



本件の報道解禁につきましては、令和元年
8月14日(水)午前3時以降にお願いいたし
ます。

令和元年7月29日

記者説明会（8月9日（金）13：30・東京）のご案内

簡便かつ安価な雌雄産み分け方法の開発に成功！
～哺乳類のX精子とY精子に機能差があることを初めて実証～

【本研究成果のポイント】

- X染色体をもつ精子（X精子）とY染色体をもつ精子（Y精子）に潜在的な機能差があることを明らかとした。
マウス精子に存在するRNAを網羅的に検出し（*1）、それらがどの染色体から発現したかを解析することで、X染色体をもつ精子（X精子）にのみToll様受容体（TLR7とTLR8）（*2）が発現していることを発見した。さらに、両者を薬理的に刺激することで、X精子が不動化することを見出した。これらの成果は、これまで精子形成過程でブリッジ（*3）を介して、X精子もY精子も同一の機能を獲得すると考えられていた定説を覆す新知見である。
- TLR7とTLR8のリガンド（*4）によりX精子とY精子を分離し、それらを用いた体外受精による新規雌雄産み分け法を開発した。
X精子が、TLR7とTLR8を薬理的に刺激すると沈殿する反応を利用し、マウス精子を下層のX精子と上層のY精子に分離回収後、それらを体外受精（*5）に用いた。その結果、正常な受精率と発生率を示し、その初期胚を移植することで、雌雄を選択的に生産する雌雄産み分け法を開発した。さらに、ウシ精子とブタ精子においても半数の精子にTLR7/8が発現することを確認し、ウシでは体外受精で、ブタでは人工授精（*6）により雌雄産み分けにも成功した。

【概要】

広島大学大学院統合生命科学研究科 島田 昌之 教授、梅原 崇 助教および辻田 菜摘 研究員の研究グループは、マウスを用いて精子形成過程で分配される性染色体（X染色体とY染色体）（*7）の違いが、X染色体を有する精子（X精子）とY染色体を有する精子（Y精子）の機能差を発揮させることを見出しました。具体的には、X染色体にコードされているTLR7とTLR8がX精子にのみ発現していること、そのTLR7とTLR8を薬剤で活性化することによってX精子とY精子の分離が行えることを明らかとしました。さらに、ウシやブタにおいても半数の精子にTLR7とTLR8が発現していること、両者を刺激する薬剤によるウシとブタの簡便な雌雄産み分け技術の開発にも成功しました。

本研究のマウスをモデルとした研究成果は、アメリカ東部時間の2019年8月13日午後2時（日本時間：8月14日午前3時）「PLOS Biology」オンライン版に掲載されます。

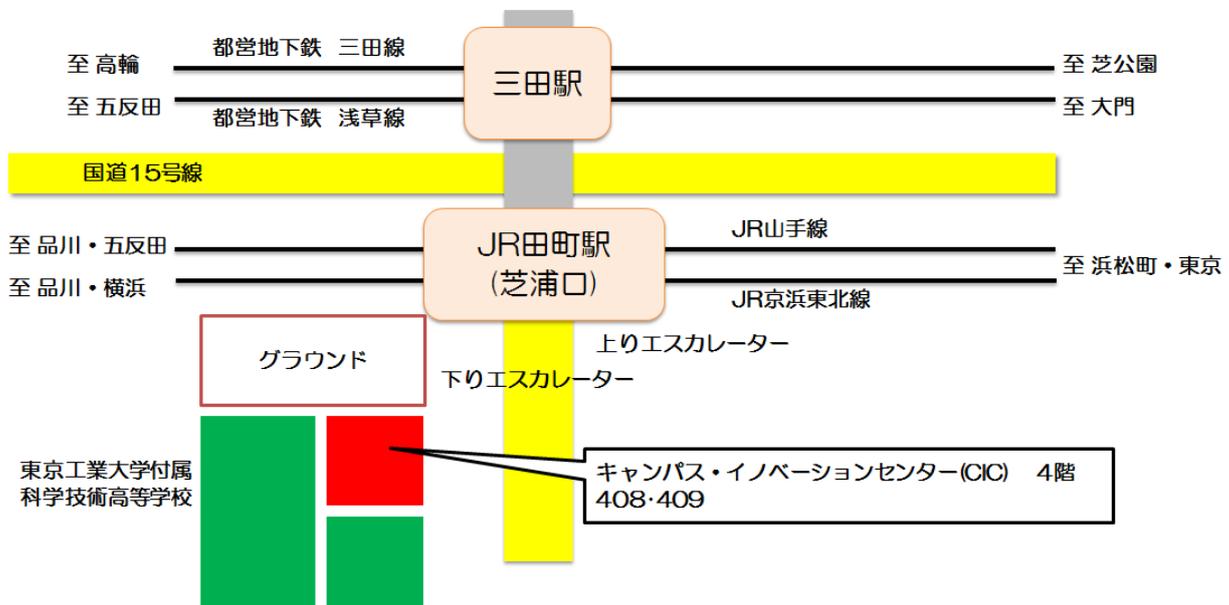
本件につきまして、下記のとおり記者説明会を開催し、ご説明いたします。ご多忙とは存じますが、是非ご参加いただきたく、ご案内申し上げます。

