

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：72611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650095

研究課題名（和文） 哺乳類の雌雄生みわけに関する新技法の開発に関する研究

研究課題名（英文） Application of convenience gender-sorting of mouse spermatozoa to mouse reproductive engineering technology

研究代表者 橋本 晴夫（Hashimoto Haruo）

公益財団法人実験動物中央研究所・バイオメディカル研究部・研究員

研究者番号：30353478

研究成果の概要（和文）：本研究目的は、従来困難とされていた哺乳動物の雌雄生みわけを可能にする新しい方法の開発である。そのための第一段階として実験動物のマウスで検討を行う。すなわち、生殖工学的生産にマウスの雌雄 50(%) : 50 の性比に人為的な偏りをかけることにより、雄あるいは雌を多く作製する技術の開発を試みた。

まず、Y 精子体部には SRY タンパクが分泌されていると報告されていたので、SRY 抗体と Cy3 の複合体を精子のいる培地へ加え、蛍光顕微鏡下で観察してみた。その結果、Cy3 による蛍光を発している精子と蛍光を発していない精子が観察された。さらに蛍光を発している精子をピックアップし、顕微授精を行ったところ、36 匹のマウス乳子のうち 31 匹の雄マウスを得ることができた(86.1%)。次に、Cy3 を磁気ビーズに置き換え精子のいる培地へ添加し、磁力により SRY 抗体-磁気ビーズと結合した精子を培地底面に引き寄せ、X 精子が多く存在していると思われる培地上部を体外受精に用いた。その結果、平均 67.3% の比率で雌を多く生産することができた。

従って、雄の生み分けには SRY 抗体-Cy3 複合体を用いた ICSI が有効であると言える。一方、雌の生産のための磁気ビーズによる分離を用いた方法は、その比率が少し低く改善の余地が求められるものの、2 つ以上の変異遺伝子マウスを作製時に、最初の体外受精で多くのホモあるいはヘテロ雌を作製する場合には有効であると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to apply convenience gender sorting methods for the mammals to mice with Cy3 labeling for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and magnetic beads for *in vitro* fertilization (IVF), via sex-determining region Y (SRY) antibody.

The Cy3-SRY antibody conjugate was added to TYH medium suspended mouse spermatozoa. The mouse spermatozoa labeled with Cy3-SRY antibody conjugate were used to ICSI. On the other hand, after reaction of the SRY antibody and mouse spermatozoa in TYH medium, magnetic beads were added and incubated. Thereafter, the conjugates of spermatozoa, SRY antibody and magnetic beads were pulled to the bottom of the medium by a magnet and the supernatant in the medium was used for IVF. The embryos were transferred to pseudo-pregnant mice, and the gender ratio was investigated on day 18 of gestation by Cesarean section.

As these results, the ICSI using the spermatozoa with Cy3-SRY antibody conjugate succeeded to reproduce 31 males of 36 infants (86.1%). On the other hand, the female proportion reproduced by the IVF using the spermatozoa with conjugates of SRY antibody

and magnetic beads was 67.3 %.

It was considered that these methods are very effective in reproduction of transgenic mice with more than 2 mutation genes that require several times of IVF and ET.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：動物実験技術、体外受精、胚移植、雌雄生み分け

1. 研究開始当初の背景

雌雄の生み分け技術の確立は従来、家畜の生産において渴望されている技術である。例えば、乳用牛においては、産乳のため雌牛を妊娠・出産させる。この時得られた子牛は次の乳生産のため雌が望まれる。従って本研究では、体外受精および胚移植の容易なマウスを例に雌雄の生み分けを試みる。今回の研究対象であるマウスの生産においても、雌は多くの匹数必要とされる。偶発的な偏りがなければ、胚移植後に得られる雌雄の性比は、50(%) : 50である。2005年にヒトの精子体部でSry転写産物が産生されている報告を応用し、本研究ではマウスを例とした哺乳類における新規の雌雄生み分け技術を考案した。これまでX、Y精子の密度勾配遠心法、沈降法、電気泳動法が検討されてきた。しかし、精子のDNA含有量の違いに基づく判別法以外、再現性のあるものはなく、既存の方法では分離した後に精子はほぼ死滅してしまうため、動物作製への応用にはほど遠かった。その後、ウサギ、ウシ、ヒト、マウス、ヒツジでフローサイトメトリーによりXYを分離し、顕微受精によって生み分けに成功しているが、これらの場合も分取した精子が凍結・融解に耐えられる生存性および運動性を維持していない。本研究で確立される技術は理論的には、体外受精法が確立されている哺乳動物であれば可能であるため、家畜分野に応用することで効率的な雌牛などの生産も可能である。

