

領域略称名：動植物アロ認証
領域番号：3101

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る事後評価報告書

「動植物に共通するアロ認証機構の解明」

(領域設定期間)

平成21年度～平成25年度

平成26年6月

領域代表者 名古屋大学・大学院理学研究科・教授・澤田 均

目 次

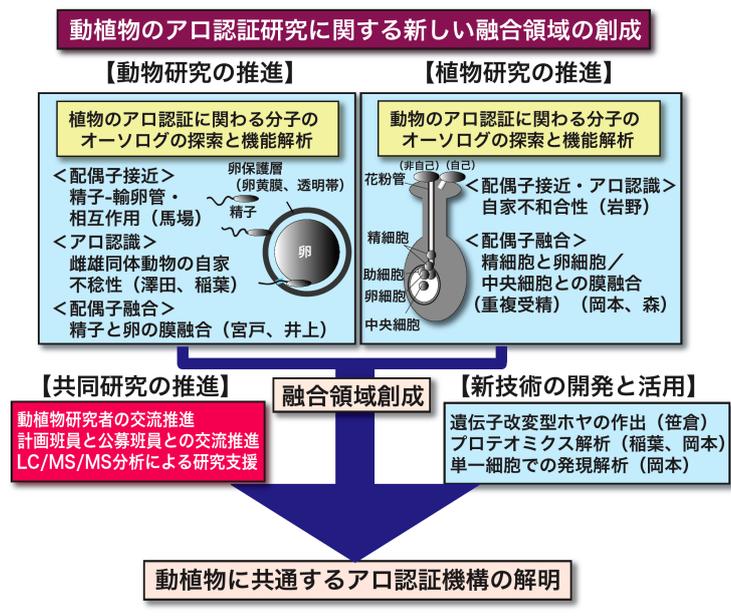
1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	4
3. 研究領域の設定目的の達成度	7
4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	13
5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	14
6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	15
7. 総括班評価者による評価	16
8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	18
9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	23
10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	29

1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

① 研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯）：

有性生殖はアロ（同種異個体）の関係にある細胞同士が融合し、遺伝的に多様な子孫を残す仕組みである。これには、遺伝的に異なる配偶子を選抜するアロ認識機構と、選ばれた雌雄の配偶子が膜融合する配偶子認識機構が含まれる（ここでは両認識機構を統合して「アロ認証」と呼ぶ）。このアロ認証機構は、生物種間で非常に異なるとこれまで考えられてきた。しかし、領域代表が世界に先駆けて最近発見した原索動物のアロ認識機構（雌雄同体のホヤ類が自家受精を回避する機構）は植物における自家不和合性の原理と共通している（精子側と卵側のアロ認識遺伝子がゲノム上で近接し、自己分子を相互認識することにより自家受精を回避しているという共通原理に基づく）ことが判明したこと(Harada et al., Science 320: 548- 550 (2008))、さらに、植物の配偶子膜融合に必須な遺伝子*GCSI* がマラリア原虫や海産無脊椎動物にも広く存在することもわかり (Mori et al., Curr. Biol. 18:607-613 (2008))、動植物の枠を超えた新しい研究領域を創成し、その共通原理を解明することが急務であると考えに至った。本領域研究では、世界をリードする本邦の動植物研究者が一堂に会して新しい融合領域を創成し、動植物に共通するアロ認証機構の解明をめざす。本企画は、新興融合領域の創成という新学術領域研究の趣旨とも合致したプロジェクトである。



【図1】 領域研究の概要と班員の役割分担

② 研究期間内に何をどこまで明らかにするか：

【アロ認識機構】 雌雄同体であるカタユウレイボヤでは、精子が卵黄膜に結合する段階で自己非自己認識(アロ認識)が行われ、自己と認識されると卵黄膜から離脱して受精が阻止される。獲得免疫系を持たない原索動物ホヤ類が自他の配偶子を認識して自家受精を回避する現象は古くから知られていたが、その分子機構は長年の謎であった。領域代表は、順遺伝学的な手法と卵黄膜プロテオーム解析により、第2染色体の遺伝子ペア（精子側s-Themis-Aと卵側v-Themis-A）と第7染色体の遺伝子ペア（精子側s-Themis-Bと卵側v-Themis-B）が自家不和合性に関わることを明らかにした。そこで、本領域研究では、s/v-Themisのタンパク質としての存在証明とアレル特異的なタンパク質間相互作用の解析、s/v-Themisの機能解析、各アレルの多型解析、細胞内シグナル伝達機構の解析に焦点を絞る（澤田、稲葉、笹倉）。

植物におけるアロ認識機構の研究では、今までアブラナを用いた自家不和合性機構の解析が行われてきたが、遺伝子改変等の手法が活用出来ない点に問題があった。そこで本領域研究では、シロイヌナズナに材料を変更し、分子細胞生物学的研究を行う（岩野）。シロイヌナズナは自家和合種であるが、それに自家不和合性遺伝子を導入すると自家不和合モデル植物を作出できる。これを用いて、自家・他家受粉時のCa²⁺イメージングを行う。またそのシグナル伝達機構に関して、ホヤにおけるアロ認識機構との共通性と

いう視点から解析を進める(岩野、澤田)。

【配偶子接近・相互認識機構】 馬場は、配偶子の細胞膜融合に関与すると信じられていたADAM タンパク質をノックアウトすると、細胞膜融合は阻害されず、精子の卵透明帯への結合が阻害されることを明らかにした。さらに、ADAM タンパク質の遺伝子を破壊すると、精子が子宮から輸卵管に移動できなくなることを、すなわち、ADAM は、精子と母体とのアロ認証機構にも関わることを明らかにした。そこで、本領域研究では、雌性生殖器において、精子がどのように認識されているのかについて、アロ認証の視点から詳細に解析する(馬場)。植物の配偶子接近や認識に関わる分子の網羅的解析も試みる(岡本)。

【細胞接着・膜融合機構】 宮戸は、ノックアウトマウスを用いた実験により、配偶子融合に必須の卵側分子 CD9を世界で初めて明らかにした。また、井上は、IZUMO1 と名付けた精子膜タンパク質が精子側の膜融合分子であることを世界に先駆けて明らかにした。本領域研究では、これらの膜融合に関わる因子の機能を明らかにすることにより、膜融合機構を解明する(宮戸、井上)。一方、岡本は、植物の精細胞、卵細胞、中心細胞における単一細胞アレイ解析および発現タンパク質の微量系プロテオミクス解析を行い、膜融合に関わる分子を探索する(岡本)。森は、高等植物において、配偶子細胞膜融合に必須の精子膜タンパク質GCS1 を発見している。また、そのオルソログは、刺胞動物、藻類、粘菌、寄生虫にも存在することを見いだしている。そこで、本領域研究では、GCS1 の活性部位の同定、GCS1の膜融合に関わる中核原理の解明、動植物の膜融合に共通して関与するGCS1以外の分子探索を試みる(森)。

【新技術開発・アロ認証統合理解】 稲葉はカルシウムイメージング技術やプロテオーム解析のための機器と解析技術があり、本領域においても、共同研究を通してこれらに関連する研究を推進する(稲葉、澤田)。笹倉は遺伝子改変ホヤの作出に成功しており、現在遺伝子破壊技術を開発中である。期間内にその遺伝子破壊技術を完了させる。そしてそれを利用したホヤ遺伝子の機能解析を行う(笹倉、澤田)。

③ 領域内での研究の有機的結合により新たな研究の創造が期待される点：

今までは、動物研究者と植物研究者が一堂に会して生殖機構について議論する場はなかった。従って、本領域の創成により、「無」から「有」を生じる新しい研究の創造が期待される。具体的には、植物の配偶子膜融合に必須な因子 GCS1 は、精細胞で発現していることは知られているが、受精における詳細な機能解析は通常の方法では困難である。しかし、新領域の創成によって、動物における GCS1 の機能解析を行うことにより、植物の GCS1 の機能を知ることが可能となる。実際に、本遺伝子はマラリア原虫にも存在しているが、領域内共同研究により、マラリア原虫の配偶子融合に GCS1 が必須であることが判明した。このことは、マラリア原虫 GCS1 のペプチドをワクチンとして投与すれば、マラリア感染予防薬に応用できることを示唆している。刺胞動物にも GCS1 遺伝子が存在することが知られているが、刺胞動物の場合、精子には先体胞がなく、卵には卵黄膜もない。従って、配偶子膜融合解析に適している。また、領域内共同研究により、ゼニゴケ、クラミドモナス、細胞性粘菌など、様々な生物における GCS1 の機能解析を行うこともこの新しい領域の創成により可能となった。

④ 当該分野におけるこの研究の学術的特色・独創性、予想される結果と意義：

動植物に共通のアロ認証分子やアロ認証機構が存在することが最近明らかになりつつある。そうした背景を考えると、この新興融合領域研究を創成し、その共通機構(中核原理)を分子レベルで解明することは、今まさに求められている領域研究課題であるといえる。今まで動物と植物の研究者が一堂に会して成果発表や討論できる場がなかった。従って、本領域研究の創成により、今まで世界をリードしてきた本邦の動物と植物の研究者が、共同研究等を通して、この分野の研究を一層発展させることが期待される。この独創的な企画により、世界の研究を凌駕することができ、得られる成果は極めて大きい。

2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

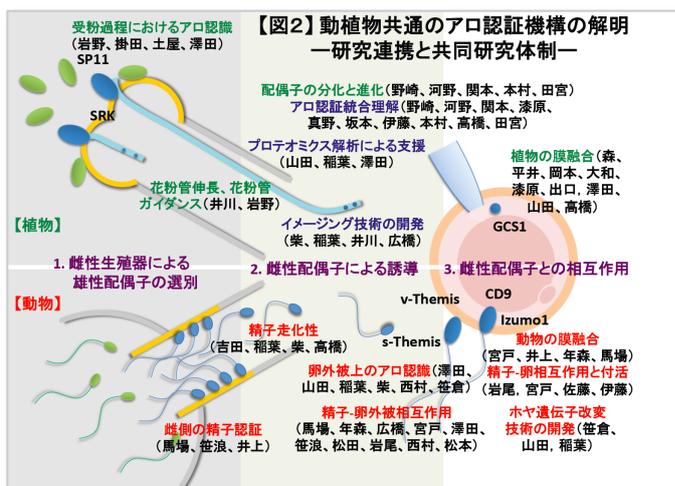
本領域の計画研究と公募研究の代表者・分担者と各研究課題に関しては、5ページにまとめた。今まで全く交流のなかった動物と植物の研究者間での意見交換や共同研究が本領域研究の創成により可能となった。ここでは、研究対象を4グループに分類し、共同研究や研究連携について、【図2】にまとめた。

(1) アロ認識機構：受粉過程におけるアロ認識、雌側の精子認証、卵外被上のアロ認識

(2) 配偶子接近・相互認識機構：花粉管伸長、花粉管ガイダンス、精子走化性

(3) 細胞接着・膜融合機構：植物の膜融合、動物の膜融合、精子卵外被相互作用、精子-卵相互作用と付活

(4) 新技術開発とアロ認識統合理解：配偶子の分化と進化、アロ認識統合理解、プロテオミクス解析による支援、イメージング技術の開発、ホヤ遺伝子改変技術の開発



具体的な共同研究のテーマに関しては以下の通りである。

(1) アロ認識機構（共同研究25件）

- ① 澤田、稲葉、柴、山田：カタユウレイボヤ精子のアロ認識シグナル（論文発表済）
- ② 澤田、山田：ホヤ受精における自家不和合性の分子メカニズム（学会発表済）
- ③ 澤田、笹倉、山田：遺伝子改変ホヤを用いた自家不和合性因子の解析（学会発表済）
- ④ 澤田、出口、山田、森：ネマトステラ精子GCS1の発現と受精における役割（学会発表済）
- ⑤ 澤田、出口、山田、森：タマクラゲ精子GCS1の受精における機能解析（領域会議発表済）
- ⑥ 澤田、出口：前口動物の受精における精子プロテアソームの機能解析
- ⑦ 澤田、松田：昆虫細胞を用いたホヤ配偶子タンパク質の発現と機能解析
- ⑧ 澤田、山田、松本：マボヤゲノム情報を利用したアロ認識機構の解析
- ⑨ 澤田、岩野：動植物共通のアロ認識機構に関する研究（英文総説発表済）
- ⑩ 澤田、岩野、掛田、土屋、山田：動植物共通の自家不和合性機構に関する研究
- ⑪ 岩野、掛田：植物の自家不和合性に関わる因子の解析
- ⑫ 岩野、佐藤：アブラナ科植物乳頭細胞の生化学的解析
- ⑬ 岩尾、岩野：アブラナ科植物自家不和合性の電気生理学的解析
- ⑭ 掛田、土屋：自家不和合性候補遺伝子を導入した形質転換植物の作出
- ⑮ 掛田、澤田、山田：植物の自家不和合性に関わる細胞膜タンパク質のプロテオーム解析（学会発表済）
- ⑯ 土屋、岩野：胞子体型自家不和合性を制御する因子の解析
- ⑰ 松本、澤田：マボヤゲノム構造の解析とアロ認識研究への応用
- ⑱ 松本、澤田：マボヤ卵・精子における自己マーカ分子の機能解析
- ⑲ 松本、稲葉：ホヤ血球反応における自家不和合性の分子メカニズム
- ⑳ 松本、柴：ヒトデ精子運動性の解析
- ㉑ 山田、澤田：マボヤゲノム構造の解析と受精研究への応用
- ㉒ 稲葉、笹倉、柴、澤田：カタユウレイホヤ近交系における自家受精機構
- ㉓ 澤田、漆原、山田：細胞性粘菌のアロ認識機構に関する研究（論文発表済）
- ㉔ 澤田、河野、山田：藻類のアロ認識機構に関する研究
- ㉕ 澤田、平井、山田：マラリア原虫のGCS1と配偶子融合因子の解析

(2) 配偶子接近・相互認識機構（共同研究23件）

- ① 稲葉、柴、本村：褐藻配偶子の遊泳と受精過程の解析
- ② 稲葉、柴、出口：クラゲ精子の神経ペプチドに対する運動解析
- ③ 馬場、宮戸、井上：遺伝子欠損マウスを用いた解析
- ④ 馬場、宮戸：遺伝子欠損マウスを用いた精子セリンプロテアーゼの機能解析（論文発表済）
- ⑤ 馬場、澤田：精子プロテアソームの構造と受精における役割（学会発表済）
- ⑥ 馬場、山田、澤田：受精に関わる因子の解析
- ⑦ 井川、山田、森：被子植物新規受精因子の探索
- ⑧ 漆原、山田、澤田：細胞性粘菌の細胞融合に関わる因子のプロテオーム解析（論文発表済）
- ⑨ 笹浪、稲葉、柴：ウズラ精子貯蔵管に含まれる精子の運動調節因子の解析（論文発表済）
- ⑩ 関本、野崎：ホモタリクなヒメミカツキモの有性生殖過程と系統解析（論文発表済）

- ⑪ 関本、野崎：二次共生緑色真核生物（ユウグレナ、クロロラクニオン藻）のphosphoriburokinase 遺伝子を用いた系統解析（論文発表済）
- ⑫ 関本、野崎：ホモタリックなヒメミカヅキモにおける性の発見（論文発表済）
- ⑬ 関本、澤田、山田：ヒメミカヅキモの有性生殖過程に及ぼすレクチン結合タンパク質の解析
- ⑭ 野崎、関本：群体性ボルボックス目の性染色体領域遺伝子の多様性と進化（論文発表済）
- ⑮ 野崎、森：ゴニウムの同型配偶子を用いた細胞接着の分子メカニズムの解析
- ⑯ 野崎、山田、澤田：ゴニウムの整合突起の両性比較プロテオーム解析実行中
- ⑰ 松田、広橋：ニワトリ精子の卵膜通過機構の解析
- ⑱ 松田、笹浪：ニワトリ精子プロテアーゼの卵膜ZP糖タンパク質の認識特異性解析
- ⑲ 吉田、稲葉：ホヤ精子走化性物質受容体の単離（学会発表済）
- ⑳ 吉田、宮戸：哺乳類精嚢腺タンパク質の機能解析（論文発表済）
- ㉑ 吉田、柴：精子運動の調節機構（論文発表済）
- ㉒ 吉田、松本：ヒトデ精子の先体反応機構
- ㉓ 宮戸、吉田：雄副生殖器官の生殖能における役割

（3）細胞接着・膜融合機構（共同研究28件）

- ① 岩野、井川、森：植物受精過程の電子線トモグラフィー解析
- ② 宮戸、伊藤、年森：受精後のカルシウム波伝達機構の解明：PLCzeta 欠損マウスの解析（学会発表済）
- ③ 宮戸、井上：CD9 を介した融合機構の解析
- ④ 宮戸、井上：哺乳類精子卵融合機構の解析
- ⑤ 宮戸、岩尾：脊椎動物の卵付活分子の普遍性について（学会発表済）
- ⑥ 馬場、宮戸：精子セリンプロテアーゼの機能解析（論文発表済）
- ⑦ 井上、馬場、宮戸：遺伝子欠損マウスを用いた解析
- ⑧ 井上、山田：精子上のパルミトイル化タンパク質のプロテオーム解析
- ⑨ 井上、岩尾、佐藤：両生類のIZUM01の同定
- ⑩ 井上、笹浪：鳥類のIZUM01の探索
- ⑪ 岡本、宮戸：サンゴの受精機構の解析
- ⑫ 岡本、井川、森：植物受精における配偶子膜と細胞骨格の動態解（論文発表済）
- ⑬ 森、平井：GCS1 の分子機能ドメインの同定（論文発表済）
- ⑭ 森、井川、田宮：シロイヌナズナ新規配偶子融合因子の解析（論文発表済）
- ⑮ 佐藤、澤田、山田：配偶子タンパク質のLC/MS/MS 解析による同定（学会発表済）
- ⑯ 佐藤、岩尾：カエル卵の付活に関わる因子の解析
- ⑰ 出口、広橋：FRET センサーを用いた配偶子成熟および受精機構の解析
- ⑱ 年森、宮戸：Equatorin-EGFP トランスジェニックマウスを用いた先体反応と配偶子膜融合の解析
- ⑲ 年森、宮戸：CD9-EGFP トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを用いた先体反応と配偶子膜融合の解析
- ⑳ 平井、岡本：マラリア原虫とイネの受精に関わるメス側受精因子の解析
- ㉑ 平井、森：マラリア原虫とシロイヌナズナの受精に関わるメス側受精因子の解析
- ㉒ 平井、山田、澤田：マラリア原虫細胞膜タンパク質のプロテオーム解析
- ㉓ 大和、澤田、山田、森：ゼニゴケ精子におけるGCS1 の発現と受精における役割
- ㉔ 大和、稲葉：精子鞭毛制御に関わる動植物の共通因子の探索
- ㉕ 大和、澤田、山田：ゼニゴケ精子タンパク質のプロテオーム解析
- ㉖ 井川、山田、森：被子植物新規受精因子の探索
- ㉗ 森、岡本、井川：イネ卵化転写因子の同定とそれを利用した雌性配偶子受精因子の探索
- ㉘ 森、山田、澤田：ユリ雄性配偶子膜のプロテオーム解析