記

- 日時：令和元年8月9日（金）13：30～14：30（13:00 から受付）
場所：広島大学東京オフィス
東京都港区芝浦 3-3-6
キャンパス・イノベーションセンター
リエゾンコーナー508（5階ラウンジ）
- 出席者：・広島大学大学院統合生命科学研究科 教授 島田 昌之
・広島大学大学院統合生命科学研究科 助教 梅原 崇
・大分県農林水産研究指導センター畜産研究部
肉用牛繁殖・酪農チーム 研究員 池堂 萌果
・大分県農林水産研究指導センター畜産研究部
豚・鶏チーム 研究員 後藤 雅昭

◆広島大学東京オフィスへのアクセス

- ・JR山手線・京浜東北線-田町駅(芝浦口)下車 徒歩1分
(駅の階段を下りると、約10メートルほどでCIC東京の玄関です)
- ・都営三田線・浅草線-三田駅下車 徒歩5分



<発表論文>

論文タイトル

Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm

著者

梅原 崇、辻田 菜摘、島田 昌之
広島大学大学院統合生命科学研究科

掲載雑誌

PLOS Biology

DOI番号

10.1371/journal.pbio.3000398

<特許出願>

発明の名称

哺乳動物精子の分離方法、人工授精方法及び体外受精方法

発明者

島田 昌之¹、梅原 崇¹、後藤 雅昭^{1、2}、久々宮 萌果²

¹広島大学大学院統合生命科学研究科、²大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

出願人

国立大学法人広島大学、大分県

出願番号

特願 2018-120260

【背景】

哺乳類において、性別決定は X 染色体と Y 染色体という性染色体の有無によって決定され、XX が雌、XY が雄になります。雄の生殖細胞である精子は、精巣内で精祖細胞が減数分裂し、常染色体と X 染色体あるいは Y 染色体が分配された雄性配偶子（精子細胞）となったのち、形態と機能を大きく変化させる（精子変態）ことで造精されます（図 1）。すなわち、哺乳類の精子には常染色体+X 染色体を有する精子（X 精子）と常染色体+Y 染色体を有する精子（Y 精子）の 2 種類が存在します。このような性別の決定様式は XY 型と呼ばれ、受精時に、卵（雌由来の細胞なので X 染色体のみ）と X 精子が受精することで雌（XX）に、Y 精子と受精することで雄（XY）となります。

マウスの X 染色体には 3,000 以上の遺伝子が存在し、そこには精子形成に必須な遺伝子も存在します。しかしながら、X 染色体の有無が精子の機能差として発揮されない理由として、精子が完成する直前まで、ブリッジ（*3）という構造体により X 精子へと変態する X 染色体を有する精子細胞と Y 精子へと変態する Y 染色体を有する精子細胞が結合し、そのブリッジを介して X 染色体から発現したメッセンジャー RNA やそれらから翻訳されたタンパク質を共有し、X 精子と Y 精子の機能差をなくしていると考えられてきました（図 1）。そして、ブリッジが消失した後では、精子細胞では遺伝子発現がほとんど起きなくなっているため、機能差が現れないとされています。すなわち、X 精子と Y 精子が同数形成されるとともに、同じように運動し、受精することができることから、多くの哺乳類において雌雄比が理論通り 1:1 となると考えられています。

【研究成果の内容】

我々は、精子細胞間のブリッジが消失した精子形成過程後期に発現する遺伝子を網羅的に解析し、そこから X 染色体にコードされるものを選択することで、X 精子と Y 精子の機能差を解明し、かつそれを人為的に制御することはできないか？と仮説立てました。そこで、マウス精子をサンプルとして RNA シークエンス（*1）を行い『精子形成過程後期に発現し、精子でも残存している遺伝子』を候補化することで、その立証を試みたところ、マウス精子において 492 個の X 染色体由来遺伝子が残存していることが明らかとなりました。それら X 染色体由来遺伝子群から、