2. 研究の目的

雌雄生み分けによる雌動物の獲得は家畜生産で渴望されているため、その例として、体外受精および胚移植の容易なマウスを用いた雌雄の生み分けを試みる。マウスにおいても体外受精では、雄は媒精のため1匹いれば十分であるが、その一方で雌は1匹当たり10~20個の排卵数にも関わらず、胚移植後に得られる産子は排卵数の3割程度であるため、より多くの匹数を必要とされる。

本研究目的は、従来困難とされていた哺乳動物の雌雄生み分けを可能にする新しい方法の開発である。哺乳動物の例として、生殖工学的生産によって作製されるマウス乳子の雌雄50(%) : 50の性比に人為的な偏りをかけることにより、片方の性別のマウスを多く得るための技術の確立である。

3. 研究の方法

(1) マウス精子でのSry遺伝子発現の確認

基礎研究の第一として、マウスの精子でSry遺伝子発現の有無について、RT-PCRおよびノーザンハイブリダイゼーションを用いた定性解析によって検討した。Sry遺伝子は単一のエキソンであるため、エキソン間にプライマーを設計することができず、cDNAのサンプル中に微量に残ったゲノムDNAがある場合、増幅領域がcDNAであるかゲノムDNAであるかを判断することが困難であった。従って、今回はRT-PCR用プライマーの設定を下記の如く、2通りを設計し、これらのTA-cloningを行った(cDNA; Sry cDNA-T vector) および Genomic DNA; Sry Genome-T vector)。その結果、Fig. 1に示された2つの

配列を得た後に、シーケンス解析により **Sry** の配列であることを確認した。これらのベクターをポジティブコントロール、ノーザンハイブリダイゼーションではプローブとして用いて、マウス精子における **Sry** 遺伝子発現の定性解析を行った。



Fig. 1. **Sry**遺伝子におけるPCRプライマーの設計

(2) 蛍光基で標識された **SRY** 抗体とマウス精子の結合に関する検討

この項目では、1)で予定している **Sry** 遺伝子が精子で発現していることの確認結果と、**Modi** ら(2005)が示した **SRY** 蛋白はヒト精子の体部で産生されている結果を総合して、マウス精子の体部でも **SRY** 蛋白を産生していると仮定した。そのため **Cy3** 蛍光基で **SRY** 抗体を標識し、マウス精子との結合の有無を視覚的に検討し、かつ **SRY** 蛋白が精子体部に産生されていることを確認した。さらに蛍光を発している精子をピックアップし、顕微授精および胚移植にて乳子を得て、雄であるか否かについて検討した。

(3) **SRY-Mag** を用いた体外受精および胚移植による性比の検討

精子がいる **TYH** 培地へ磁気ビーズを **SRY** 抗体に結合させた複合体(**SRY-Mag**)を添加、磁力による分離および培地上部を採取し、体外受精および胚移植を実施した(Fig. 2)。19日後の出産を経て、直ちに雌雄判別を行い、雌マウスを多く得ることができるか検討した。

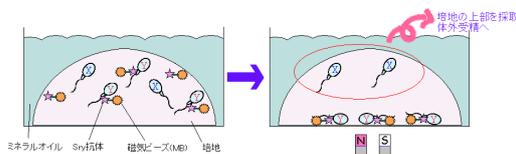


Fig. 2. 磁気ビーズによって標識された**SRY**抗体によるY精子の分離

4. 研究成果

(1) マウス精子での **Sry** 遺伝子発現の確認

マウス由来精子、精巣、睪臓の **cDNA** サンプル、マウスゲノム、ポジティブコントロールベクターに対し、**cDNA** 検出用プライマーを用いて **PCR** を行ったところ、精子および精巣の **cDNA**、マウスゲノム、ポジティブコントロールベクターで明瞭なバンドが確認された(Fig. 3, Lane2-6)。さらにマウス由来精

子、精巣、睪臓の **cDNA** サンプル、マウスゲノム、ゲノム用ポジティブコントロールベクターに対し、**SRY** ゲノミック DNA 検出用プライマーを用いて **PCR** を行った結果、マウスゲノムおよびゲノム用ポジティブコントロールベクターのみに **PCR** バンドを示した(Fig. 3, Lane8-12)。すなわち、ゲノム DNA の混入が無くマウス精子でもヒトと同様に **Sry** 遺伝子の発現が認められた。

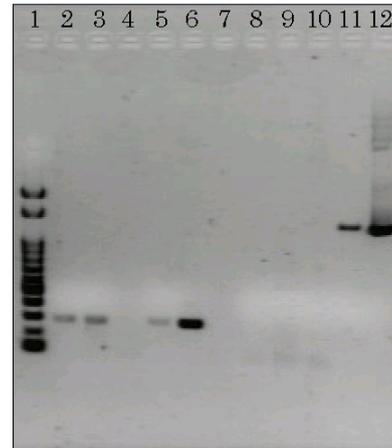


Fig. 3. 逆転写 **PCR** によるマウス精子での **Sry** 遺伝子発現の確認

Lane 1: 100bp Marker

Lane 2: Spermatozoa-cDNA detection primer

Lane 3: Testis-cDNA detection primer

Lane 4: Pancreas-cDNA detection primer

Lane 5: Genomic DNA-cDNA detection primer

Lane 6: **SRY** cDNA cloned by T vector-cDNA detection primer

Lane 7: - (None)