（4）新技術開発とアロ認証統合理解（共同研究14件）

- ① 稲葉、澤田、山田：カタユウレイボヤ精子raft タンパク質のプロテオーム解析（学会発表済）
- ② 稲葉、馬場：ホヤから発見された走化性シグナル因子カラクシンの機構解析
- ③ 笹倉、山田、澤田：受精に影響ある遺伝子改変カタユウレイボヤの作出
- ④ 笹倉、山田、澤田：カタユウレイボヤのs/v-Themisのゲノム編集解析（領域会議発表済）
- ⑤ 河野、澤田、山田、森：藻類の同形配偶子融合におけるGCS1の役割
- ⑥ 広橋、柴：生殖行動に適応したヤリイカの精子2型（論文発表済）
- ⑦ 広橋、山田、澤田：ヤリイカ精子の2型間で見られるタンパク質のオミクス解析（論文発表済）
- ⑧ 広橋、柴、稲葉：ヤリイカの精子集合の運動性解析（論文発表済）
- ⑨ 広橋、漆原：細胞性粘菌を用いた化学走性と化学運動性の解析
- ⑩ 真野、坂本：配偶子認識過程におけるペルオキシソームの可視化
- ⑪ 真野、坂本：花粉特異的DPD1ヌクレアーゼの発現抑制系構築
- ⑫ 稲葉、大和、柴：ゼニゴケ鞭毛成分の解析とホヤ鞭毛との比較
- ⑬ 笹倉、澤田、山田：カタユウレイボヤにおけるZinc finger nucleaseを用いた遺伝子改変技術の開発（論文発表済）
- ⑭ 平井、笹倉：原生物の遺伝子ノックアウト解析

【表1】 計画研究代表者・分担者、公募研究代表者と研究課題

	氏名	所属	研究課題	年度 (平成)
計画	澤田 均	名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所	原索動物ホヤ類におけるアロ認識機構の解明	21-25
	岩野 恵	奈良先端科学技術大学院大学大学院 バイオサイエンス研究科	アブラナ科植物におけるアロ認識機構の解明	21-25
	稲葉一男 笹倉靖徳 (分担者)	筑波大学生命環境科学研究科	アロ認識研究のための次世代技術の開発と活用	21-25
	馬場 忠	筑波大学大学院生命環境科学研究科	哺乳類の雌性生殖器における精子認証機構の解明	21-25
	宮戸健二 井上直和 (分担者)	国立成育医療センター研究所 生殖・細胞医療研究部	哺乳類における配偶子融合の分子認証機構の解明	21-25
	岡本龍史	首都大学東京大学院理工学研究科	被子植物における配偶子融合の分子認証機構の解明	21-25
	森 稔幸	早稲田大学 高等研究所	植物と動物の配偶子融合における中核機構の解明	21-25
公募	岩尾康宏	山口大学大学院医学系研究科	両生類の受精における卵付活と多精防止の分子機構の解明	22-25
	漆原秀子	筑波大学生命環境	細胞性粘菌におけるアロ認識機構の解明	22-25
	掛田克行	三重大学大学院生物資源学研究科	イネ科植物におけるアロ認識機構の解明	22-25
	笹浪知宏	静岡大学農学部応用生物化学科	鳥類の輸卵管における cryptic female choice による精子選抜	22-25
	佐藤賢一	京都産業大学総合生命科学部生命 システム学科	細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構	22-25
	関本弘之	日本女子大学理学部	ヒメミカヅキモの異性細胞間認識、融合機構の分子生理学的解析	22-25
	年森清隆	千葉大学大学院医学研究院	精子膜に起こる配偶子認識と融合に関する超微形態および分子レベルの解明	22-25
	野崎久義	東京大学大学院理学系研究科	接合突起の比較プロテオミクスによる同型配偶子の接着と融合	22-25
	平井 誠	群馬大学大学院医学系研究科	マラリア原虫 GCS1 を基盤とした受精メカニズムの解明	22-25
	広橋教貴	島根大学生物資源科学部附属 生物資源教育研究センター-隠岐臨海実験所	精子ナビゲーション戦略の分子機構の解明	22-25
	大和勝幸	近畿大学 生物理工学部生物工学科	ゼニゴケ精子特異的膜タンパク質の受精における役割	22-25
	吉田 学	東京大学 大学院理学系研究科附属臨海実験所	精子誘引物質を介する卵と精子の遠隔分子認証システムの解明	22-25
	井川智子	千葉大学大学院園芸学研究科 植物細胞工学研究室	重複受精ライブイメージングによる配偶子融合ダイナミクスの解明	22-23
	伊藤昌彦	浜松医科大学医学部医学科	哺乳類卵子における精子核認証機構の解明	22-23
	河野重行	東京大学大学院新領域創成科学研究科	ヒラアオノリに見る藻類におけるアロ認識機構と雌雄非対称性の進化	22-23
	坂本 亘	岡山大学 資源植物科学研究所	植物のアロ認証に伴う雄側ミトコンドリアの排除とゲノム分解システムの普遍性	22-23
	柴 小菊	筑波大学下田臨海実験センター	卵因子が制御する精子細胞内シグナルの可視化	22-23
	土屋 亨	三重大学生命科学研究支援センター 植物機能ゲノミクス部門	サツマイモ野生種の自家不和合性における自己認識分子機構の解明	22-23
	出口竜作	宮城教育大学教育学部理科教育講座	刺胞動物卵における精子受容部位の形成・消失機構の解明	22-23
	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学研究科	ニワトリ卵・精子相互作用における卵ZPタンパク質と精子CED1ホモログの役割	22-23
	松本 緑	慶應義塾大学理工学部生命情報学科	受精と免疫におけるアロ認識機構の共通基盤の解明	22-23
	真野昌二	基礎生物学研究所高次細胞機構研究部門	植物生殖機構におけるペルオキシソーム機能・形成の時空間ダイナミクス制御	22-23
	山田力志	名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所	原索動物ホヤ類におけるアロ認識機構とその分子進化の解明	22-23
	西村 仁	摂南大学工学部生命科学科	線虫と哺乳類に共通するアロ認識機構の解析	24-25
	高橋美智子	宇都宮大学農学部生物生産科学科	植物の配偶子融合および受精卵分裂過程における金属元素制御機構の解明	24-25
	田宮 元	東北大学	アロ認証関連遺伝子の進化遺伝学的解析	24-25
	本村泰三	北海道大学北方生物圏フィールド 科学センター一室	褐藻の同型配偶子接合におけるアロ認証～形態学的同型性と生理学的異型性～	24-25

3. 研究領域の設定目的の達成度（3ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

本領域研究を4項目に分類し、設定目的と達成度を記す。

(1) アロ認識機構（図3参照）

【設定目的】

<ホヤ>雌雄同体のカタユレイボヤに関しては、精子が卵黄膜に結合する段階で自己非自己認識（アロ認識）が行われ、自己と認識されると卵黄膜から離脱して受精が回避される。領域代表は、順遺伝学的な手法と卵黄膜プロテオーム解析により、第2染色体の遺伝子ペア（精子側 *s-Themis-A* と卵側 *v-Themis-A*）と第7染色体の遺伝子ペア（精子側 *s-Themis-B* と卵側 *v-Themis-B*）が自家不和合性に関わることを明らかにした。そこで本研究では、*s/v-Themis* のタンパク質としての存在証明とアレル特異的なタンパク質間相互作用の解析、*s/v-Themis* の機能解析、各アレルの多型解析、細胞内シグナル伝達機構の解析に焦点を絞って解析する（澤田、稲葉、柴、笹倉）。

マボヤでは、精子卵相互作用に加えて、血球間においても自己・非自己認識反応（contact reaction; 接触反応）を起こす。この接触反応と受精におけるアロ認識機構が同一原理に基づくか否かも解析する（松本、澤田）。

<アブラナ>アブラナ科植物におけるアロ認識機構の研究では、今までアブラナを用いて行われてきたが、遺伝子改変等の手法が活用出来ない点に問題があった。そこで本研究では、シロイヌナズナに材料を変更し、分子細胞生物学的研究を行う（岩野）。シロイヌナズナは自家和合種であるが、それに自家不和合性遺伝子を導入すると自家不和合モデル植物を作出できる。これを用いて、自家・他家受粉時の Ca^{2+} イメージングを行う。またそのシグナル伝達機構に関して、ホヤにおけるアロ認識機構との共通性という視点から解析を進める（岩野、澤田）。

<オオムギ>オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*) は、独立二遺伝子座 (*S* および *Z*) 支配の自家不和合性を示す点で、カタユレイボヤのアロ認識機構と似ている。本研究では、このアロ認識特異性決定因子の一つで、雌ずい側 *S* 遺伝子の有力候補 *HPS10* が真のアロ認識分子であるか否かを明らかにする（掛田、岩野）。

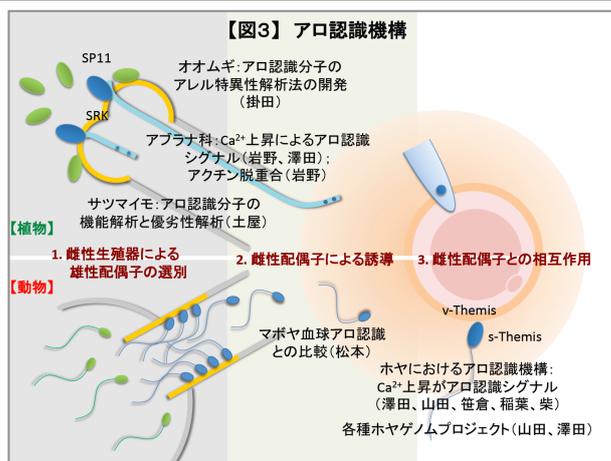
<サツマイモ>サツマイモ野生種 (*Ipomoea trifida*) のアロ認識に関わる *S* 遺伝子の候補分子を探索し、それが真にアロ認識に関わるか解析する（土屋、掛田、岩野）。

【達成度】当初の研究計画に従って実験を行い、ほぼ目標を達成した。

<ホヤ>カタユレイボヤでは、*s/v-Themis-A2* と *s/v-Themis-B2* と命名した新規遺伝子が存在することが判明した。*s/v-Themis-A2* は偽遺伝子であったが、*s/v-Themis-B2* は機能していることが判明した。*s/v-Themis-B2* も多型に富み、*v-Themis-B2* は卵黄膜に存在している。遺伝学解析から、カタユレイボヤでは、*s/v-Themis-A, B, B2* の三者が確かに自家不和合性に関わることを示された（山田、澤田：学会発表）。さらに、TALENにより遺伝子破壊実験を行ったところ、厳格な自家不和合性が解除され自家受精するようになるという画期的な結果も得られた（澤田、山田、笹倉：領域会議発表）。多型解析も行い、共進化していることが示唆された。一方、*s-Themis* の発現に関しては、膜結合性が高く、SDS-PAGE を利用するプロテオーム解析で同定できなかったが、免疫染色により精子先端と尾部に存在することが確認された。*s-Themis-B/B2* の C 末端にはカチオンチャンネルドメインが存在する。そこで Ca^{2+} が自己認識シグナルになっている可能性を検討した。その結果、精子は自己の卵黄膜に結合すると急激な Ca^{2+} 流入が起こり、卵黄膜から離脱するか運動性を停止させることが示された（PNAS, 2012）。アレル特異的タンパク質相互作用解析も検討したが、多型領域だけでは相互作用するのに十分ではないのか、タンパク質レベルでの特異的相互作用にはさらなる検討が必要であることが示された。*s/v-Themis* のオルソログは、ユレイボヤやマボヤにも存在することが示唆された。精子側の CRISP タンパク質 CiUrabn（澤田：Mol.Reprod. Dev., 2011）や、多型のない *v-Themis-like*（山田、澤田：Mol.Reprod. Dev., 2013）も自家不和合性に関わることを示唆された。マボヤを材料として、自己と非自己間で差がある膜タンパク質を探索し、無脊椎動物に広く存在する分子量 100 kDa、pI 7.0 付近のタンパク質群(HrSMLPs)を発見した。

<アブラナ>シロイヌナズナに自家不和合性遺伝子を導入した自家不和合モデル植物を作出し、自家・他家受粉時の Ca^{2+} イメージングを行った。その結果、乳頭細胞における自家受粉時特異的な細胞内 Ca^{2+} 上昇を見出し、さらに乳頭細胞プロトプラストを用いた系で、この上昇が花粉側不和合因子 SP11 単独で誘起され、SRK のキナーゼ活性依存的であることを明らかにした（岩野：学会発表）。この情報には細胞外からの、グルタミン酸受容体を介した Ca^{2+} 流入が必須であることも判明した。一方で、和合受粉時特異的に乳頭細胞から Ca^{2+} 流出がおこること、それに Ca^{2+} ATPase13 が関与することも明らかにした。不和合受粉時には Ca^{2+} 流出を抑制し Ca^{2+} 流入を誘導する機構が存在することが示唆された。被子植物やホヤのアロ認識反応との共通性についても英文総説にまとめた（BBRC, 2014）。

<オオムギ>雌ずい側 *S* 遺伝子の有力候補 *HPS10* が真のアロ認識分子であることを証明する実験系を開発した。こ



の *in vitro* 花粉培養系を用い、HPS10 タンパク質が *S* ハプロタイプ特異的な花粉発芽阻害効果をもつことを証明した。本研究により HPS10 がオオムギ野生種の雌性 *S* 決定因子と同定された (掛田、岩野：学会発表)。さらに、未知の雌性 *S* 因子の同定に向け、花粉のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った (掛田、山田、澤田：学会発表)。このアプローチにより、*S* ハプロタイプ特異的に発現する花粉発現配列を取得するとともに、HPS10 遺伝子周辺のゲノム領域上に新規な花粉発現遺伝子のあることを明らかにした (掛田、山田、澤田：学会発表)。

<サツマイモ> アロ認識に関わる *S* 遺伝子の候補として、AB2 (花粉側)、SE2・SEA (柱頭側) の遺伝子を同定し、これらが真の *S* 遺伝子であるか否かについて検討した。AB2 タンパク質の部分配列を元に合成したペプチドを受粉時に供するアッセイにより、AB2 タンパク質の特定のペプチド領域が *S* ハプロタイプ特異的に自他認識に関与し、供する AB2 ペプチドと処理した柱頭の *S* ハプロタイプが同一である場合に限り、自家および他家の花粉発芽を抑制することを確認した (土屋：学会発表)。

(2) 配偶子接近・相互認識機構 (図4参照)

【設定目的】

<ホヤ> 海産動物の場合、海水に放出された精子と卵が出会うためには、卵からの精子走化性因子が不可欠である。カタユレイボヤでは、硫酸化ステロイドが精子走化性因子 (SAAF) であることが報告されている (吉田)。本領域内共同研究では、この SAAF 受容体の同定を目的として設定した (吉田、稲葉)

<哺乳類> 卵管まで進入した精子の受精能は高いこと、精漿には精子の受精能を抑制する働きがあることは知られていたが、メス生殖器内での精子受精能調節機構は不明であった。本研究では、その調節因子の探索を目的とした (宮戸、吉田)。哺乳類においては、KO マウスを用いた機能解析から、精子 ADAM3 が精子の卵外被 (透明帯) への結合に必須であると考えられている。一方、この *Adam3* 遺伝子を破壊したマウスでは、精子運動性は正常であるが、精子が子宮から子宮卵管結合部へ進入することができない。雌性生殖器でどのような分子が精子認証を行っているかを解明することを目的とした (馬場)。馬場は、精子の卵透明帯通過にアクロシンが必須ではないが、先体内容物の分散に関与することを報告している。今回、アクロシンとそれ以外の精子トリプシン様酵素 (PRSS21) の機能解明を目標とした (馬場)。

<新口動物共通> 精子プロテアソームが哺乳類やホヤの受精時にライシンとして機能しているが、その細胞外輸送機構は不明であり、その手がかりをつかむことを目的とした (澤田)。

<鳥類> ニワトリやウズラなどの鳥類では、雌性生殖器内に侵入した精子を長期間生存させるための精子貯蔵管 (SST) が、卵管の子宮腔移行部および漏斗部に存在する。このため、一度交尾や人工授精を行うと、数ヶ月受精卵を産み続けることは古くから知られているが、分子機構は不明である。本研究では、SST における貯精の分子機構の解明を目標とした (笹浪)。哺乳類および鳥類の卵は透明帯で被われている。これは精子受容体活性を有する ZP3 等の糖タンパク質から構成されている。今回、N 結合型糖鎖の少ない鳥類 ZP3 の立体構造の解明を目指した (松田)。

<粘菌> 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の有性生殖様式は主として他家接合で、type-I, type-II, type-III の3種類の交配型が知られている。それぞれ自分とは異なる交配型の配偶子とのみ融合して接合子を形成する。これまでに有性生殖関連遺伝子として細胞融合能を失った変異体の原因遺伝子 *macA* と交配型特異的な配列 *matA* が type-I で同定されているが、いずれの産物も細胞の識別には関わっていないと推測されている。これらを手掛かりとし、領域内共同研究でプロテオーム解析を行い、*D. discoideum* の自己認識分子の解明を目指した (漆原、山田、澤田)。

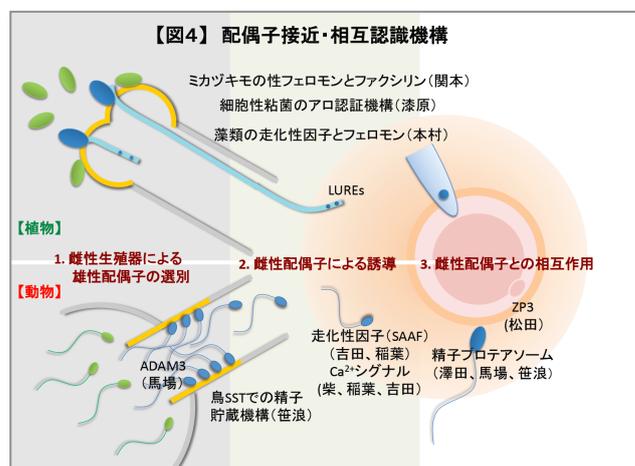
<下等植物> 関本は、単細胞接合藻類ヒメミカヅキモの性特異的遺伝子に関する研究の一環として、性フェロモンとその結合パートナー候補分子ファクシリン1 (FAS1) の、有性生殖における機能解明を目指した (関本、野崎)。

<藻類> 陸上植物をはじめとしたストレプトファイツでは、性決定遺伝子が未だに同定されていない。褐藻はストラメノパイル系統群・不等毛植物門に属しており、配偶子は前後に伸びる2本の異質鞭毛を有する。そこで本研究では、褐藻2本鞭毛を単離し、質量分析により鞭毛タンパク質の同定を試みる (本村)。また、走化性における雌性配偶子の鞭毛運動についても解析する (本村、稲葉、柴)。

【達成度】 当初の研究計画に従って実験を行い、ほぼ目標を達成した。

<ホヤ> カタユレイボヤでは、精子原形質膜に存在する $Ca^{2+}/ATPase$ (PMCA3) が SAAF 受容体であることを明らかにした (吉田、稲葉：領域会議発表)。この遺伝子 *CiPMCA* は、哺乳類 *PMCA* と相同性が高く、少なくとも2つの splicing variants がある。そのうちの精子で高発現している variant を同定した。*CiPMCA* が SAAF と相互作用することや、PMCA 阻害剤がカタユレイボヤ精子走化性を顕著に阻害することから、PMCA が実際に精子走化性時に働く SAAF 受容体であることを明らかにした (吉田、稲葉)。

<哺乳類> 精囊から分泌される精漿タンパク質 (SVS2) を欠損したオスマウスを用いて、交尾後のメス生殖器内での精子の挙動を詳細に調べた。その結果、子宮には精子の受精能を高める働きはなく、逆に精子を殺して排除する働きがあること、SVS2 は精子の細胞膜を保護することで子宮の殺精子作用から精子を保護し、卵管へ精子を送り届