- ① ブリッジが消失した精子形成過程後期で発現する遺伝子であること
- ② 薬理的処置で簡便に刺激可能な“受容体”をコードする遺伝子であること

という 2 段階スクリーニングを実施しました。その結果、X 染色体にコードされる Toll 様受容体（TLR）7/8 をコードする *Tlr7* と *Tlr8* を候補化しました。

精子は凝集した核を有する“頭部”とエネルギーであるアデノシン 3 リン酸（ATP）を生産するミトコンドリアを数多く含む“中片部”、そして精子の運動を制御する“尾部”から構成されています。TLR7/8 の発現を免疫染色法（抗 TLR7 抗体あるいは抗 TLR8 抗体を用いて、TLR7 と TLR8 の精子における局在を検出）や Immuno-FISH 法（抗 TLR7 抗体で TLR7 の有無を検出し、X 染色体に結合するプローブにより X 染色体の有無を検出）により、X 染色体にコードされる TLR7 と TLR8 が、減数分裂が完了した精子細胞において、精子への変態が開始された以降で X 染色体を有する細胞（X 精子に変態過程の精子細胞）でのみ発現すること、それらが精子完成後も TLR7 は精子尾部、TLR8 が精子中片部にタンパク質として存在することを発見しました。

TLR7 と TLR8 は、RNA ウイルスを認識する受容体です。この両受容体を刺激する薬剤で精子を処理した時、X 精子のみがグルコースをエネルギー変換する嫌氣的解糖系の活性が低下して ATP 産生量が減少し、運動を停止して不動化すること、その結果、受精能を消失することを明らかとしました（図 2）。この TLR7 と TLR8 を刺激する合成リガンドの運動停止作用は可逆的であり、精子を洗浄して薬剤を除去した

後、不動化精子は運動と受精能を回復することも確認しました。この研究成果は、これまで X 精子と Y 精子では機能差がないと考えられていた定説を覆す新発見で、環境によっては（ここでは RNA ウィルスに感染した個体）雌雄比が変わりうる可能性を示しています。実際にこの基礎的知見から、TLR7 と TLR8 を刺激する薬剤で精子を処理し、沈殿した精子を回収して体外受精に用いると 80%以上の確率で雌が誕生し、上向した精子（*8）を用いることで 80%以上の確率で雄が誕生しました。

以上の結果から、『精子細胞間の架橋（ブリッジ）によって X 精子と Y 精子の間に機能差が生まれない』という定説は覆され、ブリッジが切断された後でも X 染色体から発現する遺伝子が存在し、それらは X 精子から Y 精子へと共有されないため、X 精子と Y 精子間の潜在的な機能差が生み出されることが初めて明らかとなりました。そして、X 精子と Y 精子の潜在的な機能差は、生理的環境下においては隠されていますが、薬剤処置などの非生理環境下や RNA ウィルス感染などが起こることで発揮され、哺乳類においても雌雄比が偏在することが示されました。そして、この X 精子と Y 精子の潜在的機能差を人為的に発揮させることで、簡便に雌雄産み分けが可能となりました。

【今後の展開】

現在、畜産業において雌雄の産み分け技術はウシでしか実用化されておらず、またセルソーターという高額な機器が必要であること、X 精子と Y 精子の分離に長時間を有すること、その処理期間に精子の受精能力が低下するといった問題点があります。そして、多量の精液を人工授精で注入するブタでは、雌雄産み分け技術はまったく実用化されていません。

本研究成果は、環境（条件）によっては、XY 型哺乳類でも児の雌雄比が変わりうることを明らかとした基礎的な研究成果だけでなく、特別な機器を使用せずに簡便に短時間で X 精子と Y 精子を分離し、雌雄産み分けを可能とするものです。本技術により作製したウシ XY 胚の移植により、雄牛が誕生しています。また、分離した Y 精子を用いたブタ人工授精により、雄比率が 70%以上を達成しています。これは畜産分野に大きなインパクトを与えるものです。

本研究で着眼した TLR7 と TLR8 は、XY 型の動物（ヒト、チンパンジー、マウス、イヌ、ネコ、ウシ、ブタなど）において X 染色体にコードされていることから、多くの哺乳類で簡便な雌雄産み分け法を適応できると期待できますが、ヒトにおいては、技術的に可能であっても倫理的問題を議論する必要があります。

