

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19197

研究課題名（和文）細胞生物学的作用による精子の性選別を量産につなげるための生産技術開発

研究課題名（英文）Development of production technology to connect sex selection of sperm by cell biological action to mass production

研究代表者

山下 健一（YAMASHITA, Kenichi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・総括企画主幹

研究者番号：90358250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：畜産における牛の繁殖では、「性選別」の実現は生産性向上の切り札であり、すでに、X精子とY精子のわずかなDNA量の違いをもとに選別した繁殖用精液が広く用いられている。一方、学術的には近年、遺伝子発現の制御に関する研究にトレンドが移行しており、この中でX精子とY精子の遺伝子発現の違いも報告されている。本研究では、X精子とY精子の機能差による性選別に、生産プロセス技術を同時に検討することで、量産性を併せ持つ性選別技術を開発することに取り組んだ。X/Y精子の運動性に差をつける溶液条件の検討と同時に、相似則に基づいた運動性選別手法のスケールアップを同時に並行で検討し、X/Y比の確認を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全産業の中で最も睡眠時間が短いと言われる畜産において、生産性向上の切り札とされる「性選別精液」に関する研究を行った。特に牛では、例えば乳用牛のように、性別による役割が明確であるという特徴がある。本研究は、すでに使用されている性選別精液よりも、繁殖性と性選別が高いものを目指すものであり、かつ凍結ストローという従来と変わらない形態での提供を実現するものである。つまり、使う人にとっては、今までと同じ使用方で、効果を得ることができるよう配慮したものを目指した。繁殖作業の成功率を上げ、計画どおりの性で子牛を得ることができれば、収益向上と働き方改革につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In cattle breeding in livestock farming, realization of "sex selection" is a key technology for improving productivity, and breeding semen selected based on the slight difference in DNA content between X and Y sperm is already widely used. On the other hand, academically, in recent years, the trend has shifted to research on the regulation of gene expression, and differences in gene expression between X and Y sperm have also been reported. In this research, we worked to develop a sex selection technology that can be mass-produced by simultaneously examining the production process technology for sex selection based on functional differences between X and Y sperm. At the same time as investigating the solution conditions that differentiate the motility of X/Y sperm, scaling up of the motility selection method based on the law of similarity was investigated in parallel, and the X/Y ratio was confirmed.

研究分野：化学工学

キーワード：化学工学 動物生産科学 スケールアップ 精子 繁殖 不妊治療 畜産

1. 研究開始当初の背景

例えば乳生産における雌牛の役割など、畜産における牛の繁殖では、「性選別」の実現は生産性向上の切り札である。すでに、X精子とY精子のわずかなDNA量の違いを蛍光染色と蛍光強度の強弱の読み取りで選別した繁殖用精液が広く用いられており、統計上も乳用牛において雌への偏りとして表れている。

一方、学術的には近年、エピゲノムやmiRNAなど遺伝子発現の制御(いわゆる「DNAスイッチ」)に関する研究にトレンドが移行しており、この中でX精子とY精子の遺伝子発現の違いも報告されている。これを応用した性選別技術も報告されるようになってきており、新しい原理による簡便な性選別技術の実現が現実味を帯びてきている。

2. 研究の目的

一般に、新しい学術的知見を盛り込んだ新技術を普及につなげられるかどうかを考える時、別の新技術が必要となることは多い。今回の場合、遺伝子の発現制御を活用し、X精子とY精子を分けることはできても、繁殖用精液として経済合理性、生産工程受容性、そして何よりニーズを満たすだけの量を処理できるかという量産技術が別に必要となる。つまり、遺伝子の発現制御に、これらの性能を併せ持つ量産技術とセットで開発できるかどうか、社会実装に向けた技術課題である。

本提案では、X精子とY精子の機能差による性選別に、生産プロセス技術を同時に検討することで、量産性を併せ持つ性選別技術を開発する。

3. 研究の方法

<運動性精子の分離技術とX/Y精子分離への着想>

本課題担当者は、流体技術を用いて運動性精子を誘導する技術(図1)を開発していた。従来技術では実現できていなかった人工授精への適用を実現するほど多数の運動性精子を捕集することに成功し、農場にて受胎率向上を実証している。さらにこの方法では、単に動いているかどうかだけではなく、運動速度や泳ぎ方ごとに選別することができる。

これまでに、X精子とY精子それぞれに特徴的な違いは様々に知られていたが、どちらかの性の精子のみの運動を完全停止させたりするようなことができていなかったために、性選別方法としての利用は進んでいなかった。本研究では、泳ぐ速さや形ごとに捕集するという性能により、どちらか一方だけが若干遅くなる、などの差をつけるだけで、性選別方法として利用可能なものとする。

ところで、牛の繁殖においては、精度7割程度であれば、タイミング法による雌雄産み分けは可能と報告されている。例えば、人工授精前に精液を静置する時間を変え、性比を報告したものがあつた。射出精子は最初から受精能力を有しているのではなく、雌性生殖路内で様々な生化学的な反応(先体反応)や運動性の増進(超活性化)を経て、受精可能な状態へと変化していく。この一連の流れを「受精能獲得(capacitation)」という。そしてXとY精子で受精能獲得に至る時間に違いがあることも知られている。具体的には、Y精子の方が、X精子よりも先に受精能獲得に至る。

<X/Y精子の運動性に差をつける方法>

この受精能獲得の時間差、つまり運動性増進に至る時間の違いがタイミング法の根拠ではないかと考え、時間ごとに運動能力の高い精子を捕集することができれば、X/Y比を変えることができるとの着想に至つた。