ける作用があることが明らかになった。即ち、メスとオスによる精子への攻撃と防御のバランスが子宮内での競争的な精子選抜を引き起こし、これによって選ばれた精子が卵管で待つ卵と受精可能となる仕組みがあると考えられ、この結果は子宮と精漿の役割に関するこれまでの知見を覆すものである（吉田、宮戸: PNAS, 2014）。Adam3 遺伝子を破壊したマウスでは、精子運動性は正常であるが、精子が子宮から子宮卵管結合部へ進入することができない。馬場はそれらの制御に関与する卵管因子を同定することに成功した（馬場）。また、体外受精で機能不全が見いだされた各種ノックアウトマウス精子でも、生体内では野生型と同様に、雌性生殖器を移動し卵管膨大部到達の手前で先体反応が起こることも明らかにした（馬場）。馬場は、アクロシンとそれ以外の精子トリプシン様酵素（PRSS21）のダブルノックアウトマウスを作成し、機能解析を行った。このマウスでは、*in vitro* の受精は阻害されるが、*in vivo* の受精では補償効果が働き不妊にはならないことが判明した。したがって、これらの酵素は受精に関与するが必須ではないと結論した（馬場、宮戸ほか: Biol. Reprod., 2010）。

<新口動物共通>精子プロテアソームの受精における役割に関しては、領域代表が世界に先駆けてマボヤで報告し、その後ホヤのみならず哺乳類や鳥類でも受精時に精子プロテアソームが機能することが報告され、共通機構としての理解が深まった（澤田、馬場、笹浪（ウズラ精子プロテアソーム研究: Reprod., 2012））。本研究では、マウス精子プロテアソームでは、PSMA7 サブユニットが PSMA8 サブユニット（精子特異的なプロテアソーム α サブユニット）に置き換わっていることを見出した（馬場、澤田: 学会発表）。マボヤでは、精子プロテアソームが精子細胞外に輸送されると考えられるが、その細胞外輸送シグナルは不明である。そこで、精子プロテアソームに特異的なサブユニットを比較検討した結果、PSMA1/ α 6 サブユニットの C 末端 16 残基が、精子特異的に切り落とされていることを見出した（澤田: BBRC, 2011）。今後は、その生理的意義について解析する。一方、精子ユビキチン化酵素は精子形成や受精時に機能する可能性が考えられる。今回、カタユウレイボヤ精子に特異的に発現するユビキチン結合酵素 E2 を同定し、性状解析を行った（澤田: Mol. Reprod. Dev., 2010）。

<鳥類>ウズラを交尾させると、精子は交尾後 1 時間以内に SST に侵入するが、死滅精子を人工授精しても SST 内に精子は観察されない。このことは、SST に生存精子を選択的に受入れる機構が存在することを示唆している。また、生体内では SST が積極的に精子の運動性を低下させることも示唆された。交尾後 1 時間に排卵ホルモンであるプロゲステロン(P4)をウズラの静脈内に投与すると、SST からの精子の放出が観察された。さらに、SST からの精子の放出は排卵周期と同調していることも判明した。P4 の膜受容体(mPR)が子宮腔移行部および精子に発現していることから、P4 が mPR を介して精子の放出シグナルとして働いていると考えられる（笹浪: Endocrinol., 2011）。

N 結合型糖鎖の少ない鳥類精子受容体 ZP3 の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を解明した（松田: Cell, 2010）。

<粘菌>プロテオーム解析により、2 種類の GCS1 ホモログ（Hap2, MrhA）が交配型特異的に発現していることが見出された（漆原、山田、澤田: Eukaryot. Cell, 2012）。2 遺伝子の破壊株を 3 種類の交配型で作製して機能解析を行ったところ、両遺伝子ともに type-I と type-II では接合子形成に必須だが type-III では有性生殖過程に影響がないことが示され、アメーボゾアにおいても GCS1 が性特異的に有性生殖に重要な役割を果たしていることがわかった。MrhA は GCS1 モチーフ領域のみで Hap2 に類似しており、細胞性粘菌の系譜でよく保存されているにもかかわらず他の生物では見出されないことから、同系譜のごく初期に GCS1 モチーフが重複して形成されたと考えられる。type-I/II と type-III のアロ認証には GCS1 とそのレセプターが、type-I と type-II のアロ認証には別分子が機能していると考えられるが、後者の機能にも GCS1 が必要である。Hap2 と MrhA は互いに相補しないことからも、これらの分子は複合体を形成するなど密接に関係して機能していると推察される（漆原、山田）。

<下等植物>関本は、ヒメミカヅキモの性フェロモンとその結合パートナー候補分子ファクシリン 1（FAS1）に焦点を絞り、有性生殖過程における機能解析を行った。FAS1 ドメインを有する遺伝子群の発現を解析したところ、CpFAS1 と CpFAS3 が有性生殖特異的に発現することが確認された。また、性フェロモンとの結合も、酵母での発現系で確認された。本 FAS ファミリーの分子系統樹を作成して解析したところ、発現解析の結果と一致して、有性生殖時期に発現する FAS1 と FAS3 は同一クレードに分類されることが示された（関本）。また、ヒメミカヅキモの有性生殖時に、+型細胞特異的に発現する受容体型キナーゼ（CpRLK1）について、antisense RNA により発現を抑制したところ、多くの株で性生殖過程の進行が遅れる傾向が見られ、そのうち 2 株ではほぼ完全にペア形成段階で停止した。CpRLK1 タンパク質はペア形成している一方の細胞の接合突起に局在しており、有性生殖過程の進行に際し、細胞壁の状態をモニターし、接合突起の伸長、プロトプラストの放出を制御していることも示唆された。さらに 2 種の交配型ゲノム配列と transcriptome データを精査し、-型細胞ゲノムのみが存在し、転写因子をコードする CpMinus1 遺伝子を見出した。この遺伝子を+型細胞に導入したところ、程度の差はあるものの-型としての性表現を示すようになり、この遺伝子が性の決定に関わる可能性が示唆された（関本）。

<藻類>褐藻 2 本鞭毛を単離し、質量解析を行ったところ、495 個の鞭毛タンパク質を同定することができた（本村）。さらに前後鞭毛に特異的に存在するタンパク質を同定することに成功した。その中に、海水中において走光性に関連すると考えられる新規青色光受容体タンパク質を発見した（本村）。また、雌性配偶子からの性フェロモンに対する雄性配偶子の反応について、共同研究を行った（本村、稲葉、柴）。

（3）細胞接着・膜融合機構（図 5 参照）

【設定目的】

<哺乳類>精子と卵の細胞膜の接着に関わる分子を同定することを目標とした（宮戸）。また、CD9 の機能を解明することを目的とした（宮戸）。Izumo1 に関しては、その局在性変化と活性部位を明らかにすることを目的とした（井

上)。Equatorin に関しては、その詳細な機能を明らかにすることを目的とした (年森、宮戸、井上)。受精に関わる精子が先体反応を引き起こすタイミングをライブイメージング技術により明らかにすることを目標として設定した (広橋：図6も参照)。

<高等植物> イネ単離配偶子を材料として、*in vitro* 受精系、1細胞分子生物学、高感度オーム解析、レーザーマイクロインジェクションによる配偶子操作などの手法を駆使し、植物における配偶子認識および膜融合過程の分子基盤を明らかにすることを目的とした (岡本)。また、イネ卵細胞への重金属の影響も解明する (高橋)。GCS1 はテッポウユリで最初に発見された膜融合因子であるが、植物のみならず動物にもその遺伝子が存在し、動植物共通の膜融合機構として興味をもたれる。本研究では、まず、GCS1 の機能部位を明らかにすることを第一目的とした (森)。

また、マラリア原虫の有性生殖にも GCS1 が真に機能するか否かを明らかにすることも目標として設定した (森、平井)。

<下等植物> ゼニコケやゴニウムにおける GCS1 の機能を明らかにすることも目的とした (大和、野崎)。これらの解析は、本領域の中心課題でもある、GCS1 の動植物共通の膜融合機構を探る上で、極めて重要な課題である。

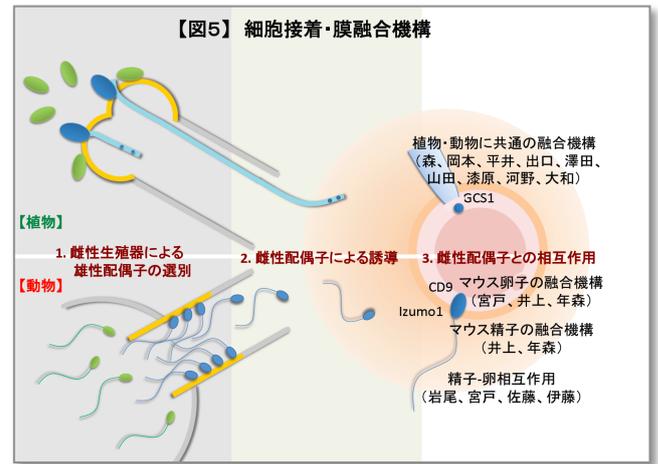
<刺胞動物> GCS1 は刺胞動物にも存在することが知られているが、精子に発現しているか否か、また真に受精や配偶子膜融合に機能しているかは不明である。それらの点を明確にすることを目的とした (森、澤田、出口)。

<両生類> 卵細胞膜マイクロドメイン (MD) は配偶子認識に重要であることが知られているが、詳細な機能は不明である。これらの膜タンパク質のプロセッシングやリン酸化を介した卵の賦活の機構を解明することを目的として設定した (佐藤、岩尾、山田、澤田)。

【達成度】 当初の研究計画に従って実験を行い、ほぼ目標を達成した。

<哺乳類> 細胞接着因子である E-cadherin/ β -catenin 複合体について検討した結果、本複合体は接着前の精子と卵細胞膜に存在し、 β -catenin 欠損卵では、精子の結合能が低下すること、E-cadherin/ β -catenin 複合体は、卵では α -catenin に裏打ちされず、直接、アクチン繊維と結合していること、更に、精子が卵細胞膜に結合した直後、速やかに β -catenin が卵細胞膜から離れて分解され、融合への移行に関わっていることを明らかにした (関連論文：宮戸ほか：Sci. Rep., 2011; PLoS One, 2013)。配偶子融合については、CD9 を含む膜構造体である卵子エキソソームの構成成分を解析した結果、卵子エキソソームは卵細胞膜上での細胞膜の反転 (flip-flop) の結果として細胞膜成分の内側が露出する過程で形成されることを明らかにした。更に、卵子エキソソームの膜融合促進活性を担う因子として、タンパク質成分ではなく、ホスファチジルエタノールアミンの分子種が関与しており、飽和脂肪酸の 18 個の炭素鎖が融合促進活性に重要であることが明らかになった (宮戸、年森：領域会議発表)。更に、CD9 と同様の構造をもったテトラスパニンの 1 つで卵に発現している CD81 は CD9 とは異なる構造体の成分として卵の細胞外に放出され、CD9 の機能を補佐する役割があることを明らかにした (宮戸：Biol. Open, 2012)。融合を阻害する IZUMO1 に対する複数のモノクローナル抗体のエピトープ解析から、種間でよく保存され、かつ IZUMO1 に特異的な配列である、N 末端領域の融合コア領域を明らかにした。種々の物性解析の結果、この領域は α ヘリックス含量が非常に高く、2量体化を引き起こすことが明らかになった (井上：Development, 2013)。さらに IZUMO1 を発現することで培養細胞を卵子細胞膜に接着させることに成功した (井上：Development, 2013)。しかしこの系では双方の膜の融合は成立しない。このことから IZUMO1 を活性型へと転換する何らかの機構が融合を誘起するために必要であると考えられた。受精に関わる精子タンパク質 Equatorin が精子形成過程で先体に取り込まれる事を明らかにした (年森、宮戸：Cell Tissue Res., 2013)。またこの遺伝子 (EQT, MN9) に EGFP をつないだ遺伝子改変マウス (EQT-GFP-TG マウス) を作出して、ライブイメージング実験を行った。その結果、EQT の一部は先体反応過程で先体膜から離れるが、多くは残存して卵形質内に移動することがわかってきた (年森、宮戸：領域会議発表)。電顕等では固定した状態でしか観察できないのに対して、生細胞で解析出来る点で重要な実験である。EQTN ノックアウトマウスを作製して機能解析を行ったところ、EQTN が制御する精子と卵の膜融合があることがわかってきた (年森)。先体反応の起こる時期に関しても、トランスジェニックマウス精子を用いた解析が行われた (広橋)。マウスにおいては、精子は卵透明帯に結合後に先体反応を起こすと今まで信じられてきた。しかし、今回の広橋の実験により、卵丘細胞層を通過する際に先体反応を起こした精子のみが透明帯を通過でき、卵透明帯に結合後に先体反応を起こす精子は、受精できないことを示した。これは従来の定説を覆す重要な発見である (広橋：PNAS, 2011)。

<高等植物> イネ単離配偶子を材料として、*in vitro* 受精系、1細胞分子生物学、高感度オーム解析、レーザーマイクロインジェクションによる配偶子操作などの手法を駆使し、植物における配偶子認識および膜融合過程の分子基盤を明らかにするとともに、動植物の配偶子融合機構を統合的に理解することを目的として研究を進めた (岡本)。顕微鏡下で単離したイネ精細胞、卵細胞、受精卵それぞれ 3,000 細胞、30 細胞、30 細胞と、密度勾配遠心法による大量調製法を確立して単離した精細胞 30,000-60,000 細胞を用いたトランスクリプトーム解析を行った (岡本)。それ



に加えて、精細胞 120,000 細胞と卵細胞 300 細胞を用いたプロテオーム解析も行った (岡本)。また、イネ卵細胞への亜鉛欠乏の影響や亜鉛の細胞内局在、受精卵への亜鉛欠乏の影響をマイクロアレイや顕微鏡観察により解析した (高橋、岡本)。これらのオーム解析により、イネ雌性または雄性配偶子で特異的に発現する遺伝子・タンパク質群に加え、受精後に発現が誘導あるいは抑制される遺伝子群が網羅的に同定された。また、それら遺伝子への T-DNA またトランスポゾン挿入変異体のイネ種子を入手し、生殖または胚発生過程に異常がある可能性が高い変異体特定するとともに、当該遺伝子群のシロイヌナズナオルソログに対して変異をもつシロイヌナズナ変異体についても遺伝学的解析を進め、生殖あるいは胚発生・胚乳形成に関与すると推定される遺伝子を同定した (岡本: J Exp Bot 2013; PLoS One, 2013)。また、上記オーム解析で用いた微量試料解析法およびデータ解析手法は、領域内の共同研究 (大和、岡本; 平井、岡本) にも生かされている。動植物に共通な精子 (精細胞) の膜融合タンパク質として GCS1 が挙げられる (森)。今回、その機能ドメインの解析が進んだ。シロイヌナズナ GCS1 の部分配列を GFP の挿入によって分断・置換して、GCS1 破壊株に導入することで、その受精機能変化を解析した。その結果、GCS1 の C 末側 (細胞内領域) を破壊しても機能阻害は起こらないが、N 末側 (細胞外領域) を GFP で修飾したコンストラクトは GCS1 の機能を著しく阻害することが判明した。同様の傾向はマラリア原虫 GCS1 においても認められた。このことから GCS1 の機能ドメインは N 末側にのみ存在すること結論づけた (森、平井: PLoS ONE (2010))。一方、精細胞が正常に融合できない受精異常株のスクリーニングを行い、GCS1 とは異なる受精異常株 Y47 を検出することに成功した (森)。Y47 変異による受精異常は雄特異的に起こった。マッピングの結果、Y47 変異は機能未知の精細胞特異的遺伝子 GEX2 で検出された。GEX2 の詳細な発現解析を行ったところ、GEX2 タンパク質は GCS1 と同様に精細胞の表面に局在することが分かった。さらに、Y47 株における精細胞の表現型を新たに開発した胚の細胞分解法によって観察すると、精細胞は卵細胞に接着できないことが分かった。この成果は GEX2 が雌雄配偶子融合を安定化させる配偶子接着因子であることを示している (森、井川、田宮: Curr. Biol., 2014)。

<下等植物> 下等植物の配偶子膜融合にも GCS1 が関与しているのだろうか。今回、ゼニゴケ精子の EST 解析を行い、発現を確認したところ、確かに GCS1 がゼニゴケの造精器で発現してくることが確認された (大和)。なお、ゼニゴケにおいて GCS1 遺伝子は Y 染色体にコードされており、その受精における機能解析が今後の課題である。また、精子プロテオーム解析により、精子特異的なイオンチャネルなどの膜タンパク質が見つかった。これらの一部はコケ・シダなどの基部陸上植物や藻類、動物には存在するが、被子植物には見られなかった。従って、これらの膜タンパク質が精子の運動性や走化性に関与する可能性がある。さらに、塩基性アミノ酸に富むプロタミン様タンパク質遺伝子 MpPRM も見いだした。MpPRM 遺伝子に蛍光タンパク質 Citrine 遺伝子を融合 (PRMC) させて発現させたところ、精子において強い Citrine 蛍光が観察された。PRMC 精子の稔性は正常であるため、今後ゼニゴケ精子の受精時の挙動をリアルタイムで追跡することが容易になり、配偶子が融合した後の精子核の挙動の観察にも利用できると期待される。二つの性(プラス/マイナス)の間で配偶子のかたちに差異のない同型配偶の緑藻ゴニウム (*Gonium pectorale*) を用いて、GCS1 タンパク質がそれぞれの性で異なった制御を受けていることを明らかにした (野崎・森)。ゴニウムでは両性の配偶子は、活性化するとそれぞれ前方部に突起状の構造 (接合突起) を伸ばし、両性の接合突起が接着し融合することで接合が始まる。本研究の成果により、マイナス交配型 (雄に相当) 配偶子では、活性化前は GCS1 タンパク質が細胞の前方部 (接合突起の原基) に局在し、活性化されると接合突起の表面に移行することが分かった。これに対し、プラス交配型 (雌に相当) 配偶子では、活性化前は GCS1 タンパク質が細胞の内部に留まり、活性化に伴って消失することが分かった。これらの制御メカニズムにより、GCS1 はマイナス交配型特異的に働くことができると考えられる。このゴニウムで見出された GCS1 の挙動の性差は、真核生物における雌雄差の根源的性質である可能性もあり、今後の研究の進展が期待される。

<刺胞植物> 刺胞動物であるネマトステラやタマクラゲでは、ゲノム上は GCS1 の存在が確認されているが、実際に精子に存在するかは明らかになっていない。そこで今回、ネマトステラ GCS1 のクローニングと発現解析を行った (出口、澤田、山田、森)。その結果、ネマトステラでは精巢特異的に GCS1 が発現していること、また精子プロテオーム解析により、GCS1 が精子に確かに存在することが確認された (山田、出口、澤田)。従って、GCS1 が遺伝子上だけではなく、実際に動物 (刺胞動物) 精子にも発現していることが今回初めて確認されたことになる。これは、動植物研究者の共同研究なしには行えない研究成果である。

<両生類> 卵細胞膜マイクロドメイン (MD) は配偶子認識に重要であることが知られている。このマイクロドメインに局在する膜貫通型タンパク質ウロプラキシン III (以下、UPIII) は、両生類における精子受容体候補分子である。今回、UPIII を含む卵 MD 成分が精子と相互作用することにより精子内のプロテインキナーゼ依存的なシグナル伝達を作動させ、精子の受精能に貢献していることを示唆する結果を得た (佐藤)。また、UPIII の卵表面の発現状態が卵成熟前後で異なること、そして未成熟卵母細胞の MD 成分には前述の精子との相互作用能が備わっていないこと等を示唆する結果を得た (佐藤)。また、領域内共同研究により、卵 MD のプロテオーム解析が進み、受精によりチロシンリン酸化を受ける MD およびミトコンドリア局在性のタンパク質の同定に成功した (山田、澤田、佐藤)。アフリカツメガエル精子の卵への結合に、精子糖タンパク質 SGP が関与することが明らかにされているが、その相互作用タンパク質として今回マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP-2) が同定された。精子 MMP-2 と卵 GM1 が相互作用し、早い電氣的多精防止に機能していることを明らかにした (岩尾、佐藤)。膜融合後に卵内に導入されたイモリ精子ファクター (精子特異的クエン酸合成酵素) は、卵細胞質の微小管と結合し、IP-3 リセプターをもつ Ca^{2+} ストア (小胞体) と PLC γ を集積し Ca^{2+} シグナリングの中心となることを解明した (岩尾)。