【参考資料】

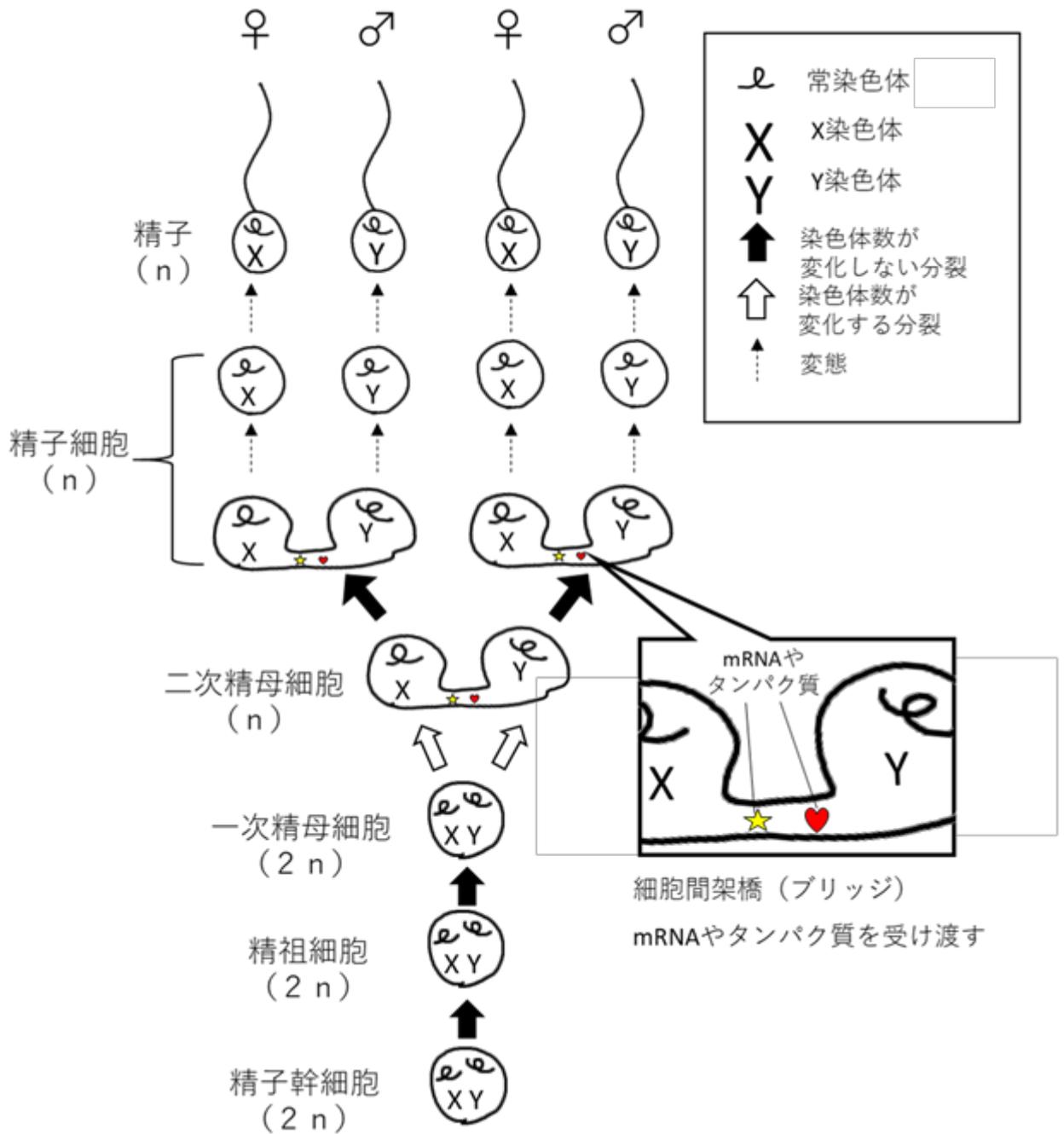


図 1. 精子形成過程と染色体分配の仕組み。雄の生殖細胞である精子は、精巣内で精子幹細胞を起源として産生される。精子幹細胞は体細胞分裂をするとともに、一部の精子幹細胞が減数分裂過程に移行することで、精子形成は開始される。減数分裂に移行した精子幹細胞は、精祖細胞、一次精母細胞となったのち、染色体が分配された二次精母細胞となり、精子細胞へと分裂する、このとき、二次精母細胞間や精子細胞間には細胞間架橋（ブリッジ）によって連結されているため、常染色体+X染色体を有する精子細胞と常染色体+Y染色体を有する精子細胞の間でメッセンジャーRNA やタンパク質が輸送された結果、精子細胞間の機能は均一化されていると考えられていた。しかしながら、本研究より、精子細胞の中でも後期のステージ（ブリッジ消失後と推定される時期）に発現する X 染色体由来遺伝子によって、X 精子と Y 精子間に機能差が生まれることが明らかとなった。

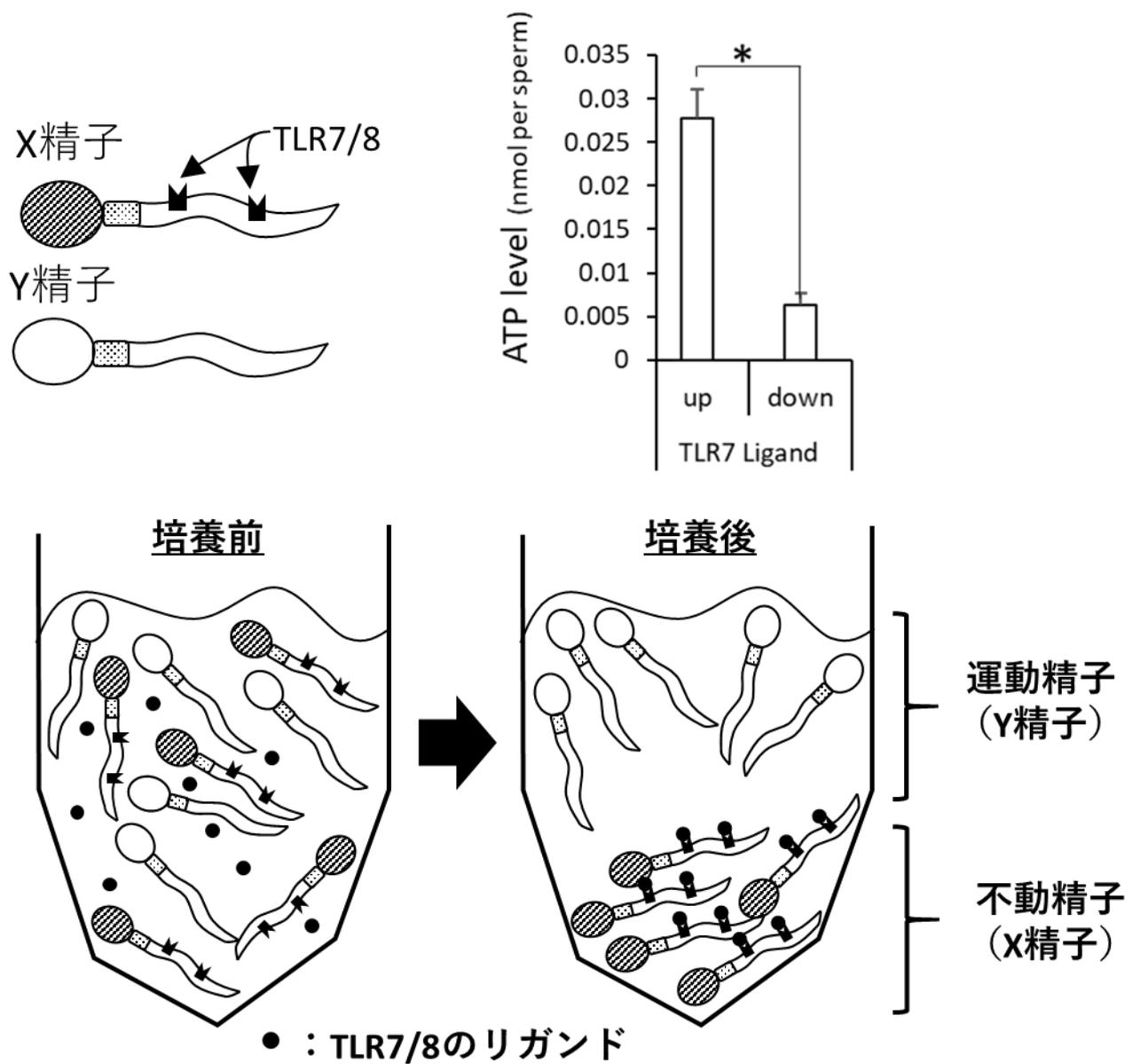


図2. TLR7とTLR8がX精子に及ぼす影響。TLR7とTLR8を刺激するリガンドを添加し、マウス精子を培養すると、TLR7とTLR8を有するX精子がATP産生の低下に伴って、下層に沈殿する(不動精子)。その一方で、TLR7とTLR8を有さないY精子は、リガンドの影響を受けず、上層で遊泳している(運動精子)。この仕組みを利用して、本研究ではTLR7とTLR8を刺激するリガンド存在下におけるX精子とY精子の分離が可能となった。

