

領域略称名：生殖エピゲノム

領域番号：3502

平成27年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る中間評価報告書

「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」

(領域設定期間)

平成25年度～平成29年度

平成27年6月

領域代表者 (京都大学・医学研究科・教授・篠原 隆司)

目 次

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要	5
2. 研究の進展状況	7
3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況	10
4. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	11
5. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公开发表等）	14
6. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	19
7. 若手研究者の育成に関する取組状況	21
8. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	22
9. 総括班評価者による評価	23
10. 今後の研究領域の推進方策	25

研究組織

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関 部局 職	構成員数
X00	25112001 生殖細胞のエピゲノム ダイナミクスとその制 御	平成25年度～ 平成29年度	篠原 隆司	京都大学・医学研究科・教授	10
A01 計	25112002 RNA 制御を介した生殖 細胞の性特異的エピゲ ノムの確立	平成25年度～ 平成29年度	相賀 裕美子	国立遺伝学研究所・系統生物研究セ ンター・教授	3
A01 計	25112003 精子幹細胞のエピゲノ ム安定性と発がんとの 関係の解析	平成25年度～ 平成29年度	篠原 隆司	京都大学・医学研究科・教授	4
A01 計	25112004 生殖幹細胞の減数分裂 移行を制御するゲノム -エピゲノムプログラ ム	平成25年度～ 平成29年度	中馬 新一郎	京都大学・再生医科学研究所・准教 授	1
A02 計	25112005 小分子 RNA が誘導する エピゲノム形成の分子 機構	平成25年度～ 平成29年度	齋藤 都暁	慶應義塾大学・医学部・准教授	1
A02 計	25112006 着床前胚のエピゲノム ダイナミクスと制御	平成25年度～ 平成29年度	中村 肇伸	長浜バイオ大学・バイオサイエンス 学部・准教授	1
A02 計	25112007 受精を介した経世代エ ピゲノム変化の解明と 制御	平成25年度～ 平成29年度	伊川 正人	大阪大学・微生物病研究所・教授	5
A02 計	25112008 卵および初期胚のエピ ゲノム制御機構	平成25年度～ 平成29年度	東田 裕一	九州大学・稲盛フロンティア研究セ ンター・教授	2
A03 計	25112009 核移植技術を用いた生 殖サイクルのエピジェ ネティクス変化の解析	平成25年度～ 平成29年度	小倉 淳郎	独立行政法人理化学研究所・遺伝工 学基盤技術室・室長	2
A03 計	25112010 ゲノムインプリンティ	平成25年度～ 平成29年度	佐々木 裕之	九州大学・生体防御医学研究所・教 授	3

	ングと DNA メチル化のダイナミクスと制御				
計画研究 計 10 件					
A01 公	26112508 女性の生殖可能期間を支える原始卵胞活性化制御機構とエピゲノム修飾	平成 26 年度～ 平成 27 年度	鈴木 仁美	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・テニュアトラック助教	1
A01 公	26112509 H3K9 脱メチル化エピゲノムによる生殖細胞の機能制御	平成 26 年度～ 平成 27 年度	立花 誠	徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授	2
A01 公	26112511 piRNA を介したエピゲノム操作法の開発とその利用	平成 26 年度～ 平成 27 年度	宮川 さとみ	大阪大学・医学系研究科・特任講師	3
A01 公	26112512 Max 遺伝子発現コントロールによる生殖細胞発生プログラム誘導の分子メカニズム	平成 26 年度～ 平成 27 年度	奥田 晶彦	埼玉医科大学・医学部・教授	1
A01 公	26112513 GS 細胞を用いた雄性エピゲノム形成の分子基盤の解明と新規解析技術の開発	平成 26 年度～ 平成 27 年度	山中 総一郎	慶應義塾大学・医学部・助教	1
A01 公	26112514 始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング	平成 26 年度～ 平成 27 年度	関 由行	関西学院大学・理工学部・准教授	1
A01 公	26112515 発生転換点におけるエピゲノム形成とヒトマウス始原生殖細胞の比較エピゲノム解析	平成 26 年度～ 平成 27 年度	阿部 訓也	独立行政法人理化学研究所・疾患ゲノム動態解析技術開発チーム・チームリーダー	1
A02 公	26112502 ヒト生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御機構	平成 26 年度～ 平成 27 年度	岡江 寛明	東北大学・医学系研究科・助教	4