(4) 新技術開発とアロ認証統合理解 (図6 参照)

【設定目標】

<新技術開発と解析支援> ホヤ精子の活性化や走化性に関わる分子を MALDI-TOF-MS 分析により解析することを目標として設定した (稲葉)。遺伝子改変ホヤの作出技術の開発を目指す (笹倉)。さらに、ゲノム変種過を利用して、遺伝子破壊技術の開発も行う (笹倉)。細胞膜透過性の Ca^{2+} 指示薬を用いて、細胞内の Ca^{2+} のライブイメージング技術の確立を目指した (柴、稲葉)。この技術は、ホヤのアロ認識シグナルの解析に活用されている (澤田、山田、柴、稲葉)。また、花粉管伸長やガイダンス機構の解析 (井川)、精子先体反応の解析 (広橋、年森、井上)、さらに受精時の膜の動態解析 (宮戸、年森) にも活用される。分子系統解析を詳細に行い、分子進化や、領域全体の分子系統解析を支援する (田宮)。

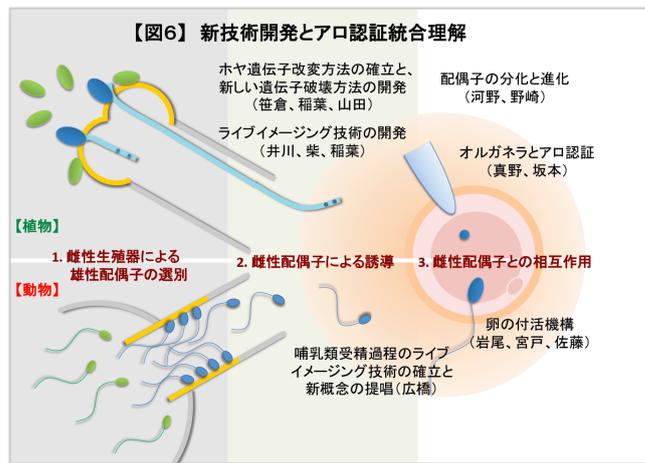
<アロ認証統合理解> 新技術開発に加えて、アロ認証統合理解という観点から、生殖細胞の分化や進化 (野崎)、さらに同形配偶子から異系配偶子への進化 (河野) などの研究も行う。アロ認証の基本原則を統合的に理解する上で重要であると考えからである。また、受精時における雄と雌の核の認証機構 (伊藤) やオルガネラの異常と生殖異常との関わり (真野、坂本)、さらに受精における雄性配偶子由来オルガネラの排除機構の解明も目指す。

【達成度】 当初の研究計画に従って実験を行い、ほぼ目標を達成した。

<新技術開発と解析支援> 領域全体のアロ認証関連分子は領域代表の研究室に設置された LC/MS/MS でプロテオーム解析が精力的に進められ、多くの領域内共同研究が成果を出した。また、ホヤ精子の活性化や走化性に関わる分子に関しては、MALDI-TOF-MS 分析によっても解析された (稲葉)。遺伝子改変ホヤの作出技術の開発も行った (笹倉)。カタユレイボヤにおいては、Minos トランスポゾンを用いたトランスジェニック技術を改良した。TALEN と名付けられた人工ヌクレアーゼをカタユレイボヤ胚に導入することによりゲノムへ欠失及び挿入変異を導入できる新しい方法が開発された (笹倉)。これによって Themis 遺伝子を破壊した機能欠損株を樹立し、その機能へとアプローチすることが可能になった。また、類似の方法として Crispr/Cas9 を用いることによっても遺伝子破壊する方法も示された (笹倉)。また、卵側で発現する遺伝子の新規機能解析法として、笹倉らは MASK 法を報告した (笹倉: Scientific Reports, in press)。MASK 法の特徴は TALEN や Crispr/Cas9 による遺伝子破壊には見られないものであり、遺伝子の卵における機能に絞った解析ができるため、非常に有用な遺伝子機能解析法として期待できる。

細胞内のカルシウムイメージング技術に関しても、柴・稲葉により開発され、ホヤのアロ認識シグナルの解析に活用された (澤田、山田、柴、稲葉: PNAS, 2012)。また、ライブイメージングの技術は、様々な分野に活用されるが、花粉管伸長やガイダンス機構の解析 (井川) や、精子先体反応の解析 (広橋、年森、井上)、さらに受精時の膜の動態解析 (宮戸、年森) にも活用される。日常的にこれらの技術が活用されるように総括班としても研究環境整備と研究支援に努めた。鞭毛・繊毛軸糸に存在する新規のカルシウム結合タンパク質カラクシンが精子走化性において卵に確実にたどり着くための運動変化を作り出すために重要であることが明らかとなり、 Ca^{2+} シグナルが精子鞭毛の分子モーターを制御する直接的な分子機構が解明された (稲葉、柴: PNAS, 2012)。体内受精を行う巻貝精子の後方遊泳メカニズムとその意義を明らかにした (稲葉、柴: J. Exp. Biol., 2014)。カタユレイボヤ精子プロテオミクスにより受精に関連する精子膜成分、軸糸、頭部特異的なタンパク質が同定された (稲葉: Nucleic Acids Res. 2011, Mol Reprod Dev. 2011)。カタユレイボヤ精子運動活性化・走化性において脂質ラフトが重要であることが明らかとなった (稲葉: Mol Reprod Dev., 2011)。領域内共同研究により、ヤリイカ CO_2 走化性の分子機構 (広橋、稲葉、柴: Curr. Biol., 2013) や、ウズラ精子貯精の分子機構が明らかとなった (笹倉、稲葉、柴: Reproduction, 2013)。褐藻配偶子の鞭毛運動解析 (本村、稲葉、柴)、ゼニゴケ精子走化性解析 (大和、稲葉、柴)、クラゲ精子誘引メカニズムの解析 (出口、稲葉、柴) についても引き続き領域内共同研究が進められている。分子系統解析も共同研究で進められている (田宮、宮戸、井上、澤田、山田ほか)。

<アロ認証統合理解> 生殖細胞の分化や進化 (野崎)、同形配偶子から異系配偶子への進化 (河野)、受精時における雄と雌の核の認証機構 (伊藤)、オルガネラの異常と生殖異常との関わり (真野、坂本)、さらに受精における雄性配偶子由来オルガネラの排除 (坂本) などに関する理解が深まった。今回、シロイヌナズナを用いたライブイメージング解析により GFP でラベルされた精子由来のミトコンドリアを観察したところ、受精卵に雄由来のミトコンドリアが取り込まれるが、受精後 6 時間後に GFP が消失することが明らかとなり、雄由来ミトコンドリアが受精後に分解されていることが植物でも確認された (坂本)。受精におけるオルガネラの母性遺伝を保證する分子機構の存在が初めて示された (坂本)。卵の付活に関しては、動物で研究が進んでいるが、植物では解析が進んでいない。動物学においては、精子ファクター (SF) の卵内注入によって卵が活性化される現象が一つのトピックになっている。哺乳類では、精子の PLCzeta がその化学的自体であると理解されているが、種によってはクエン酸合成酵素等の場合もある。このように、動物で注目されているテーマを植物でも解析することの意義は大きい。



4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1ページ程度）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください
また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

【総括班の支援体制】

問題点1：LC/MS/MSを用いたプロテオーム解析は、領域研究全体を推進する上で非常に有用であるが、本備品は高額なため、当初機器を購入せずに業者への依頼分析でまかなう予定であった。しかし実際には、利用頻度が極めて高く、業者への依頼分析でまかなえない状況となった。

対応策：研究の効率化のために、領域代表の研究室で本機器をリース契約することにした。これにより、日常的にプロテオーム解析ができるようになった。このLC/MS/MSは現在も毎日稼働しており、領域内の共同研究の推進に非常に貢献している。解析には2-3ヶ月程の待ち時間が必要な場合もあり、非常に有効に活用されている。

問題点2：今まで、動物と植物の研究者が一堂に会する機会は皆無であったので、第1回目の領域会議が真の初顔合わせとなった。当初は相互の研究内容の理解も困難で、質疑討論も十分とはいえず、研究交流や共同研究をいかに推進させるかが大きな課題であった。

対応策：これに対していくつかの対応策を講じた。①領域会議を年2回行い、相互の研究の理解を深めた。宿泊施設で宿泊して領域会議を行った際には、植物と動物の研究者が交わるように部屋割を工夫した。さらに、深夜まで研究討論ができる部屋を設定し、研究交流の推進を図った。②ニューズレターを年1-2回発行し、各班員の研究内容に関するわかりやすい紹介を掲載した。本領域のニューズレターは内容が濃く、読み物としてもためになると好評であった。国内外の動植物生殖関連の学会やシンポジウムに関する情報も掲載した。③領域のホームページに「Allo Forum」と題する新着文献紹介評論サイトを開設した。輪番制で班員から毎週新着文献を紹介して頂き、その結果や解釈に対してオンライン上で自由に評論できるようにした。このサイトに投稿すれば、各班員のメールアドレスに投稿原稿が自動転送されるように設定した。これにより、動物研究者（あるいは植物研究者）が植物（あるいは動物）の論文を読むことに対するハードルが下がり、動物と植物の生殖学研究における現状と課題について理解を深めることができた。③領域会議では、若手研究者に座長を担当させ、討議に積極的に関わられるようにした。また、質問には時間制限を設けず、「出尽くすまで質問する。」という画期的な策を導入した。これは評価委員のコメントに対応して行った企画であり、学会等と明確に異なるので好評を得た。その自由な雰囲気は功を奏して、研究交流の輪が広がり、共同研究の推進にも貢献した。

問題点3：なかなか動物と植物の研究者間での共同研究が進まなかった。

対応策：まずLC/MS/MSを用いたプロテオーム解析を領域代表の研究室でうけおい、各班員の研究支援活動を行った。これにより共同研究が展開し、それを介した研究交流の輪も広がった。また、筑波大学下田臨海実験センターの稲葉の研究室で、Ca²⁺のライブイメージング技術が確立されていたので、班員は下田臨海センターに宿泊して研究を続けることができた。臨海実験所の場合、宿泊費等の経費が節減でき、共同研究の推進に貢献した。また、領域会議では、「どういう共同研究ができるのか、またどういう共同研究を求めているのか」についても口頭発表の際に述べてもらうことにした。これも、共同研究の推進に貢献した。

【自然災害による問題と対応策】

問題点1：女川にある東北大学農学研究科附属の教育研究センター（臨海実験所）に、カタユウレイボヤの採集と、精子・卵の大量調製のために毎年にかけていたが、東日本大震災により、上記センターは壊滅的被害をうけ、実験計画は変更を余儀なくされた。マボヤの養殖も被害をうけ、研究材料の確保が難しくなっている。

対応策：東京大学三崎臨海実験所や筑波大学下田臨海実験センターや舞鶴にあるバイオリソースセンターでカタユウレイボヤを多めに飼育してもらい、不足分を補うことで対応した。マボヤに関しては、研究材料の安定供給に協力的な漁師を現在も探している。

問題点2：宮城教育大の出口研究室では、刺胞動物ネマトステラを飼育して生殖実験を行っていたが、東日本大震災により研究室が被災し、顕微鏡を含む複数の機器が落下して被害を受けた。また長期間の停電により、冷凍冷蔵庫やインキュベーターが使用できなくなり、貴重なサンプルや実験動物の飼育保管が不可能となった。

対応策：生き残ったネマトステラを飼育し直した。ある程度の個体数が確保できたが、その後も原因不明の病気にかかり、生育個体数が減少しつつある。他研究室からの供与を依頼し、実験材料の確保を行った。

5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者の研究終了後の動向等を記述してください。

研究領域内での若手研究者育成のため、以下の取組を行った。

【若手主体の会議開催支援】

若手研究者中心の会議を支援・主催した。第4回生殖研究若手の会（筑波大学・下田臨海実験センター、2010/8/18-20）、臨海若手の会（東京大学・三崎臨海実験所、2010/9/26-27）、第5回生殖研究若手の会（東京大学・三崎臨海実験所、2012/8/18-20）を支援した。また、アロ認証若手の会（島根大学・隠岐臨海実験所、2013/6/4-5）を主催した。

【班会議や国際会議での発表・参加支援】

第1回領域会議に先行して国際会議を開催し、中間評価後に2回目となる国際会議を開催した。領域会議は合計8回に及んだ。ポスター発表は総数200件を越えた。特に国際会議では58件のポスター発表があり、その大部分は、研究室の教授などの奨励・支援を受けた若手研究者からであった。積極的に会議に参加することで、より深い議論が交わされた。更に、ノーベル賞受賞者の下村脩博士を招待しての公開講座を主催し、若手研究者もトップレベルの研究者に触れる機会を作った。

【プロモーション】本領域に参画した若手研究者が研究期間内に多数プロモーションされた。

笹倉 靖徳：筑波大学・准教授 ⇒筑波大学・教授
井上 直和：大阪大学・助教 ⇒福島県立医科大学・准教授
掛田 克行：三重大学・准教授 ⇒三重大学・教授
関本 弘之：日本女子大学・准教授 ⇒日本女子大学・教授
平井 誠：自治医科大学・助教 ⇒群馬大学・講師⇒順天堂大学・准教授
井川 智子：理化学研究所・研究員 ⇒千葉大学・助教
森 稔幸：理化学研究所・研究員 ⇒早稲田大学・助教
土金 勇樹：日本女子大学・学術研究員 ⇒日本女子大学・助教
阿部 淳：日本女子大学・学術研究員 ⇒中央大学・機構助教
奥村 裕紀：名城大学・助教 ⇒名城大学・准教授
上野 秀一：山口大学・助教 ⇒山口大学。准教授
河野奈津子：学振特別研究員（国立成育医療研究センター：DC2）⇒同・PD ⇒同・RPD
吉田 恵一：学振特別研究員（国立成育医療研究センター：DC2）⇒文部科学省・ライフサイエンス課
原田裕一郎：学振特別研究員（国立成育医療研究センター：DC2）⇒東京医科大学技官
後藤 志野：学振特別研究員（基生研：PD）⇒京都大学・PD
水島 秀成：学振特別研究員（静岡大学：PD）⇒静岡大学・学術研究員
檜山 源：静岡大学・学術研究員 ⇒福島県立医科大学・リサーチセンター研究員
赤坂 茉莉：学振特別研究員（名古屋大学：DC2）⇒名古屋大学・特任助教⇒同・助教
横田 直人：学振特別研究員（名古屋大学：DC2）⇒同PD⇒首都大学東京・助教
齋藤 貴子：学振特別研究員（名古屋大学：DC1）⇒カロリンスカ研究所（スウェーデン）・PD

【受賞】本領域の若手研究者が、以下のように受賞をした。

森 稔幸（計画・代表）：科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞受賞（2013）
井上 直和（計画・分担）：第13回インテリジェント・コスモス奨励賞（2014）
井川 智子（公募・代表）：JPR論文賞受賞（2014）
関本 弘之（公募・代表）：The 6th Asian Pacific Phycological Forum, Yeosu, Korea・ポスター賞（2011）
笹浪 知宏（公募・代表）：静岡大学・若手重点研究者（第II期）に選定
浜地 貴志：第11回日本植物学会 若手奨励賞受賞（2014）
浜地 貴志：第1回国際ボルボックス会議・Best Student/Postdoc Talk（2011）
豊岡 博子：東京大学第14回 生命科学シンポジウム・優秀ポスター賞（2014）
豊岡 博子：第2回国際ボルボックス会議・Best Student/Postdoc Talk（2013）
土金 勇樹：日本植物分類学会・奨励賞（2013）
城下 歩美：山口大学大学院医学系研究科・奨励賞（2012）
鈴木 雅大：日本植物分類学会第12回大会・若手ポスター発表賞（2013）
志賀 圭子：第62回日本動物学会中国四国支部大会山口大会・若手研究者優秀発表賞（2010）

6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

領域内で平成21年から平成25年3月までに購入された高額備品（200万円以上）を納入日順に記載した。研究費は、これら備品以外は、ほとんど試薬等の消耗品、学会発表・研究打合せの旅費に使用され、いずれも有効に活用されている。澤田が購入したLC/MS/MS、稲葉が購入した高感度ビデオカメラEMCCD（Andor iXon897）、蛍光顕微鏡用高輝度光源システム（オプトラインLumencor LightEngine）、IX71倒立型顕微鏡システム（オリンパス）は、共同研究に汎用している（網掛け）。それぞれ、プロテオーム解析とカルシウムイメージング解析の目的のため、領域内共同研究で利用されている。遺伝子改変動物（マウス、ホヤなど）も領域内で共用されている。

班員	品名（製造会社、型番号）	金額（千円）	納品日
澤田	オールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス BZ-9000）	9,701	2009/10
岩野	冷却EM-CCDカメラ（日本ローパー社製 Evolve:512）	5,652	2009/11
馬場	共焦点レーザー走査型顕微鏡（オプティクス社）FV10C-W-SET, MIGM/OL-2）	16,327	2009/11
森	落射蛍光微分干渉顕微鏡（オリンパス製 BX51N-34DICT）	2,953	2009/11
稲葉	倒立型リサーチ顕微鏡 蛍光イメージセット（OLYMPUS製 IX71）	3,150	2009/11
岩野	画像解析装置（米国モレキュラーデバイス社製他）	4,000	2009/12
岡本	リアルタイムPCR検出システム（ロッシュライトサイクラー480インスルメントII・96-ウェルTL）	4,991	2009/12
澤田	蛍光実態顕微鏡（ライカマイクロシステムズ社製 M165 FC）	2,934	2010/03
笹倉	蛍光実態顕微鏡（ライカマイクロシステムズ製 M165FC）	2,949	2010/07
馬場	高感度レーザー分子定量システム（GEヘルスケア Typhoon FLAb 9000 BCR）	11,151	2010/09
岩野	ハイエンド電動倒立顕微鏡（Zeiss, AxioObserver.Z1）	5,985	2010/09
稲葉	マルチモードプレートリーダー（ベルトールド製 TriStar LB941-T）	4,819	2010/09
森	倒立型顕微鏡（オリンパス製 IX81）	2,995	2010/10
岩尾	画像解析システム（モレキュラーデバイスジャパン・メタモルフシステム）	3,364	2010/10
掛田	リアルタイムPCRシステム（アプライドバイオシステムズ製 StepOne）	2,646	2010/10
佐藤	動き解析マイクロスコープ（キーエンス VW-6000）	3,423	2010/10
年森	顕微鏡CCDカメラセット（浜松フォトニクス(株)製 EM-CCDカメラ）	4,475	2010/11
岡本	バイオイメージングシステム（Lumina Vision, Nearest Neighborオプション）		
	電動シャッター+コントローラー（Mac6000システム）	2,730	2010/12
井上	ルミノ・イメージアナライザー（ImageQuant LAS4000mini）	4,063	2010/12
関本	DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置（島津製 MCE-202型）	2,499	2011/02
年森	青色蛍光色素観察機材（横河電機 CSU-X1用 システム）	4,237	2012/12
澤田	LC/MS/MC（Thermo社製 LTQ）	45,511	2012/03
澤田	ライトキャプチャー（アトー社製）	2,000	2012/10
掛田	倒立顕微鏡（オリンパス製 IX71N-22FL/PH）	1,528	2012/05
岩野	対物ピエゾオートフォーカスユニット（モレキュラーデバイスジャパン製）	2,957	2012/02
森	遺伝子導入装置（タナカ社製 GIE-III IDERA）	2,499	2014/01
森	小型超遠心機（日立工機 CS100FNX）	4,804	2012/06
森	オールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス BZ-8100）	3,770	2012/10
佐藤	CCDカメラタイプ画像解析装置（GEヘルスケア・ImageQuant LAS500 system）	2,362	2012/12
稲葉	高感度ビデオカメラEMCCD（Andor iXon897）、 蛍光顕微鏡用高輝度光源システム（オプトラインLumencor LightEngine） IX71倒立型顕微鏡システム（オリンパス）	12,054	2012/03
澤田	倒立蛍光微分干渉顕微鏡（オリンパス社製）	5,985	2013/01
年森	レーザーコンバイナ561nm-50mV（横河電機 LCZ-561-CUT05）	2,441	2013/05
森	顕微鏡用多波長タイムラプシステム（浜松フォトニクス社製）	4,989	2013/10
西村	マイクロインジェクション装置一式（IX73倒立顕微鏡（オリンパス） FemtJet Express（エッペンドルフ）、マイクロマニピュレータ（ナリシゲ））	3,788	2013/11
佐藤	蛍光顕微鏡AxioVert.A1FL-LED+AxioCamMR一式	2,972	2014/02

7. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

当領域では研究協力者（評価委員）の星元紀、磯貝彰、岡部勝、東山哲也、瀬原敦子、佐藤矩行の各先生、さらに班友の毛利秀雄先生から領域会議開催の折に、領域の研究活動や運営面等に関する指導助言を仰いで来た。領域終了後に以下の通りに総括的なコメントを頂いている。

【星 元紀（東京工業大学・特別教授）】（専門：生殖生物学、糖鎖生物学）

本領域の直接的な研究成果については、すでに多くの原著論文等として発表され、高い評価を受けているものも少なくない。しかし、特筆すべきは、従前は殆ど認識されることの無かったアロ認証機構という観点から、有性生殖の総合的な理解を深めたことである。

本領域研究では、動植物はもとより、菌類、原生生物（という分類群は無くなったが）までにわたる広汎な生物システムを用いる研究者が、特定の生物システムの中に閉じた「方言」のみによって考えることをやめ、システムの多様性を生かしながらもその背景にある共通機構の理解を志向して研究を進めてきた。このような研究は、いまとなってみれば、当然過ぎるほど当然な研究の方向であり、旧来の領域を超えた共同研究の成果もすでに出だしているが、本領域研究の出発以前には、世界的に見ても稀有なものであった。言い換えれば、字義通りに「新」学術領域が形成されたことこそ、本領域研究の最大の成果であるといえよう。この領域研究で芽生えた色々な共同研究と人的交流が、今後どのような展開をみせるか、刮目して待ちたい。

【磯貝 彰（奈良先端科学技術大学院大学・元学長）】（専門：生物有機化学）

本学術領域は、遺伝的に多様な子孫をつくり出す有性生殖の機能の本質は雌性組織（細胞）と雄性組織（細胞）の間でのアロ認証システムであるという認識にたつて、これまでややもすると交流のなかった植物と動物の生殖機構にかかわる研究者をまとめ、動・植物間での、アロ認証を中心とする生殖機構の共通性と多様性について研究交流をすすめて、新たな総合的な研究領域を作成しようとするものであった。私は領域会議に参加するなどして、この領域の運営や研究交流、研究成果などを見てきた。本領域発足当初は、それぞれの研究者の扱っている生物での生殖システムの違いが十分に理解し合えないところなどがあったようにも思われるが、領域の活動が進むにつれて、お互いの間での理解が深まり、議論や共同研究なども進んできた。この5年間での研究成果を見ても、いろいろな分野で、優れた研究が数多く発表されてきており、この領域での交流が有効であったことがうかがえる。また、AlloForumとして班員間でのネット上での議論の場が作られて数多くのコメントなどが投稿され、班員間で情報が共有されたことも、本領域の運営の優れた点の一つである。また、この領域の研究成果をとりまとめた「動植物における受精学」という単行本は、今後この領域をさらに発展させていく一つの道標となったと考える。

以上、本新学術領域研究のめざした新たな研究領域の確立という点から評価して、当初の目的を十分に達成したものと判断する。今後もこれにかかわった研究者がこの新しい領域の発展に努力されることを期待する。

【岡部 勝（大阪大学・微生物病研究所・名誉教授）】（専門：生殖生理学）

いかなる生命においても生殖は生命維持の基本メカニズムである。表面上の生殖戦略として精子と卵子、花粉と卵細胞などの仕組みは小さくて動くものに対して大きくて動かないという部分は共通しているが、その背後にある動物と植物の配偶子の相互認識や融合に関与する遺伝子などがどのような構成になっているのかは不明であり、アロ認証機構などの共通戦略がどの程度、遺伝子的な共通性を見いだせるのかは大いに興味のもたれるところであった。

植物と動物の研究者が交流できる学術領域の設定により、マウスと植物が起源を同じくすると思われる遺伝子を使って生殖を行っているなど、アロ認証よりもさらに根源的な生殖細胞の融合部分で植物と動物が分離して以来、いまだに共通性が見いだせることがわかっただけでもこの新学術領域が目指した学際協力は大いに成功したと評価できる。植物と動物という極めて異分野性の強い両学術領域間の交流が成果は今後も上がり続けると思われるが、この領域研究の設定により、生殖関係の研究者が動植物の垣根が低いものであることを認識した意義は大きく、今後も継続的な研究の進展が期待される。

【東山哲也（名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・教授）】（専門：植物分子生理学）

最も特筆すべき成果は、動物と植物を中心とした幅広い生物材料を対象とした研究者達が、真に密接な研究交流により共通機構の解明を目指した点である。オンラインフォーラムによる熱心な議論を含め、計画班員・公募班員が一体となって分野間の壁を大きく打破したことは、将来に渡って日本がこの領域を先導し続けることに繋がると確信している。多くの海外研究者からも、日本のこのような取り組みが極めて画期的であると評価された。

領域代表のグループによるプロテオミクス解析や、計画班員の稲葉によるカルシウムイメージングなど、班員が有する優れた解析技術が、領域内の共同研究を加速したことも大きな成果だ。特にプロテオミクス解析では多くの共同研究が達成され、領域代表の強いリーダーシップが高く評価される。GCS1 や IZUM01 のパートナー分子の同定といった一部の当初目標が実現されていない点については、ぜひ世界に先駆けて本領域のメンバーが達成してくれることを強く期待する。

以上のような極めて熱心な取り組みにより、具体的な成果も多く出ている。まず、論文については、画期的な内容の成果が一流誌に多数発表されている状況であると、高く評価する。また、領域代表が編者となり化学同人から出版された「動植物の受精学 共通機構と多様性」は、幅広い生物の受精機構を最先端の研究内容まで含めて網羅した、これまでに例をみない教科書である。国際的にも例を見ず、領域代表のリーダーシップにより実現された。生殖研究の推進や、若手の育成にも大きく貢献するものと思う。

このように、本新学術領域研究での試み、得られた成果、そして構築された強いネットワークは、極めて有意義で優れたものであると評価する。

【毛利秀雄（東京大学・基礎生物学研究所・名誉教授）】（専門：動物学、生殖生物学）

「動植物に共通のアロ認証機構の解明」を目指した本研究は、澤田均教授の強力なリーダーシップのもと、これまでこの種の問題ではそれぞれ別個に研究を進めてきた動物、植物の研究者たちを初めて一堂に集め、まず互いの問題の理解からはじめて、共通の問題や因子の解明、手法の交換などを通して、多くの共同研究を産み出した。またそれぞれの研究自体も深化したと思う。この間に 500 に及ぶ論文が班員によってもたらされたことが、何よりもその成果を如実に示している。国際シンポジウムや関連学会における積極的なシンポジウムの開催、さらには公開講座の開催など、「アロ認証機構」という概念、あるいは受精についての諸問題を広く理解してもらうためにされた努力も評価される。単行本の発刊も今後のこの方面の研究の発展に大いに寄与することであろう。この領域研究をきっかけに始まった共同研究が今後とも継続され、さらなる発展をもたらすことを期待する。

【瀬原淳子（京都大学・再生医科学研究所・教授）】（専門：発生生物学）

本領域は、動物界・植物界という垣根を越えて、受精過程とそのメカニズムを解明しようとするユニークな研究領域であった。まず、単なる個別研究の集まりで終わることなく、多様な動植物の受精に関する疑問点を様々な視点・研究手法をもつ研究者がシェアし真剣に議論することにより、個々の問題を深化させることができたことは、本領域の貴重な成果として評価されるべきものである。そしてその中で、いろいろな形で共同研究が行われ、自家受精の新たな機構が解明される等の優れた成果が得られたことは、高く評価される。個々の動植物に固有の受精のプロセスを受精という共通のプロセスとして総合的・統合的に理解するのはかなり難しいのではないか、という領域開始時の危惧を払拭し、新たな学問の創成への息吹を感じさせるような、ユニークな研究者集団が形成されたことも、高く評価できる。

【佐藤矩行（沖縄科学技術大学院大学・教授）】（専門：発生生物学）

新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」は、この種の総合的研究としては、最も成果のあった研究の一つとして評価することができる。その理由は、一つには、その領域名で謳った”動植物に共通するアロ認証機構”について、正に、動物を対象とした研究者と植物を対象とした研究者、さらには単細胞 真核生物を対象とする研究者が一堂に会して、その共通アロ認証機構（あるいはその違い）の解明に協力しあったことである。この領域研究で、この分野に関する多くの研究が飛躍的に進んだことは言うまでもなく、さらに幾つかの新しい研究の芽が生まれたことも評価したい。またこうした研究を支え、またさらに発展させであろう若手研究者が育ったことも評価したい。この間、10 回ほど領域会議・総括班会議や 2 回の国際会議の開催を通して行われた活発な議論は本領域研究参加者全員にとっての大きな宝であろう。本領域研究は、将来にわたる「動植物に共通するアロ認証機構の解明」研究の大きな基礎を築いたものと言えよう。

8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎または計画研究毎に整理する]

（3 ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

【計画研究】（7 課題：研究代表者 7 名、研究分担者 2 名）

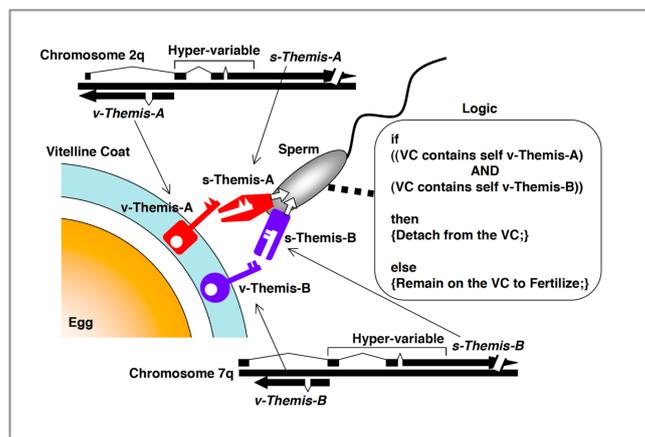
研究課題：原索動物ホヤ類におけるアロ認識機構の解明

研究代表者：澤田均（名古屋大学・大学院理学研究科・教授）

原索動物ホヤ類は一般に雌雄同体で、精子と卵をほぼ同時に海水中に放出するが、精子が卵黄膜に結合する段階で自己非自己認識（アロ認識）が行われ、自己と識別されると卵黄膜から離脱し受精が回避される。澤田らは、順遺伝学的手法と卵黄膜プロテオーム解析により、第2染色体の遺伝子ペア（精子側 *s-Themis-A* と卵側 *v-Themis-A*）と第7染色体の遺伝子ペア（精子側 *s-Themis-B* と卵側 *v-Themis-B*）が自家不和合性に関わることを示している（*Science*, 2008）。この A, B 両者は個体間で多型にとみ、共進化していると思われる。精子は自己卵の卵黄膜に結合すると、精子内への急激な Ca^{2+} 流入が起こり、それが自己シグナルとなって、卵黄膜から離脱すると解釈される（柴、稲葉、山田との領域内共同研究）。

s-Themis-B の C 末端側には陽イオンチャンネルが存在することから、ここを介して Ca^{2+} 流入がおこると考えられる。

s/v-Themis-B 遺伝子に近接して新規遺伝子 *s/v-Themis-B2* が存在し、*s/v-Themis-A, B, B2* の三者がアロ認識に関わることが遺伝子破壊実験により最近示された（笹倉との領域内共同研究）。*s/v-Themis-A* と B の結合は、卵黄膜の *v-Themis-like* によって支えられていると考えられる。また、精子 CiUrafin と卵黄膜 CiVC57 の結合も *s-Themis* と *v-Themis* の結合を支えている。これらの基本原理は植物における自家不和合性の原理と酷似しており、動植物共通機構といえる。

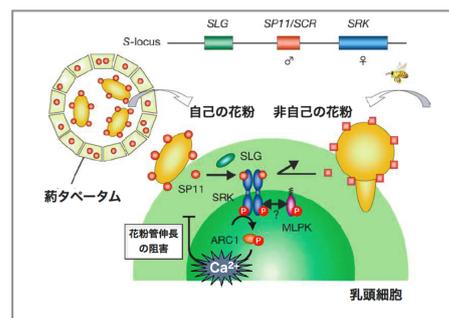


1. *Sawada, H., Moria, M., and Iwano, M. (2014). Self/non-self recognition mechanisms in sexual reproduction: New insight into the self-incompatibility system shared by flowering plants and hermaphroditic animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1142-1148.
2. Otsuka K., Yamada, L., and *Sawada, H. (2013). cDNA cloning, localization, and candidate binding partners of acid-extractable vitelline-coat protein Ci-v-Themis-like in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 840-848.
3. Saito, T., Shiba, T., Inaba, K., *Yamada, L., and *Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 4158-4162.

研究課題：アブラナ科植物におけるアロ認識機構の解明

研究代表者：岩野 恵（奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教）

岩野らは、アブラナの自家不和合性（自己の花粉が受粉しても自家受精しない性質）の分子機構について研究を進め、多くの成果をあげてきた。花粉タンパク質 SP11 と雌蕊側のキナーゼ型レセプター（S-receptor kinase : SRK）の遺伝子が *S* 遺伝子座で近接し、個体間で多型に富むこと、またそれがハプロタイプというペアを形成し、SRK が同一ハプロタイプの SP11 を認識すると花粉の水和と花粉管伸長が阻害されることを明らかにしている（右図）。そこには細胞内カルシウム濃度上昇やリン酸化に関わるが、詳細な分子機構解析は進んでいなかった。そこで、今回自家不和合遺伝子をシロイヌナズナに導入し、自家不和合モデル植物を作出して、自家・他家受粉時の Ca^{2+} イメージングを行った。その結果、雌蕊の乳頭細胞における自家受粉時特異的な細胞内 Ca^{2+} 上昇を見出した。この上昇が花粉側不和合因子 SP11 単独で誘起され、SRK のキナーゼ活性依存的であることも判明した。さらにこの情報には細胞外からの Ca^{2+} 流入が必須であることも明らかにした。一方で、和合受粉時特異的に乳頭細胞から Ca^{2+} 流出がおこること、それに Ca^{2+} ATPase13 が関与することを明らかにした。従って、不和合受粉時には Ca^{2+} 流出を抑制し Ca^{2+} 流入を誘導する機構が存在することが示唆された。



1. *Iwano, M., Ngo, Q.A., Entani, T., Shiba, H., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A., Grossniklaus, U. and *Takayama, S. (2012). Cytoplasmic Ca^{2+} changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells. *Development* 139, 4202-4209.
2. *Iwano, M. and *Takayama S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. (2012). *Curr Opin Plant Biol.* 15, 78-83.
3. Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and *Takayama, S. (2010). Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 19, 983-986.
4. *Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., and Takayama, S. (2009). Fine-tuning of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol.* 150, 1322-1334.

研究課題：雌性生殖器における精子認証機構の解明

研究代表者：馬場 忠（筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授）

哺乳類においては、精子 ADAM3 が精子の卵外被（透明帯）への結合に必須であると考えられている。一方、この *Adam3* 遺伝子を破壊したマウスでは、精子運動性は正常であるにもかかわらず、精子が子宮から卵管先端部である子宮卵管結合部へ進入することができない。雌性生殖器でどのような分子が精子認証を行っているのであろうか。これは哺乳類の生殖生物学における重要課題のひとつであるが、馬場はそれらの制御に関与する卵管因子を同定することに成功した。また、体外受精で機能不全が見いだされた各種ノックアウト精子でも、生体内では野生型と同様に、雌性生殖器を移動し卵管膨大部到達の手前で先体反応を起こしていることも明らかになった。これらの発見は、不妊診断や不妊治療に活かせる可能性のある重要な発見である。さらに、アクロシン以外の精子トリプシン様プロテアーゼ（PRSS21）のダブルノックアウトによりその受精への関与を証明した（宮戸との領域内共同研究）。

1. Kanemori, Y., Ryu J. H., Sudo, M., Niida-Araida, Y., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Sugiura, S., Kashiwabara, S., and *Baba, T. (2013). Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse. *Biol. Reprod.* 88, 105. doi: 10.1095/biolreprod.112.107425.
2. Zhou, C., Kang, W., and *Baba, T. (2012) Functional characterization of double-knockout mouse sperm lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in fertilization. *J. Reprod. Dev.* 58, 330-337.
3. Kawano, N., Kang, W., Yamashita, M., Koga, Y., Yamazaki, T., Hata, T., Miyado, K., and *Baba, T. (2010). Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol. Reprod.* 83, 359-369.

研究課題：哺乳類における配偶子融合の分子認証機構の解明

研究代表者：宮戸健二（国立成育医療センター研究所・生殖・細胞医療研究部・室長）

研究分担者：井上直和（大阪大学・微生物病研究所・助教）

宮戸は、マウス卵子の 4 回膜貫通ドメインを有する CD9 が受精に必須であることを世界に先駆けて報告している（*Science*, 2000）。その後、この膜結合型 CD9 がエキソソームと呼ばれるベシクルを介して精子細胞膜に取り込まれることが重要であることを示した（*PNAS*, 2008）。本研究では、その CD9 の機能についてさらに解析を行っている。CD9 を含む卵子エキソソームの構成成分を解析した結果、卵子エキソソームは卵細胞膜上での細胞膜の反転（flip-flop）の結果として細胞膜成分の内側が露出する過程で形成されることを明らかにした。更に、卵子エキソソームの膜融合促進活性を担う因子として、タンパク質成分ではなく、ホスファチジルエタノールアミンの分子種が関与しており、飽和脂肪酸の 18 個の炭素鎖が融合促進活性に重要であることが明らかになった（年森との領域内共同研究）。更に、CD9 と同様の構造をもったテトラスパニンの 1 つで卵に発現している CD81 は CD9 とは異なる構造体の成分として卵の細胞外に放出され、CD9 の機能を補佐する役割があることを明らかにした。

井上は、マウスの配偶子膜融合に関わる精子タンパク質 IZUMO1 を世界で最初に発見している（*Nature*, 2005）。その後、モノクローナル抗体のエピトープ解析から、IZUMO1 の N 末端領域の融合コア領域を明らかにした。この領域は α ヘリックス含量が非常に高く、2 量体化を引き起こすことが明らかにした。さらに IZUMO1 を発現することで培養細胞を卵子細胞膜に接着させることに成功した。しかしこの系では双方の膜の融合は成立しない。このことから、IZUMO1 を活性型へと転換する何らかの機構が融合を誘起するために必要であると考えられる。

1. Kawano, N., *Miyado, K., Yoshii, N., Kanai, S., Saito, H., Miyado, M., Inagaki, N., Odawara, Y., *Hamatani, T., and Umezawa, A. (2014). Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Scientific Reports* 4, 4701
2. Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, K., Ohnami, N., Makino, M., Kanai, S., Hasuwa, H., *Yoshida, M., *Miyado, K., and Umezawa, A. (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111, 4145-50.
3. Inoue, N., Hamada, D., Kamikubo, H., Hirata, K., Kataoka, M., Yamamoto, M., Ikawa, M., Okabe, M., and *Hagihara, Y. (2013). Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development.* 140, 221-3229.
4. Ohnami, N., Nakamura, A., Miyado, M., Sato, M., Kawano, N., Yoshida, K., Harada, Y., Takezawa, Y., Kanai, S., Ono, C., Takahashi, Y., Kimura, K., Shida, T., *Miyado, K., and Umezawa, A. (2012). CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open* 1, 640-647.
5. Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2012) Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci.* 125(Pt 21), 4985-4990.
6. Fujihara, Y., Satouh, Y., Inoue, N., Isotani, A., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2012). SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development.* 139, 3583-3589.
7. *Inoue, N., Nishikawa, T., Ikawa, M., Okabe, M. (2012). Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. *Fertil Steril.* 98, 465-470.
8. Takezawa, Y., Yoshida, K., *Miyado, K., Sato, M., Nakamura, A., Kawano, N., Sakakibara, K., Kondo, T., Harada, Y., Ohnami, N., Kanai, S., Miyado, M., Saito, H., Takahashi, Y., Akutsu, H., and Umezawa, A. (2011). β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports.* 1: Article 68. doi: 10.1038/srep00068.
9. Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., *Okabe, M., and *Yanagimachi, R. (2011) Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:20008-20011.
10. *Ikawa, M., Tokuhira, K., Yamaguchi, R., Benham, A, M., Tamura, T., Wada, I., Satouh, Y., Inoue, N., and Okabe, M. (2011). Calsperin is a testis-specific caperon required for sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 286 (7), 5639-5646.
11. Fujihara, Y., Murakami, M., Inoue, N., Satouh, Y., Kaseda, K., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2010). Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J. Cell Sci.* 123 (9), 1531-1536.
12. Inoue, N., Kasahara, T., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2010). Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PLoS One* 5 (4), e10301.

研究課題：被子植物における配偶子融合の分子認証機構の解明

研究代表者：岡本龍史（首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授）

1 細胞を用いたマイクロアレイ解析系を用いて、精細胞と卵細胞、精細胞と中央細胞の膜融合に関わる候補分子を同定した。また、動物細胞の配偶子膜融合にも植物配偶子融合関連分子が関与するか否かを検討するとともに、動物側で明らかにされている分子の植物配偶子融合への関与も *in vitro* 受精系などを用いて検討した。

1. Abiko M., Furuta K., Yamauchi Y., Fujita C., Taoka M., Isobe T., and *Okamoto T. (2013). Identification of proteins enriched in rice egg or sperm cells by single-cell proteomics. *PLoS One* 8, e69578.
2. Abiko M., Maeda H., Tamura K., Hara-Nishimura I. and *Okamoto T. (2013). Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: Identification of gamete-enriched genes and up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization. *J. Exp. Bot.* 64, 1927–1940.
3. Ohnishi, T., Takanashi, H., Mogi, M., Takahashi, H., Kikuchi, H., Yano, K., Okamoto, T., Fujita, M., Kurata, N., and *Tsutsumi N. (2011). Distinct Gene Expression Profiles in Egg and Synergid Cells of Rice as Revealed by Cell Type-specific Microarrays. *Plant Physiol.* 155, 881-891.
4. Nakajima K., Uchiumi T. and *Okamoto T. (2010). Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *J. Exp. Bot.* 61, 3101-3105.

研究課題：植物と動物の配偶子融合における中核機構の解明

研究代表者：森 稔幸（早稲田大学・高等研究所・助教）

GCS1 は、森によってテッポウユリで最初に発見された、配偶子膜融合に必須な雄性因子である (Nat. Cell Biol., 2006)。このタンパク質は動植物に広く存在する。同形配偶子接合を行う生物においても雄性配偶子特異的に発現する点が興味深い。その後、平井との共同研究によりマラリア原虫の有性生殖にもこの GCS1 が関わることを共同研究で証明した (Curr. Biol., 2008)。本領域研究では、シロイヌナズナ GCS1 の部分配列を GFP の挿入によって分断・置換して、GCS1 破壊株を導入することで、その受精機能変化を解析した。その結果、GCS1 の C 末側（細胞内領域）を破壊しても機能阻害は起こらないが、N 末側（細胞外領域）に GFP 挿入したコンストラクトは GCS1 の機能を著しく阻害することを明らかにした。同様の傾向はマラリア原虫 GCS1 においても認められた。このことから GCS1 の機能ドメインは N 末側にのみ存在すること結論づけた。これに加えて、GCS1 とは異なる受精異常株 Y47 を見だし、その原因遺伝子 GEX2 を同定した。GEX2 タンパク質は GCS1 と同様に精細胞の表面に局在することも判明した。さらに、この欠損株では、精細胞は卵細胞に接着できないことが示され、GEX2 が雌雄配偶子融合を安定化させる配偶子接着因子であることを示した（井川、田宮との領域内共同研究）。

1. *Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S.Y., and *Berger, F. (2014) Gamete Attachment Requires GEX2 for Successful Fertilization in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 24, 170-175.
2. Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B.J. Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A., and Nozaki, H. (2014). Sex-specific posttranslational regulation of the gamete fusogen GCS1 in the isogamous volvocine alga *Gonium pectorate*. *Eukaryot. Cell* 13, 648-656.
3. Igawa, T., and Mori, T. (2013). Gamete membrane dynamics during double fertilization in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 8, e24512.
4. *Mori, T., Hirai, M., Kuroiwa, T., and Miyagishima, S.Y. (2010). The functional domain of GCS1-based gamete fusion resides in the amino terminus in plant and parasite species. *PLoS One* 5, e15957.

研究課題：アロ認証研究のための次世代技術の開発と活用

研究代表者：稲葉一男（筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授）

研究分担者：笹倉靖徳（筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授）

稲葉は、ホヤ精子の活性化や走化性に関わる分子を MALDI-TOF-MS 分析により解析している。特に鞭毛タンパク質の解析を中心に共同研究も行っている。一方、笹倉は、遺伝子改変ホヤの作出技術の開発を行っている。また、TALEN や Crispr/Cas9 の系により遺伝子を破壊する実験にも成功している。また笹倉らは MASK 法も開発した。本手法では、母性 mRNA の欠損卵を作製でき、さらにその遺伝子が受精後に胚性の発現を示す場合には、その胚性発現には影響をもたらさない方法である。この MASK 法の特徴は TALEN や Crispr/Cas9 による遺伝子破壊には見られないものであり、遺伝子の卵における機能に絞った解析ができるため、非常に有用な遺伝子機能解析法として期待できる。

柴と稲葉は、細胞内のカルシウムイメージング技術の開発も行っている。この技術は、ホヤのアロ認識シグナルの解析に活用されている。また、ライブイメージングの技術は、様々な分野に活用されるが、花粉管伸長やガイダンス機構の解析や、精子先体反応の解析、さらに受精時の膜の動態解析にも活用される。精子の鞭毛運動の研究においては、鞭毛・繊毛軸糸に存在する新規のカルシウム結合タンパク質カラクシンが精子走化性において卵に確実にたどり着くための運動変化を作り出すために重要であることを明らかにした。カタユウレイボヤ精子プロテオミクスにより受精に関連する精子膜成分、軸糸、頭部特異的なタンパク質の同定も行った。カタユウレイボヤ精子運動活性化・走化性において脂質ラフトが重要であることも示した。ホヤ精子の自家不和合性に直接関与する Ca^{2+} シグナルの可視化に成功し、自己卵の卵黄膜への接着によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がアロ認識シグナルとなることも明らかにした（澤田、山田、柴との領域内共同研究）。ヤリイカ CO_2 走化性の分子機構や、ウズラ精子貯精の分子機構の解析においても、領域内共同研究により支援活動を行った。

1. Treen, N., Yoshida, K., Sakuma, T., Sasaki, H., Kawai, N., Yamamoto, T., *Sasakura, Y. (2014). Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in *Ciona* by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development* 141, 481-487.
2. Iitsuka, T., Mita, K., Hozumi, A., Hamada, M., Satoh, N., *Sasakura, Y. (2014). Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Scientific Reports* in press.

- Jin, Y., Yaguchi, S., Shiba, K., Yamada, L., Yaguchi, J., Shibata, D., Sawada, H., *Inaba, K. (2013). Glutathione transferase theta in apical ciliary tuft regulates mechanical reception and swimming behavior of Sea Urchin Embryos. *Cytoskeleton*. 70, 453-470.
- *Hirohashi, N., Alvarez, L., Shiba, K., Fujiwara, E., Iwata, Y., Mohri, T., Inaba, K., Chiba, K., Ochi, H., Supuran, C.T., Kotzur, N., Kakiuchi, Y., Kaupp, U.B., Baba, S.A. (2013). Sperm from Sneaker Male Squids Exhibit Chemotactic Swarming to CO₂. *Curr Biol*. 23, 775-781.
- Mizuno, K., Shiba, K., Okai, M., Takahashi, Y., Shitaka, Y., Oiwa, K., Tanokura, M., *Inaba, K. (2012). Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 20497-20502.
- Saito, T., Shiba, K., Inaba, K., Yamada, L., *Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 4158-4162.
- Nakachi, M., Nakajima, A., Nomura, M., Yonezawa, K., Ueno, K., Endo, T., *Inaba, K. (2011). Proteomic profiling reveals compartment-specific, novel functions of ascidian sperm proteins. *Mol Reprod Dev*. 78, 529-549.
- Zhu, L., *Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod Dev*. 78, 920-929.
- Endo, T., Ueno, K., Yonezawa, K., Mineta, K., Hotta, K., Satou, Y., Yamada, L., Ogasawara, M., Takahashi, H., Nakajima, A., Nakachi, M., Nomura, M., Yaguchi, J., Sasakura, Y., Yamasaki, C., Sera, M., Yoshizawa, A.C., Imanishi, T., Taniguchi, H., and Inaba, K. (2011). CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* protein database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with user rating and renewing functionalit. *Nucleic Acids Res*. 39 (Suppl. 1), 807-814.
- *Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T.G., Satoh, N., and Sasakura, Y. (2011). Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells from the adult nervous system. *Nature* 469, 525-528.

【公募研究】(本領域に関わる重要課題のみ抜粋) (平成 22-23 年度 23 課題、平成 24-25 年度 16 課題)

研究課題：イネ科植物におけるアロ認識機構の解明 (H22-25)

研究代表者：掛田克行 (三重大学・大学院生物資源学研究所・教授)

オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*)は、独立二遺伝子座 (*S*および*Z*) 支配の自家不和合性を示す点で、カタユウレイボヤのアロ認識機構と類似している。本研究では、このアロ認識特異性決定因子の一つで、雌ざい側 *S* 遺伝子の有力候補である *HPS10* (*Hordeum* Pistil *S*-specific 10)が真のアロ認識分子であることを証明する実験系を開発した (岩野との共同研究)。この *in vitro* 花粉培養系を用いたバイオアッセイにより、*HPS10* タンパク質が *S* ハプロタイプ特異的な花粉発芽阻害効果をもつことを証明した。イネ科のアロ認識決定因子は長らく未同定であったが、本研究により *HPS10* がオオムギ野生種の雌性 *S* 決定因子と同定された (岩野との共同研究)。さらに、未知の雄性 *S* 因子の同定に向け、花粉のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った。このアプローチにより、*S* ハプロタイプ特異的に発現する花粉発現配列を取得するとともに、*HPS10* 遺伝子周辺のゲノム領域上に新規な花粉発現遺伝子のあることを明らかにした (掛田、山田、澤田：学会発表)

- *Kakeda, K., Ishihara, N., Izumi, Y., Sato, K., and Taketa, S. (2011). Expression and functional analysis of the barley *Nud* gene using transgenic rice. *Breeding Science* 61, 35-42.

研究課題：鳥類の卵管で貯精を制御するアロ認識機構 (H22-23)

鳥類の輸卵管における cryptic female choice による精子選抜 (H24-25)

研究代表者：笹浪知宏 (静岡大学・農学部・准教授)

ニワトリやウズラなどの鳥類では、雌性生殖器内に侵入した精子を長期間生存させるための精子貯蔵管(SST)が、卵管の子宮腔移行部および漏斗部に存在する。このため、一度交尾や人工授精を行うと、その後交尾や人工授精を繰り返さなくても受精卵を産み続けることができるが、その分子機構は不明である。本研究では、SST における貯精の分子機構についても研究が行われた。ウズラを交尾させると、精子は交尾後 1 時間以内に SST に侵入するが、死滅精子を人工授精しても SST 内に精子は観察されない。このことは、SST に生存精子を選択的に受入れる機構が存在することを示唆している。また、生体内では SST が積極的に精子の運動性を低下させることも示唆された。交尾後 1 時間に排卵ホルモンであるプロゲステロンをウズラの静脈内に投与すると、SST からの精子の放出が観察された。さらに、SST からの精子の放出は排卵周期と同調していることも判明した。プロゲステロンの膜受容体(mPR)が子宮腔移行部および精子に発現していることから、プロゲステロンが mPR を介して精子の放出シグナルとして働いていると考えられる。

- *Hiyama, G., Matsuzaki, M., Mizusima, S., Dohra, H., Ikegami, K., Yoshimura, T., Shiba, K., Inaba, K., *Sasanami, T. (2013). Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* 147, 167-178.
- *Sasanami, T., Sugiura, K., Tokumoto, T., Yoshizaki, N., Dohra, H., Nishio, S., Mizushima, S., Hiyama, G., Matsuda, T. (2012). Sperm proteasome degrades egg envelope glycoprotein ZP1 during fertilization of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* 144, 423-431.
- Ito, T., Yoshizaki, N., Tokumoto, T., Ono, H., Yoshimura, T., Tsukada, A., Kansaku, N., *Sasanami, T. (2011) Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm storage tubules in birds. *Endocrinology* 152, 3952-3962.

研究課題：細胞性粘菌におけるアロ認識機構の解明 (H22-25)

研究代表者：漆原秀子 (筑波大学・生命環境系・教授)

細胞性粘菌 *D. discoideum* の有性生殖様式は主として他家接合で、type-I, type-II, type-III の 3 種類の交配型が知られている (雄と雌というような 2 種類ではない)。それぞれ自分とは異なる交配型の配偶子とのみ融合して接合子を形成し、

マクロシスト形成に至る。これまでに有性生殖関連遺伝子として細胞融合能を失った変異体の原因遺伝子 *macA* と交配型特異的な配列 *matA* が type-I で同定されているが、いずれの産物も細胞の識別には関わっていないと推測されている。これらを手掛かりとし、*D. discoideum* の自己認識分子の探索がプロテオーム解析を駆使した領域内共同研究で進められてきた（山田、澤田との領域内共同研究）。本研究により、2種類の GCS1 ホモログ（Hap2, MrhA）が交配型特異的に発現していることが新たに見出された。2遺伝子の破壊株を3種類の交配型で作製して機能解析を行ったところ、両遺伝子ともに type-I と type-II では接合子形成に必須だが type-III では有性生殖過程に影響がないことが示され、アメーボゾアにおいても GCS1 が性特異的に有性生殖に重要な役割を果たしていることがわかった。MrhA は GCS1 モチーフ領域のみで Hap2 に類似しており、細胞性粘菌の系譜でよく保存されているにもかかわらず他の生物では見出されないことから、同系譜のごく初期に GCS1 モチーフが重複して形成されたと考えられる。type-I/II と type-III のアロ認証には GCS1 とそのレセプターが、type-I と type-II のアロ認証には別分子が機能していると考えられるが、後者の機能にも GCS1 が必要である。Hap2 と MrhA は互いに相補しないことから、これらの分子は複合体を形成するなど密接に関係して機能していると推察される。プロテオーム解析により判明した、type 特異的に促進あるいは抑制されるタンパク質は、アロ認証機構の全容解明に重要な手掛かりとなることが証明され、領域内共同研究の重要性が示された。

1. Araki, Y., Shimizu, H.D., Saeki, K., Okamoto, M., Yamada, L., Ishida, K., Sawada, H., *Urushihara, H. (2012). A surface glycoprotein indispensable for gamete fusion in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* 11, 638-644.

研究課題：精子ナビゲーション戦略の分子機構の解明（H24-25）

精子ナビゲーション戦略の解析方法開発とメカニズム解明（H22-23）

研究代表者：広橋教貴（島根大学・生物資源科学部・准教授）

今まで、受精に関わる精子が、いつどこで先体反応を起こすかは不明であった。広橋は、*ACR-EGFP* と *CAG-mtDsRed2* を導入したマウスを用い、先体反応前の先体胞を緑色蛍光で、ミトコンドリアを赤色蛍光で標識することにより、先体反応がいつ起こるかを解析した。*ACR-EGFP* はインタクト精子の先体胞で緑色蛍光を発するが、先体反応後は速やかにそのタンパク質が放出されて緑色蛍光を発しなくなるので判定がつく。今まで、精子は卵透明帯に結合後に先体反応を起こすと信じられてきたが、実際にはそうではなく、卵丘細胞層を通過する際に先体反応を起こした精子のみが透明帯を通過できることをライブイメージングで証明した。卵透明帯に結合後に先体反応を起こす精子も見られるが、それは卵透明帯を通過できず受精に関われないことが示された。これは電顕観察から推測されていた従来の定説を覆す非常に重要な発見である（PNAS, 2011）。今までの受精の教科書を書き換える必要がある。また、ヤリイカには精子二型が存在することと、その特性と生理的役割に関してもインパクトのある論文として報告している（柴、稲葉との領域内共同研究）。

1. Yoshida MA, Yamada L, Ochi H, Iwata Y, Tamura-Nakano M, Sawada H, Sauer WH, Ogura A, *Hirohashi, N. (2014) Integrative omics analysis reveals differentially distributed proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 24 in press.
2. *Hirohashi, N., Alvarez, L., Shiba, K., Fujiwara, E., Iwata, Y., Mohri, T., Inaba, K., Chiba, K., Ochi, H. (2013) Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO₂. *Curr. Biol.* 23, 775-781.
3. Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and *Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4892-4896.
4. Yoko Iwata, Paul Shaw, Eiji Fujiwara, Kogiku Shiba, Yasutaka Kakiuchi, *Noritaka Hirohashi. (2011). Why small males have big sperm: dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. *BMC Evolutionary Biology* 11, 10.1186.

研究課題：精子誘引物質を介する卵と精子の遠隔分子認証システムの解明（H24-25）

精子活性化・走化性時における卵と精子の遠隔分子認証システムの解明（H22-23）

研究代表者：吉田 学（東京大学・大学院理学系研究科・准教授）

ヒトを含む哺乳類では、精子はメス体内の膣、子宮を通過して卵管に進入し、卵管内で待っている卵へたどり着いて受精が成立する。古くから、卵管まで進入した精子の受精能は高いこと、精漿には精子の受精能を抑制する働きがあることは知られていたが、メス生殖器内での精子の受精能を調節する機構は不明であった。精囊から分泌される精漿タンパク質 Seminal Vesicle Secretion 2（SVS2）を欠損したオスマウスを用いて、交尾後のメス生殖器内での精子の挙動を詳細に調べた。その結果、子宮には精子の受精能を高める働きはなく、逆に精子を殺して排除しようとする働きがあること、SVS2 は精子の細胞膜を保護することで子宮の殺精子作用から精子を保護し、卵の待つ卵管へ精子を送り届ける作用があることが明らかになった。即ち、メスとオスによる精子への攻撃と防御のバランスが子宮内での競合的な精子選抜を引き起こし、これによって選ばれた精子が卵管で待つ卵と受精可能となる仕組みがあると考えられ、この結果は子宮と精漿の役割に関するこれまでの知見を覆すものである（吉田、宮戸ほか：PNAS (2014)）。

1. Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, T., Ohnami, N., Makino, M., Kanai S., Hasuwa, H., *Yoshida, M., *Miyado, K., and Umezawa, A. (2014) Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 4145-4150. doi: 10.1073/pnas.1320715111
2. *Matsumori, N., Hiradate, Y., Shibata, H., Oishi, T., Simma, S., Toyoda, M., Hayashi, F., *Yoshida, M., *Murata, M., and *Morisawa, M. (2013). A Novel Sperm-Activating and Attracting Factor (SAAF) from the Ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Org. Lett.*, 15, 294-297.
3. Sensui, N., *Yoshida, M. and Tachibana, K. (2012). Role of Mos/MEK/ERK cascade and Cdk1 in Ca²⁺ oscillations in fertilized ascidian eggs. *Dev. Biol.*, 367, 208-215.

