体外受精成績(12% (12/98))と比較して高率であった(未発表)。AFP は、低温下における氷晶形成の阻害のみならず脂質二重膜へも強く結合することが知られており⁽²⁰⁾、このことからマウス凍結精子保存液への AFP IIIの添加は、MBCD のもつ疎水空洞内への先体膜に存在する脂質流動を再活性化することを可能にすることが示唆された。さらに、Skim Milk のもつカゼイン体は4つの高分子群にわかれ、分子量が 19,000~25,200 である⁽¹⁷⁾。カゼインは両親媒性の構造をもつが、本実験で使用した保存液組成では飽和状態で混和されている状態ではなく、分子量は明らかではない。一方、AFP IIIも同様に両親媒性構造をもち氷晶結合面には自由水結合分子に対するネットワークが存在する⁽²¹⁾。このように、AFP 使用することによって、少なくとも分子量が 7,000 あるいは類似する分子量の明らかな凍害保護物質を探索することが可能となる。

凍結融解操作における昇温速度は、その後の精子運動性に影響を与える⁽²²⁾。Nishijima らの報告は、AFP を添加した Acetamide を含むガラス化促進剤で凍結されたウサギ精子においては、冷却時に保存液が細胞内へ浸透しガラス化様を形成する際に、速やかに AFP が結晶形成を軽減することで融解後の高い前進運動性を有している生存精子を得ることを示している⁽⁹⁾。しかし、Acetamide などのガラス化促進物質は細胞内の水分子の氷晶形成を抑制し細胞質の大きい初期胚の極低温下の凍結保存⁽²³⁾が可能である一方で、融解時の生存性を高めるためには加温時の上昇スピードを高め保存液を細胞質から急速に排除することが肝要である。多くの精子保存液において細胞膜透過型の保護物質を用いる場合、動物種によって融解時の温度上昇スピードに差異が生じることが知られており⁽²⁴⁻²⁶⁾、Koshimoto らは、AFP を添加した場合に冷凍精子が室温下に戻されるまでの-50~-30°C状態時に細胞膜外部の氷晶再結晶化が進み生存率の低下が引き起こされると報告している⁽¹²⁾。さらに、Nakagata らは、R18S3 保存液によるマウス凍結融解精子を体外受精へ用いる場合、融解後の生存精子を受精培地へ添加する際にゆっくりとした精子塊の希釈が運動精子の保持および受精率に影響を与えることを報告している⁽⁵⁾。本研究において、精子に運動活性を与える精子中片部のミトコンドリア膜電位を観察したところ、AFP III添加保存液を用いて凍結融解された精子では R18S3 を用いたものと同様に高いミトコンドリア活性を有していることが示された。また、木我らは、Raffinose と AFP IIIを添加した保存液を用いてマウス精子を冷蔵下で保存したところ、5日間まで高い精子運動性と受精能を保持していることを確認している⁽¹¹⁾。これらのことから、細胞膜保護物質とされる Skim Milk と同等に界面電位の構造変化が精子中片部位において、極低温下から融解される加温スピードにより AFP IIIがミトコンドリア内膜への再氷晶形成化を効率よく軽減すると共に融解精子が希釈される際の浸透圧ショックを回避することにより、融解後の精子推進力の維持が可能であると考えられた。

5. 結論

マウス凍結精子の凍結保存において保存溶液に添加されている Skim Milk が精子形態に与える効果は不明であった。私たちは、Skim Milk の代替保護物質として不凍タンパク質(AFP)を添加することで凍結融解後における精子細胞膜への影響を検討した。その結果、融解後の精子には AFP IIIが添加された場合においても精子頭部への細胞膜の完全性が保持されていることを示した。次に、精子先体膜の正常性および中片部

の正常性を蛍光プローブにより可視化したところ、常法で保存された保存液と同様な正常性を示すことを確認した。さらに、体外受精により40%以上の受精率を得ることが可能であった。これらの結果から、マウス精子保存液へのAFP III添加が細胞膜の保護と受精能獲得において効果を与える可能性を示した。

6. 謝辞

本実験に関して、適切なお助言を賜りました宮崎大学 越本知大先生に感謝申し上げます。

本研究の一部は、近畿大学学内研究助成「展示動物からの細胞・配偶子を用いた新規生物多様性保全技術の開発と動物園・水族館との統合研究連携モデルの構築」の支援を受けた。

7. 参考文献

- (1) 安齋政幸、細井美彦、松本和也、佐伯和弘、入谷明 (2005) マウス胚・配偶子の凍結保存技術. 日本胚移植学雑誌 27, 123-131.
- (2) Sztejn, J. M., Takeo, T., Nakagata, N. (2018) History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 82, 57-63.
- (3) 石川博通、岡崎雅子 (2007) 精子の凍結保存—とくに悪性腫瘍治療前の凍結保存について—. 歯科学報 107, 505-512.
- (4) Nakata, K., Yoshida, K., Yamashita, N. (2019) Preclinical evaluation of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 65, 297-304.
- (5) Nakagata, N., Takeshima, T. (1992) High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* 37, 1283-1291.
- (6) Takeo, T., Nakagata, N. (2011) Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biology of Reproduction* 85, 1066-1072.
- (7) Nishizono, H., Shioda, M., Tekeo, T., Irie, T., Nakagata, N. (2004) Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biology of Reproduction* 71, 973-978.
- (8) Prathalingam, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Mirczuk, S., Fleck, R. A., Watson, P. F. (2006) Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology* 66, 1984-1900.
- (9) Nishijima, K., Tanaka, M., Sakai, Y., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., Kitajima, S. (2014) Effect of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology* 69, 22-25.
- (10) Beiraõ, J., Zilli, L., Vilella, S., Cabrita, E., Schiavone, R., Herraez, M. P. (2012). Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: Effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biology of Reproduction* 86, 1-9.
- (11) 木我敬太、栗田佳織、西村愛美、東佳澄、細井美彦、安齋政幸 (2011) 不凍タンパク質添加によるマウス精巢上体尾部冷蔵精子を用いた体外受精操作の検討. 近畿大学先端技術総合研究所紀要 16, 51-58.
- (12) Koshimoto, C., Mazur, P. (2002) Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology* 45, 49-59.
- (13) Nakatsukasa, E., Inomata, T., Ikeda, T., Shino, M., Kashiwazaki, N. (2001) Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 C. *Reproduction* 122, 463-467.
- (14) Cheng, F. P., Fazeli, A., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M., Colenbrander, B. (1996) Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology* 17, 674-682.
- (15) Agnihortri, S. K., Agrawal, A. K., Hakim, B. A., Vishwakarma, A.L., Narender, T., Sachan, R., Sachdev, M. (2016) Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cellular & Developmental*

Biology - Animal 52, 953-960.

- (16) 仁木良哉 (2002) 牛乳酸性ゲルの物性. *Milk Science* 51, 111-120.
- (17) 山内邦男 (1986) 乳および卵蛋白質の構造と昨日に関する生化学的ならびに物理化学的研究. *日本農芸化学会誌* 60, 619-630.
- (18) 西宮佳志、近藤英昌、坂下真実、三浦愛、津田栄 (2010) 不凍タンパク質. *化学と生物* 48, 381-388.
- (19) Yoshimoto, H., Takeo, T., Nakagata, N. (2017) Fertility of cold-stored mouse sperm is recovered by promoting acrosome reaction and hyperactivation after cholesterol efflux by methyl-beta-cyclodextrin. *Biology of Reproduction* 96, 446-455.
- (20) Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y., Tsuda, S. (2008) Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout. *Cryobiology* 57, 46-51.
- (21) Mahatabuddin, S., Fukami, D., Arai, T., Nishimiya, Y., Shimizu, R., Shibasaki, C., Kondo, H., Adachi, M., Tsuda, S. (2018). Poly pentagonal ice-like water networks emerge solely in an activity-improved variant of ice-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 5456-5461.
- (22) Koshimoto, C., Mazur, P. (2002) Effect of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 66, 1477-1484.
- (23) 安齋政幸、中瀨直己、松本和也、石川孝之、高橋由美、宮田堅司 (1994) 超急速法で凍結した体外受精由来前核期受精卵を用いたトランスジェニックマウスの作製. *実験動物学雑誌* 43, 445-448.
- (24) Silva, C. G., Cunha, E. R., Blume, G. R., Malaquias, J. V., Bao, S. N., Martis, C. F. (2015) Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectant associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology* 70, 90-94.
- (25) O'Brien, J. K., Oehler, D. A., Malowski, S. P., Roth, T. L. (1999) Semen collection, characterization, and cryopreservation in a magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo Biology* 18, 199-214.
- (26) Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., Nawroth, F. (2003) Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive Biomedicine Online* 5, 191-200.

英文抄録

Evaluation of frozen-thawed mouse sperm using CPA solution containing antifreeze protein

Masayuki Anzai^{1,2}, Katsuma Yamaga³, Yukihiro Kakei³, Koichiro Hori³, Naoto Yamasaki³
Sakae Tsuda⁴, Kazuya Matsumoto^{1,2,3}

Abstract

Anti-freezing protein (AFP) is a potential alternative for Skim Milk as the protective substance in the frozen sperm storage solution. In this study, the effect of AFP on the membrane integrity of frozen-thawed sperm was evaluated. The results showed that the frozen-thawed sperm kept the integrity of the plasma membrane by the addition of AFP III. Furthermore, the fertilization rate of the sperm stored in the AFP-containing solution was 40% or more after *in vitro* fertilization. The optimal concentration of AFP III to 0.1 µg/mL. These results indicate that AFP III has the beneficial effects on the cell membrane protection and the fertilizability of the mouse spermatozoa.

Key Words: Antifreeze protein, Mouse, Cryopreservation, Sperm

1. Advanced Technology Research Institute, Kindai University, Wakayama 642-0017, Japan

2. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

4. Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira Ward, Sapporo City, Hokkaido, 062-8517, Japan.