A02 公	26112503 マウス・ゲノム刷り込み 制御配列のエピゲノム ダイナミクス	平成26年度～ 平成27年度	谷本 啓司	筑波大学・生命環境科学研究科・教 授	2
A02 公	26112506 子宮－胚間の協調的な エピゲノム調節と胚の 活性化	平成26年度～ 平成27年度	廣田 泰	東京大学・医学部・助教	1
A02 公	26112507 母性 mRNA の分解に着 目したゲノムプログラ ミングの調節機構の 解明	平成26年度～ 平成27年度	青木 不学	東京大学・新領域創成科学研究科・ 教授	1
A02 公	26112516 非典型的ポリコーム群 MBLR 複合体による減 数分裂遺伝子のエピジ ェネティック制御	平成26年度～ 平成27年度	遠藤 充浩	広島大学・原爆放射線医科学研究 所・特任准教授	2
A03 公	26112517 ゲノム認識エピジェネ ティック変更化合物の 開発	平成26年度～ 平成27年度	永瀬 浩喜	千葉県がんセンター研究所・がん遺 伝創薬研究室・研究所長	1
公募研究 計 13 件					

研究領域全体に係る事項

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、応募時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。

研究目的

哺乳類の生殖細胞の研究は20世紀の半ばに初期胚の培養系の確立に始まり、現代に及ぶまで急速に発展してきている。In vitro fertilization法が開発され、ついには1978年に試験管ベビーの誕生に至った。現在の日本では30人に1人はこれらの補助生殖医療により生まれている。その後、生殖細胞の研究はさらにES細胞の樹立や核移植技術による体細胞クローンの誕生をもたらした。これらの研究からゲノムインプリンティング機構が発見され雌雄の生殖細胞の遺伝子情報が異なる制御を受けることが証明されただけでなく、卵子には体細胞の核をリプログラミングする能力があることが明らかとなった。また昨年には卵子の細胞質置換による

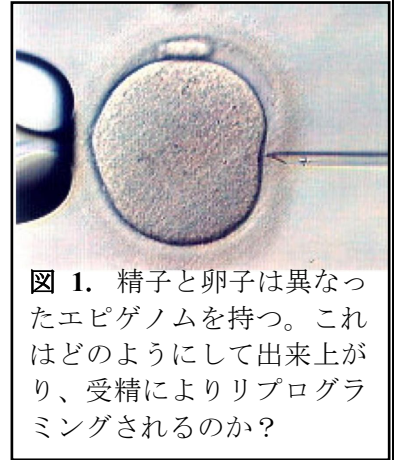


図1. 精子と卵子は異なったエピゲノムを持つ。これはどのようにして出来上がり、受精によりリプログラミングされるのか？

ミトコンドリア病の治療が英国議会で承認され、広くマスコミに取り上げられた。このように生殖細胞研究はその学問的な価値にとどまることなく、我々の生活様式に広汎な影響を及ぼしており、その研究は現在も新たな可能性を提供しつつある。

我が国ではこれまで特定領域研究(B)「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」(H11-14年度、領域代表者：中辻憲夫)、「生殖細胞の発生プロセス再プログラム化とエピジェネティクス」(H15-19年度、領域代表者：中辻憲夫)、「生殖細胞の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」(H19-24年度、領域代表者：佐々木裕之)において生殖細胞研究者が活発に相互作用する場を提供してきた。生殖細胞増幅法の開発とその多能性細胞への転換、雌ゲノムのみをもつ胚からの産子作出、生殖細胞決定因子の同定、多能性幹細胞からの子孫作出などはこれらの特定領域の研究代表者から報告された我が国発のオリジナルな研究成果であり、日本を生殖細胞研究分野で世界トップレベルに押し上げた。

特定領域研究の進展に伴い、急速に注目されるようになってきたのは生殖細胞の運命決定におけるエピジェネティック（後天的）な遺伝子制御の役割である。ヒストンのメチル化修飾研究は、2000年に動物細胞で初めてリジンのメチル化酵素の実体が明らかにされてスタートしたが、過去10年において数多くのヒストンメチル化・脱メチル化酵素が次々と同定された。またDNAメチル化とヒストン修飾の連動や生殖細胞特異的なsmall RNAによるDNAメチル化の誘導なども発見され、その詳細な分子メカニズムが明らかにされつつある。当初はクローン動物にエピジェネティックな異常が頻発することから関心が高まり、研究が加速した結果、高度に最終分化した配偶子が全能性を持つ受精卵を経て初期胚へと至るダイナミックなリプログラミングの過程にエピゲノム制御が果たす役割は非常に大きいことが分かって来た。生殖細胞はその発生・分化の過程で広汎なエピジェネティックな遺伝子発現変化が起こる点で体細胞とは大きく異なる。実際に生殖細胞には体細胞には存在しないような独自のエピジェネティック制御因子が同定されており、これらは生殖細胞の異なる発生ステージにおいて独自の「ネットワーク」を形成することが判明した。そしてその破綻は個体の発生異常や流産、不妊症を引き起こすことも明らかになってきた。