Lane 8: Spermatozoa-Genomic DNA detection primer

Lane 9: Testis-Genomic DNA detection primer

Lane 10: Pancreas-Genomic DNA detection primer

Lane 11: Genomic DNA-Genomic DNA detection primer

Lane 12: **SRY** cDNA cloned by T vector-Genomic DNA detection primer

(2) 蛍光基で標識された **SRY** 抗体とマウス精子の結合に関する検討

SRY 抗体と **Cy3** の複合体を精子のいる精子培地に加え、蛍光顕微鏡下にて観察を行った結果、**Cy3** による蛍光を発している精子と発していない精子が観察することができたと共に精子での **SRY** タンパクの発現を確認できた(Fig. 4-A, B)。さらに、蛍光を発して

いる精子をピックアップし顕微授精および胚移植にて乳子得た結果、36匹の乳子のうち31匹の雄を得ることが出来た(86.1%)。

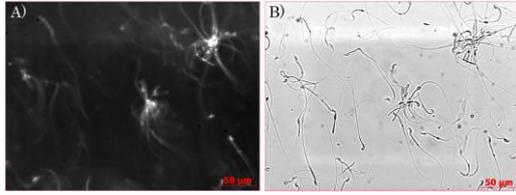


Fig 4 SRY 抗体-Cy3 複合体による Y 精子での SRY タンパク発現の確認

A) Y spermatozoa were detected by Cy3-SRY antibody conjugate. X spermatozoa were not detected.

B) Observation by a light microscope.

(3) SRY-Mag を用いた体外受精および胚移植による性比の検討

精子がいる TYH 培地へ SRY-Mag を添加、磁力による分離および培地上部を採取し、体外受精および胚移植を実施した結果、生まれた乳子のうち雌乳子の比率は平均 67.3 %であった。一方、磁気ビーズを結合させず SRY 抗体のみを添加した精子を対照とした群では、生まれた乳子のうち雌乳子の比率は平均 50.3 %であった。磁気ビーズの体外受精への応用により、生まれる乳子のうち雌の比率を 17.0%上昇させることができた。

結論)

本研究の結果から雄の生み分けには SRY 抗体-Cy3 複合体を用いた ICSI が有効であると言える。一方、雌の生産のための磁気ビーズによる分離を用いた方法は、その比率が少し低く改善の余地が求められるものの、2 つ以上の変異遺伝子マウスを作製時に、最初の体外受精で多くのホモあるいはヘテロ雌を作製する場合には有効であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Haruo HASHIMOTO. Study on establishment of congenic strains and screening of characteristics in IRS-2 deficient mice to support translational research on type 2 diabetes. *Experimental animals* (査読有). 60 巻, 2011. p21-32.

DOI: 10.1538/expanim.60.21

② 橋本晴夫、新井敏郎、川井健司、鬼頭千佳、大美典子、早川絵里、水島友子、樋口裕一郎、江袋美知、末水洋志、日置恭司、斎藤宗雄、伊藤 守、小坂樹徳. db/db マウスの系統比較から考察されるレジスチンの役割. *実験動物技術*(査読有). 46 巻, 2011. p11-18. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10029381001>

③ Haruo HASHIMOTO, Susumu EBUKURO, Ryoko NOZU, Masami UENO, Toshiro ARAI, Kenji KAWAI, Hiroshi HIRATA, Maya OGAWA, Takuma MIZUSAWA, Kuniyasu IMAI, Yuichiro HIGUCHI, Hiroshi SUEMIZU, Mamoru ITO, Muneo SAITO, and Kyoji HIOKI. Vinyl isolator breeding induces insulin resistance in C57BL/6JJcl mice. *Experimental animals* (査読有). 60 巻, 2011. p 497-508. DOI: 10.1538/expanim.60.497

[学会発表] (計 1 件)

① 橋本晴夫¹、江袋 進¹、野津量子¹、植野昌未¹、新井敏郎²、川井健司¹、平田 裕¹、小川麻耶¹、水澤卓馬¹、末水洋志¹、伊藤 守¹、斎藤宗雄¹、日置恭司¹(実中研¹、日獣大²)。アイソレーター飼育は C57BL/6JJcl マウスにインシュリン抵抗性を引き起こす。第 58 回日本実験動物学会総会、(東京)、平成 23 年(2010)5 月 26 日。

[その他]

ホームページ等
特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 晴夫 (HASHIMOTO HARUO)

研究者番号 : 30353478

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :