

家畜胚の性分別 — 雌雄の生み分け —

京都大学農学部 内海恭三

「雌雄の生み分け」は動物の分野でもヒトにおいても古来より多くの人の関心を集めてきた話題である。哺乳動物ではX-染色体を持った精子と受精した卵子は雌個体に、Y-染色体を持った精子と受精した卵子は雄個体になるように、雌雄の決定因子は精子にある。受精能力のある精子を雌雄に分離できない現状では、受精卵のXXかXY構成かを識別する方法が開発されている。雄性化の因子として雄性特異抗原が提唱されて以来、様々な議論を呼んでいるが、極最近、精巣決定に関係すると言われていたSry遺伝子の導入胚からXX染色体構成の雄マウス個体を得た事から、それらの関連遺伝子の解析も大きく前進しようとしている。本講演では精子と初期胚の性分別の研究の現況と問題点を紹介する。

(1) X精子とY精子の分離

1) フローサイトメトリー： 精子頭部のDNA含量の数%の差をフローサイト・セルソーターで分離する方法が開発された。皮肉にも、従来の遠心分離や沈降法で分画された精子をこの方法で検定すると全てXY分離されていないことが実証された。またこの方法では回収効率と生存性に問題があって、実用的な技術には至っていないが、分離精子の人工授精で高い中率でウサギ産子が得られている。

(2) 胚の性分別

1) 組織学的染色体検査： 胚の性分離については古くから生検に対する性染色体の組織学的検査によってきたが、染色体標本の作成や判定の効率に問題が残り、普遍的な技術になっていない。

2) 雄性特異抗体： 雄性特異抗体を利用して、抗原陽性胚を雄として選別する方法がある。間接蛍光抗体法を利用する抗原検出法ではUV照射の致死性や蛍光識別の曖昧さに問題が残る。演者らによって開発された胞胚腔形成抑制による分別法を詳述する。ラットの新生児精巣の同種免疫によって得られた抗体はラットのみならずマウス、家兎、山羊、羊、牛の桑実期の雄胚に対してのみ特異的に腔形成を抑制することが知られた。抗体を含んだ培養液中で6~8時間培養すると腔形成する胚と桑実期胚のままの2群に分かれる。抗体から開放された桑実期胚は腔形成を再開し、宿主に移植後には雄産子に発育した。抗体中で腔形成した胚盤胞は雌胚に発育した。雄性特異抗体で性分別した胚を性染色体で再検査した結果と移植して産子の得られた結果から、それぞれ70~90%の確立で判定されていることが確認された(表-1)。この雄性特異的抗原は精巣の精細管細胞に存在し、8~16細胞期以後の胚に出現することから、接合子での父系遺伝子作用との関連が示唆された。しかし、この方法は抗体の作出が容易でないこと、後期桑実胚にしか適用できないことが問題とされる。

表-1 H-Y抗体による性分別胚の性染色体検査
と産子の性的中率

	胞胚腔 形成胚	胞胚腔 抑制胚
供試胚数	22	30
抗体で判定された胚数	18	22
胚標本作製数	14	11
胚当りの細胞数	107.8±34.4	99.4±11.5
中期核板を持つ胚数	14	9
胚当りの中期核板数	3.2±1.9	3.1±0.9
核型分析で性判定された胚数	11	9
抗体の性判定と一致した胚数	10	7
性的中率(%)	(90.9)	(77.8)

移植胚数	13	12
分娩胚数	8	9
抗体の性判定と一致した産子数	6	9
性的中率(%)	(75.0)	(100.0)

3) 遺伝子増幅(PCR)法： 近年、PCR法の開発と雄性特異的DNAの塩基配列の解析の進歩から雄性の精子や胚細胞生検のDNA診断が可能になった。Y染色体上にある精巢形成因子のヒトSR YやマウスS r yの塩基配列をプライマーにして、細胞生検の雄性DNAをPCRによって増幅して雄細胞を検出する。ウシではY染色体長腕部の特異的反復配列をプライマーにしてウシ胚を分別する。各々のプライマーを使って、各動物種の細胞が比較された。生検、増幅、検出まで約5時間で完了する。牛Y染色体の長腕部の特異的反復配列DNAと牛成長ホルモン遺伝子DNAをプライマーとして、牛胚の生検(栄養膜細胞の内の約10細胞)のDNAを増幅した(表-2)。増幅したDNAは寒天ゲル電気泳動でバンドを検出した。雄胚細胞では140bp(雄性特異DNA)と700bp(成長ホルモン)の2本のバンドが、雌胚細胞では700bpのみのバンドが検出された。140bpのバンドは雄性細胞であること、700のバンドは雌雄両方の細胞に出て牛細胞由来DNAであることを示している。プライマーの選択、PCRの条件設定、試料への夾雑物などの原因で間違った結果の得られることがある。さらに胚生検の技術、被生検胚の凍結保存、より特異性の高いプライマーの開発などの問題点もある。また雌雄の産子の結果を評価するのに統計的に有意な母数の結果に基づく必要のあることも忘れてはならない。

表-2 Y染色体特異的DNAをプローブとした牛胚の性判定

	新鮮胚	凍結胚
生検胚数	10	10
生検後の生存胚数	9	9
検査胚数	10	10
性判定胚数	10	10
凍結胚数	-	3
融解後の生存胚数	-	8
移植胚数	10	3
妊娠数	4	1
出産仔牛数	3	-
性的中数(%)	3(100)	-

(3) 胚の性誘導

1) 胚へのSRY遺伝子の導入: 今後の新しい展開として性分別から性誘導への道がある。単為発生胚や雌性または雄性発生胚は各々雌、または雄個体になるはずであり、雄性または雌性の胚性幹細胞を供与核とする核移植胚はその性の産子になるはずである。雄性化遺伝子を胚に導入することによって雄個体を誘導することも可能と考えられる。実際マウスの精巢決定遺伝子をマウス前核期卵子へ導入して、XX性染色体構成であるが、精巢を持つマウス個体が得られている。このような発想を今後さらに展開するためには遺伝子支配を含めた性分化の機序、胚の発生学的解析、胚操作術などの総合的進歩が必要と思われる。