<用語説明>

(＊1) 発現遺伝子の網羅的な解析 (RNA シークエンス)

細胞内に存在する全ての RNA について、全塩基配列を次世代シーケンサーによって決定する手法。決定された配列を既知遺伝子や染色体上にマッピングし、その発現を定量化することで、細胞内に存在する全ての遺伝子について発現や存在を定量化できる。

(＊2) Toll 様受容体 (TLR)

細胞膜表面あるいは細胞内の小胞体にある受容体タンパク質であり、種々の病原体を感知して自然免疫（生体に侵入した病原体をいち早く感知し、発動する第一線の生体防御機構）を作動させる機能を有する。哺乳類において、TLR1 から TLR13 まで 13 種の存在が報告されている。本研究で着眼した TLR7 と TLR8 は、RNA ウイルスの感染を認識する受容体であり、1 本鎖 RNA や合成低分子化合物により活性化される。

(＊3) 細胞間架橋 (ブリッジ)

精巣内の生殖細胞同士をつないでいる Intercellular bridge (生殖細胞間架橋) と呼ばれる構造であり、mRNA やタンパク質、細胞内小器官の生殖細胞間の輸送を可能にする。この作用によって、生殖細胞の間の成熟や機能が均一化させると考えられている。

(＊4) TLR7 と TLR8 のリガンド

リガンドとは、特定の受容体に特異的に結合して、受容体を活性化する物質であり、TLR7 と TLR8 両者に作用するリガンドとして低分子化合物である R848 が、TLR7 にのみ結合するリガンドとして R837 が知られている。

(＊5) 体外受精

通常は体内で起こる受精を体外で行うこと。具体的には、排卵された卵を体外において回収し、それを体外環境において精子と共に培養することで受精卵を得る手法。

(＊6) 人工授精

体内で起こる受精を人為的に操作するため、精子を含んだ精液を雌の副生殖器（子宮、子宮頸あるいは膣）内に直接注入し、受精機会を高める手法。

(＊7) 性染色体

生物の雌雄を決定する染色体であり、哺乳類では X 染色体と Y 染色体、両生類、爬虫類、そして鳥類では Z 染色体と W 染色体のことを指す。哺乳類において、X 染色体のみを有するホモ型個体 (XX) が雌となり、X 染色体と Y 染色体を共に有するヘテロ型個体 (XY) が雄となる。一方で、両生類、爬虫類、そして鳥類では Z 染色体のみを有するホモ型個体 (ZZ) が雄となり、Z 染色体と W 染色体を共に有するヘテロ型個体 (ZW) が雌となる。

(＊8) 上層精子・下層精子

精子は、運動性が良好なものは重力に逆らって上向し、運動性が低いものが重力に従って下降する性質がある。

【お問い合わせ先】

広島大学大学院統合生命科学研究科 教授 島田 昌之
TEL : 082-424-7899 FAX : 082-424-7899
E-mail : mashimad@hiroshima-u.ac.jp

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部 企画指導担当
TEL : 0974-76-1214 FAX : 0974-76-1227
E-mail : a15087@pref.oita.lg.jp

(別紙)

【FAX返信用紙】

FAX：082-424-6040

広島大学財務・総務室広報部 広報グループ 行

記者説明会（8月9日（金）13：30・東京）のご案内

簡便かつ安価な雌雄産み分け方法の開発に成功！
～哺乳類のX精子とY精子に機能差があることを初めて実証～

日時：令和元年8月9日（金）13：30～14：30

場所：広島大学東京オフィス

東京都港区芝浦3-3-6

キャンパス・イノベーションセンター

リエゾンコーナー508（5階ラウンジ）

ご出席

ご欠席

貴社名 _____

部署名 _____

ご芳名 _____ (計名)

電話番号 _____

誠に恐れ入りますが、上記にご記入頂き、8月6日（火）16：00まで
にご連絡願います。