9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

【主な論文等一覧について】

計画研究代表者・分担者 2009 年度以降、公募研究代表者 2010 年度以降の論文を合わせて 508 報発表している。そのうち代表的な文献を示す。

《計画研究》

1. *Sawada, H., Morita, M., and Iwano, M. (2014). Self/Non-self recognition mechanisms in sexual reproduction: New insight into the self-incompatibility system shared by flowering plants and hermaphroditic animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
2. *Iwano, M., Igarashi, M., Tarutani, Y., Kaothien-Nakayama, P., Nakayama, H., Moriyama, H., Yakabe, R., Entani, T., Shimamoto-Asano, H., Ueki, M., Tamiya, G., and Takayama, S. (2014) A pollen coat-inducible autoinhibited Ca^{2+} -ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell* 26, 636-649.
3. Treen, N., Yoshida, K., Sakuma, T., Sasaki, H., Kawai, N., Yamamoto, T., *Sasakura, Y. (2014). Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in *Ciona* by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development* 141, 481-487.
4. Iitsuka, T., Mita, K., Hozumi, A., Hamada, M., Satoh, N., *Sasakura, Y. (2014). Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Scientific Reports* in press.
5. Kawano, N., *Miyado, K., Yoshii, N., Kanai, S., Saito, H., Miyado, M., Inagaki, N., Odawara, Y., *Hamatani, T., and Umezawa, A. (2014). Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Scientific Reports* 4, 4701.
6. Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, K., Ohnami, N., Makino, M., Kanai, S., Hasuwa, H., *Yoshida, M., *Miyado, K., and Umezawa, A. (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 4145-4150.
7. *Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S.Y., and *Berger, F. (2014) Gamete Attachment Requires GEX2 for Successful Fertilization in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 24, 170-175.
8. Otsuka K., Yamada, L., and *Sawada, H. (2013). cDNA cloning, localization, and candidate binding partners of acid-extractable vitelline-coat protein Ci-v-Themis-like in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 840-848
9. Jin, Y., Yaguchi, S., Shiba, K., Yamada, L., Yaguchi, J., Shibata, D., Sawada, H., *Inaba, K. (2013). Glutathione transferase theta in apical ciliary tuft regulates mechanical reception and swimming behavior of Sea Urchin Embryos. *Cytoskeleton* 70, 453-470.
10. Inoue, N., Hamada, D., Kamikubo, H., Hirata, K., Kataoka, M., Yamamoto, M., Ikawa, M., Okabe, M., and *Hagihara, Y. (2013). Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 140, 3221-3229..
11. Abiko M., Furuta K., Yamauchi Y., Fujita C., Taoka M., Isobe T., and *Okamoto, T. (2013). Identification of proteins enriched in rice egg or sperm cells by single-cell proteomics. *PLoS ONE* 8(7), e69578
12. Abiko M., Maeda H., Tamura K., Hara-Nishimura I. and *Okamoto, T. (2013). Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: Identification of gamete-enriched genes and up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization. *J. Exp. Bot.* 64, 1927-1940.
13. Saito, T., Shiba, T., Inaba, K., *Yamada, L., and *Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 4158-4162.
14. Lai, K.-S. Kaothien-Nakayama, P., Iwano, M., and *Takayama, S. (2012). A TILLING resource for functional genomics in *Arabidopsis thaliana* accession C24. *Genes Genet. Syst.* 87, 291-297.
15. *Iwano, M. and *Takayama S. (2012). Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 78-83.
16. Mizuno, K., Shiba, K., Okai, M., Takahashi, Y., Shitaka, Y., Oiwa, K., Tanokura, M., *Inaba, K. (2012). Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca^{2+} -mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20497-502.
17. Ohnami, N., Nakamura, A., Miyado, M., Sato, M., Kawano, N., Yoshida, K., Harada, Y., Takezawa, Y., Kanai, S., Ono, C., Takahashi, Y., Kimura, K., Shida, T., *Miyado, K., and Umezawa, A. (2012). CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open* 1, 640-647.
18. Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J. Cell Sci.* 125(Pt 21), 4985-4990.
19. Fujihara, Y., Satouh, Y., Inoue, N., Isotani, A., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2012). SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* 139, 3583-3589.
20. *Inoue, N., Nishikawa, T., Ikawa, M., Okabe, M. (2012). Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. *Fertil. Steril.* 98, 465-470.
21. Nakachi, M., Nakajima, A., Nomura, M., Yonezawa, K., Ueno, K., Endo, T., *Inaba, K. (2011). Proteomic profiling reveals compartment-specific, novel functions of ascidian sperm proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 529-549.
22. Zhu, L., *Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca^{2+} signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 920-929.
23. *Endo, T., Ueno, K., Yonezawa, K., Mineta, K., Hotta, K., Satou, Y., Yamada, L., Ogasawara, M., Takahashi, H., Nakajima, A., Nakachi, M., Nomura, M., Yaguchi, J., Sasakura, Y., Yamasaki, C., Sera, M., Yoshizawa, A.C., Imanishi, T., Taniguchi, H., and Inaba, K. (2011). CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* protein database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with user rating and renewing functionalit. *Nucleic Acids Res.* 39 (Suppl. 1), 807-814.
24. *Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T.G., Satoh, N., and Sasakura, Y. (2011). Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells from the adult nervous system. *Nature* 469, 525-528.
25. Takezawa, Y., Yoshida, K., *Miyado, K., Sato, M., Nakamura, A., Kawano, N., Sakakibara, K., Kondo, T., Harada, Y., Ohnami, N., Kanai, S., Miyado, M., Saito, H., Takahashi, Y., Akutsu, H., and Umezawa, A. (2011). β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports*. 1 (Article 68), doi: 10.1038/srep00068.

26. Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., *Okabe, M., and *Yanagimachi, R. (2011) Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20008-20011.
27. *Ikawa, M., Tokuhira, K., Yamaguchi, R., Benham, A. M., Tamura, T., Wada, I., Satouh, Y., Inoue, N., and Okabe, M. (2011). Calsperin is a testis-specific caperone required for sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 286, 5639-5646.
28. *Okamoto T. (2011). In vitro fertilization with isolated rice gametes: production of zygotes and zygote and embryo culture. *Methods Mol. Biol.* 710, 17-27.
29. Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and *Takayama, S. (2010). Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility. *Nature* 19, 983-986.
30. Fujihara, Y., Murakami, M., Inoue, N., Satouh, Y., Kaseda, K., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2010). Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J. Cell Sci.* 123, 1531-1536.
31. Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., and *Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.* 120, 984-994.
32. Inoue, N., Kasahara, T., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2010). Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PLoS One* 5, e10301.
33. *Okamoto T. (2010). Gamete fusion site on the egg cell and autonomous establishment of cell polarity in the zygote. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1464-1467.
34. Nakajima K., Uchiyama T. and *Okamoto T. (2010). Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *J. Exp. Bot.* 61, 3101-3105.
35. Sato A., Toyooka K., and *Okamoto T. (2010). Asymmetric cell division of rice zygotes located in embryo sac and produced by in vitro fertilization. *Sex Plant Reprod.* 23, 211-217.
36. *Mori, T., Hirai, M., Kuroiwa, T., and Miyagishima, S.Y. (2010). The functional domain of GCS1-based gamete fusion resides in the amino terminus in plant and parasite species. *PLoS One* 5, e15957.
37. *Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., and Takayama, S. (2009). Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol.* 150, 1322-1334.
38. Kimura, M., Ishida, K., Kashiwabara, S., and *Baba, T. (2009). Characterization of two cytoplasmic poly(A)-binding proteins, PABPC1 and PABPC2, in mouse spermatogenic cells. *Biol. Reprod.* 80, 545-554.
39. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T., and *Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3'-adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* 23, 433-438.
40. Klajn, A., Ferrai, C., Stucchi, L., Prada, I., Podini, P., Baba, T., Rocchi, M., Meldolesi, J., and *D'Alessandro, R. (2009). The REST repression of the neurosecretory phenotype is negatively modulated by BHC80, a protein of the BRAF/HDAC complex. *J. Neurosci.* 29, 6296-6307.

《公募研究》

1. Ueno, T., Ohgami, T., Harada, Y., Ueno, S., and *Iwao, Y. (2014). Egg activation in physiologically polyspermic newt eggs: involvement of IP3 receptor, PLCγ and microtubules in Ca²⁺ wave induction. *Int. J. Dev. Biol.* in press.
2. Mahbub Hasan, A.K.M., Hashimoto, A., Maekawa, Y., Matsumoto, T., Kushima, S., Ijiri, T.W., Fuakmi, Y., *Sato, K. (2014). The egg membrane microdomain-associated uroplakin III-Src system becomes functional during oocyte maturation and is required for bidirectional gamete signaling at fertilization in *Xenopus laevis*. *Development* 141, 1705-14.
3. Shiba, K., Shibata, D., *Inaba, K. (2014) Autonomous changes in the swimming direction of sperm in the gastropod *Strombus luhuanus*. *J. Exp. Biol.* 217(Pt 6), 986-96.
4. Nozoye T., Nagasaka S., Bashir K., Takahashi, M., Kobayashi T., Nakanishi H., and *Nishizawa, N.K. (2014). Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXφ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *Plant J.* 77, 246-60.
5. Arakawa, M., Takeda, N., Tachibana, K., and *Deguchi, R. (2014). Polyspermy block in jellyfish eggs: Collaborative controls by Ca²⁺ and MAPK. *Dev. Biol.* in press.
6. Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B. J. S. C., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A. and *Nozaki, H. (2014). Sex-specific posttranslational regulation of the gamete fusogen GCS1 in the isogamous volvocine alga *Gonium pectorale*. *Eukaryotic Cell* 13, 648-656.
7. Yoshida M.A., Yamada, L., Ochi H, Iwata Y, Tamura-Nakano M, Sawada, H., Sauer WH, Ogura A, and *Hirohashi, N. (2014). Integrative omics analysis reveals differentially distributed proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press.
8. Goto-Yamada, S., Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Yamawaki, R., Kato, A., and *Nishimura, M. (2014). Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the peroxisomal transition and degradation with autophagy. *Plant Cell Physiol.* 55, 482-496.
9. Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., *Kohchi, T. (2014). Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat. Comm.* 5, 3688.
10. Imoto, Y., Kuroiwa, H., Yoshida, Y., Ohnuma, M., Fujiwara, T., Yoshida, M., Nishida, K., Yagisawa, F., Hirooka, S., Miyagishima, SY., Misumi, O., Kawano, S., and *Kuroiwa, T. (2013). Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9583-9588.
11. Wayama, M., Ota, S., Matsuura, M., Nango, N., Hirata, A., and *Kawano, S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8, e53618
12. Hiyama, G., Matsuzaki, M., Mizusima, S., Dohra, H., Ikegami, K., Yoshimura, T., Shiba, K., Inaba, K., and *Sasanami, T. (2013). Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* 147, 167-178.
13. Okada T., Hu Y., Tucker M.R., Taylor J.M., Johnson S.J, Spriggs A., Tsuchiya, T., Oelkers K., Roderiques J.C.M. and *Koltunow A.M.G. (2013). Enlarging cells initiating apomixis in *Hieracium praecaltum* transition to an embryo sac program prior to entering mitosis. *Plant Physiol.* 163, 216-231.
14. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado, K. and *Toshimori, K. (2013). Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 352(3):739-750.
15. Arakaki, Y., Kawai-Toyooka, H., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Noga, A., Hirono, M., Olson, B. J. S. C. and *Nozaki, H. (2013). The simplest integrated multicellular organism unveiled. *PLoS One* 8, e81641.

16. *Hamaji, T., Ferris, P. J., Nishii, I., Nishimura, Y. and Nozaki, H. (2013). Distribution of the sex-determining gene MID and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus *Gonium* (Volvocales, Chlorophyta). *PLoS One* 8, e64385.
17. Hiraide, R., Kawai-Toyooka, H., Hamaji, T., Matsuzaki, R., Kawafune, K., Abe, J., Sekimoto, H., Umen, J. and *Nozaki, H. (2013). The evolution of male-female sexual dimorphism predates the gender-based divergence of the mating locus gene MAT3/RB. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 1038-1040. Cover.
18. Tasaka, K., Yokoyama, N., Nodono, H., Hoshi M., and *Matsumoto, M. (2013). Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *International Journal of Developmental Biology* 57, 69-72
19. Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and *Nishimura, M. (2013). Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 25, 4967-4983.
20. Cui, S., Fukao, Y., Mano, S., Yamada, Y., Hayashi, M., and *Nishimura, M. (2013). Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEROXIN 7. *J. Biol. Chem.* 288, 6014-6023.
21. Fu, G., Nagasato, C., Ito, T., Müller, D. G. and *Motomura, T. (2013) Ultrastructural analysis of flagellar development in plurilocular sporangia of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Protoplasma* 250, 261-272.
22. *Matsumori, N., Hiradate, Y., Shibata, H., Oishi, T., Simma, S., Toyoda, M., Hayashi, F., *Yoshida, M., *Murata, M, and *Morisawa, M. (2013). A Novel Sperm-Activating and Attracting Factor (SAAF) from the Ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Org. Lett.*, 15, 294-297.
23. Araki, Y., Shimizu, H.D., Saeki, K., Okamoto, M., Yamada, L., Ishida, K., Sawada, H., and *Urushihara, H. (2012). A surface glycoprotein indispensable for gamete fusion in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* 11, 638-644.
24. *Sasanami, T., Sugiura, K., Tokumoto, T., Yoshizaki, N., Dohra, H., Nishio, S., Mizushima, S., Hiyama, G., and Matsuda, T. (2012). Sperm protease degrades egg envelope glycoprotein ZP1 during fertilization of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* 144, 423-431.
25. Kihira S, Yoshida J, Kawada Y, Hitomi Y, Asada T, Hisatomi R, Ohta A, Iwasaki T, Mahbub Hasan AKM, Fukami Y, and *Sato, K. (2012). Membrane microdomain-associated uroplakin IIIa contributes to Src-dependent mechanisms of anti-apoptotic proliferation in human bladder carcinoma cells. *Biology Open* 1, 1024-1034.
26. Mizuno, K., Shiba, K., Okai, M., Takahashi, Y., Shitaka, Y., Oiwa, K., Tanokura, M., and *Inaba, K. (2012). Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 20497-502.
27. *Sekimoto, H., Abe, J., and Tsuchikane, Y. (2012). New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297, 309-338.
28. *Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindák, F., Nozaki, H., and Sekimoto, H. (2012). Zygosporangium formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. *Sex Plant Reprod.* 25, 1-9
29. Mogi, Y., Hamaji, T., Suzuki, M., Ferris, P., Mori, T., Kabeya, Y., Miyagishima, S. and *Nozaki, H. (2012). Evidence for tubular mating structures induced in each mating type of heterothallic *Gonium pectorale* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 48, 670-674.
30. Isaka, N., Kawai-Toyooka, H., Matsuzaki, R., Nakada, T. and *Nozaki, H. (2012). Description of two new monoecious species of *Volvox* sect. *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae), based on comparative morphology and molecular phylogeny of cultured material. *J. Phycol.* 48, 759-767.
31. *Okumura H., Fukushima H., Momoda M., Ima Y., Matsuda, T., and Ujita M. (2012). Diverse lectin-binding specificity of four ZP3 glycoprotein isoforms with a discrete isoelectric point in chicken egg coat. *Biochem Biophys Res Commun.* 424, 586-592.
32. Nodono, H., and *Matsumoto, M. (2012). Reproductive mode and ovarian morphology regulation in chimeric planarians composed of asexual and sexual neoblasts. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 451-460.
33. *Hoshi, M., Moriyama, H., and Matsumoto, M. (2012). Structure of acrosome reaction-inducing substance in the jelly coat of starfish eggs: A mini review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425, 595-598.
34. Terauchi, M., Nagasato, C., Kajimura, N., Mineyuki, Y., Okuda, K., Katsaros, C. and *Motomura, T. (2012). Ultrastructural Study of Plasmodesmata in the Brown Alga *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Planta* 236, 1013-1026.
35. Sensui, N., *Yoshida, M., and Tachibana, K. (2012). Role of Mos/MEK/ERK cascade and Cdk1 in Ca²⁺ oscillations in fertilized ascidian eggs. *Dev. Biol.*, 367, 208-215.
36. Harada, Y., Kawazoe, M., Eto, Y., Ueno, S., and *Iwao, Y. (2011). The Ca²⁺ increase by the sperm factor in physiologically polyspermic newt fertilization: Its signaling mechanism in egg cytoplasm and the species-specificity. *Dev. Biol.* 351, 266-276.
37. *Kakeda, K., Ishihara, N., Izumi, Y., Sato, K., and Taketa, S. (2011). Expression and functional analysis of the barley Nud gene using transgenic rice. *Breeding Science* 61, 35-42.
38. Matsushima, R., Tang, L.Y., Zhang, L., Yamada, H., Twell, D., and *Sakamoto, W. (2011). A conserved, Mg²⁺-dependent exonuclease degrades organelle DNA during *Arabidopsis* pollen development. *Plant Cell* 23, 1608-1624.
39. Ito, T., Yoshizaki, N., Tokumoto, T., Ono, H., Yosimura, T., Tsukada, A., Kansaku, N., and *Sasanami, T. (2011) Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm storage tubules in birds. *Endocrinology* 152, 3952-3962.
40. Hasan AK, Fukami Y, and *Sato, K. (2011). Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling. *Mol Reprod. Dev.* 78, 814-830.
41. Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., and *Nishizawa, N. K. (2011). Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* 286, 5446-5454.
42. *Nishimura, H., Gupta, S., Myles, D. G., and Primakoff, P. (2011). Characterization of mouse TMEM190, a small transmembrane protein with the trefoil domain: Evidence for co-localization of IZUMO1 and complex formation with other sperm proteins. *Reproduction* 141, 437-451.
43. Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and *Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4892-4896.
44. Iwata, Y., Shaw, P., Fujiwara, E., Shiba, K., Kakiuchi, Y., *Hirohashi, N. (2011) Why small males have big sperm: dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. *BMC Evolutionary Biology*, 11(236), 10.1186.
45. Naruse, M., Ishikawa, R., Sakaya, H., Moriyama, H., Hoshi, M., and *Matsumoto, M. (2011). Novel conserved structures, acrosome reaction-inducing substance (ARIS) domains, are widespread in invertebrates. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 57-66.
46. Goto, S., Mano, S., Nakamori C., and *Nishimura, M. (2011). *Arabidopsis* ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY 9 is a peroxin that recruits the PEX1-PEX6 complex to peroxisomes. *Plant Cell* 23, 1573-1587.
47. *Mano, S., Nakamori, C., Fukao, Y., Araki, M., Matsuda, A., Kondo, M., and *Nishimura, M. (2011) A defect of peroxisomal membrane protein 38 causes enlargement of peroxisomes. *Plant Cell Physiol.* 52, 2157-2172.
48. Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Yoshida, M., Ohnuma, M., Fujiwara, T., Yagisawa, F., Hirooka, S., Imoto, Y., Matsushita, K., Kawano, S. and *Kuroiwa, T. (2010). Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. *Science* 329, 949-953.