このような仮定の下、本研究の提案の前に、予備的な実験を行っていた。時間差をつけて処理し、X/Y比を確認したところ、たしかにX/Y選別精度は最大で約7割とタイミング法と同等であつた。しかしながらこの方法単独では、安定した性の偏りが得られないという量産する上での問題点が残るため、下記の方法を併用する。

<X/Y精子の運動性に差をつける方法>

精子は、その中で解糖系を利用して、その運動(分子モーター)に必要なエネルギーを産生する回路を働かせているが、ここにもX精子とY精子の違いがあることが知られている。さらに最近では、プロテオーム解析の報告から、X精子とY精子の違いの詳細がより詳しく報告された。

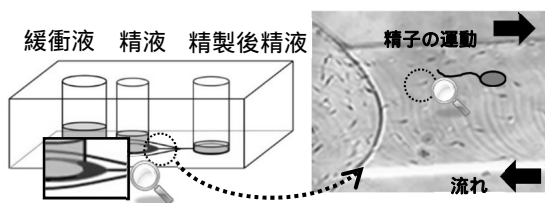


図1 「精子の運動能力別捕集技術」の概略図。流路全体が、マイクロ流体技術の知見により高度に設計されている。右端の液溜めから、高活力の精子だけとなった精液を得る。写真は部分の精子の様子を示す。

これらを利用して、この回路のいずれかの段階を阻害したり、または促進するような候補薬剤の添加を行うことで、X精子とY精子の運動能力に差をつけ、この捕集技術へ導入することで、性選別技術とすることを計画し、本研究を開始した。

4. 研究成果

< 研究内容の概要 >

2年間で本研究を進めた。具体的には、前記の検討を に統合する進め方とした。 では、使用する試薬類の濃度、精液のインキュベーション時間や温度、そしてマイクロ流体デバイスを使用する上での送液条件などを中心に条件検討を進めた。続いて、 の方法の統合を検討したが、1年目中は条件とその結果の性比の情報の整理を行った。この検討により、有望と思われる条件を絞り込みつつ、追試・データの蓄積にも注力した。

なお、精子の段階でのX/Y比の分析はリアルタイムPCR法を中心に行った。このリアルタイムPCRによるX/Y比の分析方法は、既知の方法を利用した。

また、社会ニーズの観点から、X精子を捕集する方法（つまり、雌の性選別）に絞って検討を行った。

< X/Y精子の運動性に差をつける方法 の研究成果 >

方法 から検討を行った。

前記回路のいずれかの段階を阻害したり、または促進するような候補薬剤の添加を行うことで、X精子とY精子の運動能力に差をつけ、運動性精子選別技術へ導入することで、性選別技術とすることを目指して検討を行った。

具体的には、いくつかの種類の薬品を検討した後、ジアホラーゼ、ピルビン酸を利用することで、X精子の運動能力を相対的に増進する方針が有効であるとの結論に至った。なお、Y精子の運動性を相対的に下げることも検討したが、Y精子の運動性の低減に幅があり、十分なX精子純度を挙げるといふ方針の下では、十分な結果は得られなかった。

この方法の検討に必要な試薬等は市販にて購入したものであり、独自に開発したものではない。結果として、検討の中心は、インキュベーション時間や添加濃度などの条件を網羅的にスクリーニングすることであったが、途中、統計などの手法を用いて効率的な条件探索に努めた。当初予定したベイズ最適化法も検討したが、結果として統計的な手法を採用することとなったが、これは主に、実際の実験で試行することのできる回数の問題と同時に、文献から一定の条件絞り込みができたためであった。

< X/Y精子の運動性に差をつける方法 の研究結果 >

本項目については、前述の「提案前の予備的な実験」で得られていた約7割のX/Y比の偏りからの上乗せはできなかった。この7割という成績は、タイミング法で報告されている比率とほぼ同等であり、本質的に上乗せは難しいのではないかと考えたこと、加えて前記方法の結果との組み合わせで比較的良好な結果が得られたことから、本項目については最小限の検討にとどめた。代わりに、下記の量産技術の検討に多くの時間を割いた。

< 量産技術としての検討 >

上記の性選別技術と同時並行で、凍結ストローという最終製品形態で量産できる技術開発に取り組んだ。本研究の実施より前に、運動性選別精子の凍結ストローとしての量産技術を確立していたが、本研究でもこのスケールアップの知見を活かして進めた。

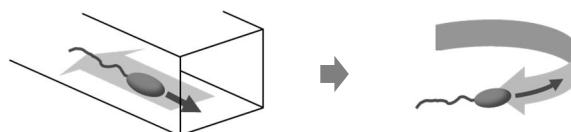


図2 管状流路内での層流に相当する回転流れを設計した

ここでは、相似則に基づいたスケールアップという化学工学の技術を用いた。複数の無次元数が一致するようにスケールアップされた装置を検討するのが一般的であるが、牛の精液の現実的な体積などを考慮して、特定の無次元数の重み付けを下げるなどの検討を行い、簡便な生産設備を設計した。具体的には、溶液を回転させることで連続的な流体場を作り出す方法（図2）を検討したが、この時、レイノルズ数を考慮しつつ分離容器形状と回転条件などを、抗凍結液の性状に従い新たに検討した。

< まとめ >

本技術の特徴は、精子を流れて操っていることにある。つまり、商品化されている性選別精液が、精子の中の染色体を「観て」「機械的に」選別していた方法とは大きく異なっており、精子に与える衝撃を最小化しつつ性選別を行うことで、「活度」と「性選別の精度」という、2つの性能の両立を初めて可能にすることを目指したものであり、たしかにそのような目的を達成することができた。今後は、家畜の繁殖性の改善に「雄側から」取り組む技術として、社会実装に向けた取り組みを強化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本開発技術に関連するバックグラウンド特許について、1件の実施許諾契約を行った。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------