49. *Tsuchikane, Y., Kokubun, Y., and *Sekimoto, H. (2010). Characterization and Molecular Cloning of Conjugation-regulating Sex Pheromones in Homothallic *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 51, 1515-1523.
50. Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, *Nishizawa NK. Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for long distance transport of iron and manganese. *Plant J.* 62, 379-90. (2010)
51. Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Maekawa, M., Miyado, K., and *Toshimori, K. (2010). Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.* 340, 583-594.
52. Han, L., Monné, M., Okumura, H., Schwend, T., Cherry, A.L., Flot, D., Matsuda, T., and *Jovine, L. (2010). Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell* 143, 404-415.
53. Naruse, M., Suetomo, H., Matsubara, T., Sato, T., Yanagawa, H., Hoshi, M., and *Matsumoto, M. (2010). Acrosome reaction-related steroidal saponin, Co-ARIS, from the starfish induces structural changes in microdomains. *Dev. Biol.* 347, 147-153.
54. *Cock, M. J., et al. (Motomura, T., 77人中53番目). *Nature* 465, 617-621 (2010).
55. *Motomura, T., Nagasato, C. and Kimura, K. (2010). Cytoplasmic inheritance of organelles in brown algae. *J. Plant Res.* 123, 185-192.

【ホームページ】

《領域ホームページ URL: <http://allo-authentication.net/>》

当領域では発足当初より和英のホームページ (HP) を作成し、領域の組織・研究・活動情報等を広報してきた。また HP 内に、班員および領域関係者を中心に新着論文の紹介と評論を行う共有サイト Forum を立ち上げ、活発な議論を行ってきた。現在までの総投稿数は 160 件、またコメント数は 290 件、登録人数は 85 名に達している。この Forum を通じて情報の共有化と研究交流の活性化を図っており、90 件を超える領域内共同研究発足に貢献している。

HP への来訪者数はカウントを始めた 2010 年 11 月 14 日から 2014 年 3 月の 3 年 5 ヶ月間で、合計約 2.2 万件であった。アクセス件数が突出して多かった時期は、領域ニュースレター (2-6 号) を配布した時期、公開講演会ポスターを配布した時期と重なる。特に 2012 の国際会議開催前後、下村教授講演会告知の時期には非常に多数のアクセスがあった。また、月平均のアクセス数は 528.7 となり、ホームページ・Forum を通じて活発に情報提供や意見交換が行われたことがわかる。

【ニュースレター】

HP の活用による広報活動に加え、ニュースレターを合計 6 回発行し、学内外関係者および各種研究教育機関へ配布し、本新学術領域研究を広く認知・理解してもらえよう努めた。また冊子に加えて、誰でも HP で閲覧できるようにした。

- ・第 1 号(2010.06) : 計画班員・公募班員全員の研究概要を紹介。
- ・第 2 号(2010.12) : 各班員が共同研究の提案や実験技術の紹介。
- ・第 3 号(2011.08) : 領域内で発足した共同研究の成果を中心に、領域内の最新研究情報を掲載。共同研究の進捗状況報告(1)
- ・第 4 号(2012.06) : 国際会議開催に向け、海外からの招待講演者の研究内容・論文などを紹介。新公募班員 4 人の班員の研究や到達目標などを掲載。共同研究の進捗状況報告(2)
- ・第 5 号(2013.06) : 国際会議発表者全員による領域研究成果の紹介。共同研究の進捗状況報告(3)
- ・第 6 号(2014.02) : 最終号-本領域の今後の発展を担う、若手研究者の紹介を特集した (右上図: 第 6 号の表紙)。



【シンポジウム・領域会議・国際会議】

本領域が主催 (共催) したシンポジウム等は 22 件であった。その内訳は、国内 20 件、国際 2 件である。

- 1) 平成 21 年度日本動物学会中部支部大会シンポジウム「動植物の生殖生物学における新展開」
2009 年 8 月 1 日 梶山女学園大学 (名古屋) 参加者: 約 100 名、講演 6 件
- 2) 第 82 回日本生化学会大会シンポジウム「動植物におけるアロ認証機構」
2009 年 10 月 23 日 神戸ポートピアホテル (神戸) 参加者数: 約 150 名、演題 (口頭発表 7 件)
- 3) 第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ「動植物の受精とアロ認証機構」
2009 年 12 月 10 日 パシフィコ横浜 (横浜) 参加者数: 約 150 名、演題 (10 件)
- 4) 第 1 回国際シンポジウム「Intercellular Recognition and Allogeneic Authentication: Perspectives of Reproduction Mechanisms Shared by Animals and plants」2010 年 1 月 14 日 八事サーウィンストンホテル (名古屋)
参加者数: 77 名 (内 9 名外国人) 演題 (招待講演 14 件、ポスター発表 56 件、海外招聘者 6 名、国内招聘者 8 名)
- 5) 第 1 回領域会議 2010 年 7 月 14 日-15 日 名古屋大学野依記念学術交流館 (名古屋)
参加者数: 97 名 (内 1 名外国人) 演題 (招待講演 1 件、口頭発表 30 件、ポスター発表 21 件)
- 6) 第 4 回生殖研究 ワークショップ (主催: 生殖若手の会) 2010 年 8 月 18 日-20 日 筑波大学下田臨海実験センター (下田) 参加者数: 約 100 名 演題 (口頭発表 16 件、ポスター発表 29 件)
- 7) 第 81 回日本動物学会シンポジウム「植物から学ぶ動物の受精機構: 動植物共通のアロ認証機構を考える」
2010 年 9 月 24 日 東京大学駒場キャンパス (東京) 参加者数: 約 100 名 演題 (口頭発表 8 件)
- 8) 第 17 回臨海若手の会 2010 年 9 月 26 日-27 日 東京大学大学院理学系研究科附属臨海実験所 (三浦)
参加者数: 73 名 (内 1 名外国人) 演題 (招待講演 1 件、特別講演 1 件、口頭発表 15 件、ポスター発表 0 件)

- 9) 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会ワークショップ「動植物に共通するアロ認証中核原理を探る」2010 年 12 月 7 日（金）神戸ポートピアホテル（神戸）参加者数：約 150 名、演題（口頭発表 7 件）
- 10) 第 2 回領域会議 2011 年 1 月 11 日-13 日 下呂温泉山形屋（下呂市）
参加者数：67 名（内 2 名外国人）演題（招待講演 3 件、口頭発表 10 件、ポスター発表 23 件）
- 11) 第 3 回領域会議 2011 年 6 月 30 日-7 月 1 日 関西セミナーハウス（京都）
参加者数：81 名（内 2 名外国人）演題（招待講演 1 件（演者：吉崎悟朗）、口頭発表 10 件、ポスター発表 25 件）
- 12) 第 75 回日本植物学会シンポジウム「有性生殖の共通メカニズムを探る：原生物から高等動物まで」2011 年 9 月 18 日 東京大学教養学部（東京都）参加者数：70 名、演題（口頭発表 6 件）
- 13) 第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ「Allogeneic authentication: Molecular mechanisms of cell recognition and fertilization（アロ認証：細胞間識別と受精の分子メカニズム）」2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜（横浜）
参加者数：約 150 名 演題（口頭発表 6 件）
- 14) 第 4 回領域会議 2012 年 1 月 10 日-12 日 筑波大学（つくば市）
参加者数：92 名 演題（招待講演 2 件（演者：瀬原淳子、佐藤矩行）、口頭発表 32 件、ポスター発表 32 件）
- 15) 第 5 回領域会議 2012 年 6 月 12 日-14 日 下田東急ホテル（下田市）
参加者数：69 名 演題（招待講演 2 件（演者：宮脇敦史、堀川一樹）、口頭発表 26 件、ポスター発表 14 件）
- 16) 第 2 回国際シンポジウム（第 6 回領域会議を兼ねる）「International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants」2012 年 11 月 12-16 日 ホテル名古屋ガーデンパレス（名古屋）参加者数：153 名（内 30 名外国人）演題（招待講演 45 件、ポスター発表 58 件、海外招聘者 17 名、国内招聘者 6 名）
- 17) 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会シンポジウム「S-4 バイオイメージングにより明らかにされた動・植物の有性生殖メカニズム」2012 年 5 月 14 日 つくば国際会議場（つくば市）参加者数：約 1000 名 演題（招待講演 5 件：年森清隆、宮戸健二、東山哲也、澤田均、岩野恵）
- 18) 第 7 回領域会議 2013 年 6 月 1 日-3 日 くにびきメッセ（松江市）参加者数：61 名
演題（招待講演 4 件（演者：柳町隆造、小林一也、伊川正人、中島敬二）、口頭発表 25 件、ポスター発表 16 件）
- 19) 第 1 回アロ認証若手の会 2013 年 6 月 4 日-5 日 島根大学 隠岐臨海実験所（隠岐）参加者数：20 名
演題（招待講演 4 件（演者：柳町隆造、小林一也、伊川正人、中島敬二）、口頭発表 25 件）
- 20) 日本動物学会 84 回大会シンポジウム「受精機能と生殖戦略の進化～藻類から脊椎動物まで」2013 年 9 月 26 日 岡山大学（岡山）参加者数：約 100 名 演題（オーガナイザー：岩尾康宏、佐藤賢一、口頭発表 6 件）
- 21) 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「アロ認証から生殖タクティクスへ：動植物域を超えた生殖戦略」2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場（神戸）参加者：約 150 名 講演 9 件
- 22) 第 8 回領域会議 2014 年 1 月 8 日-10 日 名古屋大学（名古屋市）
参加者数：86 名 演題（招待講演 3 件（演者：吉村崇、木下哲、三浦郁夫）、口頭発表 24 件、ポスター発表 26 件）



【アウトリーチ活動】

シンポジウムの他に、一般向けにも公開講演会や出張講義、公開実習等を行い、国民との科学・技術対話を目指した。以下は領域主催で行った公開講演会と、領域長によるアウトリーチ活動を記載する。他に各々の領域メンバーにより、「一般市民向け」「高校教諭向け」「中学高校生向け」など、対象者を絞って公開講座や講義を有効に行われた。

- 1) 公開講演会「動物と植物の生殖のしくみ：その不思議な世界」
2011 年 6 月 4 日 名古屋大学理学南館大講堂、参加費：無料
演者：東山 哲也（名古屋大学）「植物の泳げない精子：どうやって卵細胞と受精する？」、澤田 均（名古屋大学）「ホヤの受精機構：雌雄同体なのになぜ自家受精しないのか」、岩野 恵（奈良先端科学技術大学院大学）「アブラナにおける自家不和合性：なぜ自家受精しないのか」、宮戸 健二（国立成育医療研究センター）「マウスの受精機構：精子と卵の融合に秘められた謎」、参加者：約 110 名（アンケート回収：88 件）属性：性別（男 37 名、女 44 名、不明 7 名）、年齢（20 歳未満 14 名、20 代 21 名、30 代 11 名、40 代 20 名、50 歳以上 22 名）
体験実習企画：休憩時間にホヤやウニを見たり触ったりする企画を実施した。
- 2) 公開講演会「蛍光タンパク質の発見と生命科学研究への応用」
2011 年 10 月 2 日 名古屋大学理学南館大講堂（名古屋）
参加者数：約 150 名 演題（特別講演 1 件（演者：下村脩）講演 3 件（東山哲也、岡部勝、吉崎悟朗））



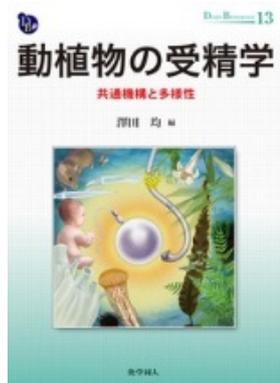
講演内容：ノーベル賞受賞者の下村先生を特別講演者として迎え、エクオリンと GFP の発見に至った研究・思い話を、一般人、若手研究者にも分かり易く講演していただいた。

- 3) ひらめき☆ときめきサイエンス「海の生物を採集し受精発生のしくみを調べてみよう」2011年8月28日 名古屋大学菅島臨海実験所（鳥羽市）参加者数：18名 実習内容：磯採集、分類学実習、ウニの受精発生実験、実習講義
- 4) サイエンスカフェ” Science and Me”「ホヤって何？-ホヤの受精研究に魅せられて-」2012年8月8日 名古屋市中区錦「アルテゴ ドウ ショウズ」（名古屋）参加者数：約20名 実習内容：喫茶店で軽食を取りながら、ホヤの受精研究について紹介した。
- 5) 名古屋大学オープンレクチャー2013 「動物と植物の生殖の話」（名古屋）参加者9名
- 6) ひらめき☆ときめきサイエンス「磯の生物を採集し受精発生のしくみを探る」2014年8月10日 名古屋大学菅島臨海実験所（鳥羽市）（開催予定）

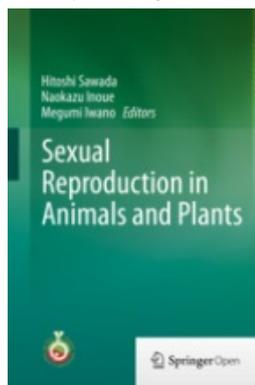


【著書】

領域活動の総決算として、班員全員の執筆による書籍が発刊され、和文と英文とで一般情報発信されている。後者は本領域が主催した国際会議のプロシーディングスで、電子版はHPから全ページ無料でダウンロードできる。



動植物学の受精学
-共通性と多様性-
澤田 均 編
化学同人(2014)



Sexual Reproduction in Animals and Plants
Edited by Sawada, H.,
Inoue, N., and Iwano, M.
Springer Japan (2014)

【報道】

55件の報道のうち、代表的なものを示す。

- 読売新聞（2014年3月27日）「変異80倍のマラリア原虫」群大院作成・治療法確立に期待（平井）
朝日新聞（2014年4月7日）「精子を守る...精液の役割、マウスで判明 不妊治療に光？」（宮戸・吉田）
読売新聞（2013年4月23日）「生物の受精メカニズムを分子レベルで謎解く」（森）
NHK Eテレ（2013年1月25日）10min ボックス・理科2分野「生殖」（岡本）
日経新聞、日刊工業新聞（2013年1月23日）「電顕3D画像の構築」（河野）
日経産業新聞（2012年11月21日）「精子の運動制御たんぱく質発見」（稲葉）
日本経済新聞（2012年3月21日）精子、卵子の膜2回通過「1回限り」の定説覆す（井上）
朝日新聞WEB版（2012年1月14日）「ヤリイカは小型の雄に大きな精子 なぜ？」（広橋）
日刊工業新聞（2011年6月17日）「植物細胞内部のたんぱく質輸送関連遺伝子発見」（真野）
日本経済新聞（2011年1月3日）「ホヤ幼生の中樞神経 成長後も残存筑波大など発見「消失」の仮定覆す」（笹倉）
中日新聞（2010年10月22日）「卵細胞包む透明帯：精子侵入のカギを解明 名大教授ら ZP3 結合部位特定」（松田）
NHK おはよう日本（2010年4月16日）「オスとメス別に進化 証拠発見」（野崎）

【産業財産権】（7件）

- 松田 幹、西尾俊亮、新規プロテアーゼ精子、アクロシンに関する特許、特許出願 2014-087787, 2014年04月22日
北島 健、澤田 均、Yann Guerardel, Megraud Francis, Ferrand Jonathan,
海産動物由来ヘリコバクターピロリの胃上皮細胞への接着阻害剤、国際特許出願 EP 305 937.0, 2012年7月30日
植木優夫、田宮 元、遺伝子間相互作用解析システム、その方法及びプログラム、出願 2012-40646, 2012年2月27日
宮戸 健二、梅澤 明弘、細胞の造腫瘍性試験方法及び腫瘍マーカー、特許出願 2010-215828, 2010年9月27日
宮戸 健二、宮戸 真美、阿久津 英憲、哺乳動物卵内への細胞外物質の導入促進剤及び導入方法、特許登録 4448172,
2010年1月29日
Akutsu Hidenori, Mami Miyado, Kenji Miyado, Promoter for introducing extracellular substance into mammalian
ovum and introduction method., No. 2006242041, Nov. 11, 2010. (国外特許登録)
目加田 英輔、宮戸 健二、立花 功、武田 吉人、CD9/CD81 二重欠損非ヒト動物、特許登録 4696316, 2011年3月11日

【その他】

澤田 均 日本動物学会賞 受賞「ホヤの受精機構の研究」（2104年9月12日予定）（ホヤの受精機構に関するこれまでの研究成果と、動物と植物の融合領域研究分野を創成した功績が高く評価され、学会賞を受賞する運びとなった）

10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1ページ程度）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

本領域研究は、動物を対象とする生殖学研究者と、植物を対象とする生殖学者が、その垣根を越えて一堂に会して、動植物に共通するアロ認証機構の解明を目指して創成されたプロジェクトである。「既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成を目指す」という新学術領域研究の趣旨にまさに合致したプロジェクトといえる。評価委員からも、本領域研究の重要性を高く評価された。また、今までの研究業績に加えて、本新学術領域の創成が動物学の発展に多大な貢献をしたことが評価され、領域代表は、本年度の日本動物学会賞を受ける運びとなった。

領域会議や、ニュースレター、フォーラム、シンポジウム等を通して、動植物の生殖学全般に関する情報・意見交換や研究討論が活発に行えた点も大きな成果といえる。また、LC/MS/MSを用いたプロテオーム解析や、蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング解析、また生物の遺伝子改変技術の開発などの総括班からの支援活動も功を奏して、領域内での共同研究が活発に進んだ。さらに本領域内共同研究により、研究のブレイクスルーができたという研究課題もみられた。

まさに、「無」から「有」を生じる大きな成果であったといえる。本領域主催の国際会議においては、海外から多くの第一線の動植物生殖学研究者が名古屋に集まり、情報の共有化と意見交換が行えたことも大きな成果であった。また、他の研究分野への波及効果も極めて大きかったと思われる。夏期に、米国で開催されるゴードン会議「Fertilization and Activation of Development」では、今まで動物を対象とする研究者しか参加しなかったが、最近では本領域活動の影響もあり、植物学研究者の参加も増えつつある。これも波及効果の一つであり、本新学術領域研究が世界の生殖学研究を牽引している証ともいえる。

学会でのシンポジウム企画では、今まで学会で得られなかった情報を発信することができた点も評価できる。例えば、第81回日本動物学会では、「シンポジウム：植物から学ぶ動物の受精機構：動植物共通のアロ認証機構を考える」（2010年9月24日、東京）では、本領域構成員以外の動物学会参加者も植物学の情報を得ることができ、その波及効果も大きかったと思われる。また、その逆に、第75回日本植物学会では、「シンポジウムー有性生殖の共通メカニズムを探る：原生物から高等動植物までー」を企画し、動物の生殖学に関する情報を植物学研究者に発信することができた。このシンポジウムも、植物学研究者に与えた波及効果は大きかったと考えている。

アウトリーチ活動としては、領域主催の一般公開講演会を2回開催し、一般国民に最近の研究成果や領域活動を発信することができた。そのうちの一回は、ノーベル賞受賞者の下村脩先生を招聘し、海洋生物学研究や基礎生物学研究全般の重要性を一般国民や若手研究者にアピールできた点も評価できる。

本年3月には、和書「動植物の受精学：共通機構と多様性」を化学同人から発行することができた。動物と植物の生殖機構について1冊にまとめられた書物（総説集）は類例がなく、全く新しい企画となった。また、第2回国際会議のプロシーディングスを「Sexual Reproduction in Animals and Plants」（Springer）という書物として本年2月に発行することができ、本領域の成果を海外に発信することもできた。これらの活動も、一般国民や他分野研究者に大きな影響を与えると確信しており、波及効果も大であると考えている。