こうしたエピジェネティクス分野の発展と並行して、遺伝子の包括的発現解析や次世代シーケンス技術も急速に進歩してきた。クローン個体のような極端な異常でなくとも、補助生殖医療により生まれてきた一見「正常」だと考えられていた個体の一部にも、エピゲノムの異常が見られることも最近分かってきた。さらに、これまでは生殖細胞のもつエピゲノムは受精によりリセットされ、次世代に伝わらないとさ

れてきたが、この常識を覆す発見もなされつつある。例えば、親個体の生存環境の異常が生殖細胞に影響を及ぼし次世代で糖尿病や不妊症などが引き起こされる、いわゆる Epigenetic inheritance と呼ばれる現象はこれに相当する。数多くのエピゲノム制御因子が同定された今もこれら生殖細胞エピゲノムのリプログラミング異常の原因は分かっていない。このため、これまで行われていたエピゲノム制御因子の同定やその機能解析を超えた、時空間軸をふまえた4次元的な生殖細胞エピゲノムのダイナミクスを解析する必要があるが生じている。

研究構想

こうした背景から、領域代表者は生殖細胞研究の次の重要なテーマとして1) 時間軸に注目し、エピジェネティックネットワークが生殖系列細胞の発生過程においてどのように形成・維持されるのか、その分子機構の解明を明らかにする必要があると考えた。特に次世代シーケンサーの機能向上により 500 個程度の少数の細胞でも全ゲノムのメチル化シーケンスを決定できるようになってきた現在、個々の細胞のエピゲノムの状態の解析と既に多く同定されたエピゲノム制御分子のどれが鍵分子となり、どのような「文法」に従い、生殖細胞の運命決定に影響するかを見いだすことは次の最重要課題である。

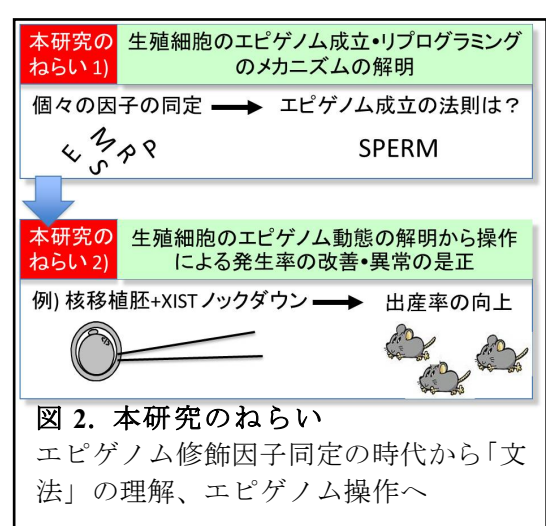
もう一つの重要な研究目標は、2) 生殖細胞のエピゲノム操作である。例えば、小倉（計画）は核移植クローンの遺伝子発現の乱れをゲノムワイドで解析し、その原因が X 染色体からの遺伝子発現異常にあることを発見した (*Science* 2010)。さらに小倉らは X 染色体の遺伝子発現制御因子である XIST 遺伝子を発現抑制することで X 染色体遺伝子の発現を改善させ、核移植クローンの産仔作製率を 10 倍程度向上させた。この例に限らずヒト悪性腫瘍に対して DNA メチル化やヒストン修飾酵素阻害薬を用いる治療法が確立されつつある。これらの事実を鑑みると、エピゲノムの乱れによる遺伝子発現異常を外来操作により正常化・機能改善できる可能性が現実化しつつある。こうした生殖細胞のエピゲノム操作を生殖細胞のもつ可能性を引き出していくためのもう一つの重要課題として位置づけ、当領域で推進する。

我が国の学術水準の向上・強化につながる新たな研究領域の創成

エピジェネティクス研究は今や国際的なものとなり、2010 年には国際ヒトエピゲノムコンソーシウムが発足し、ヒトエピゲノムの包括的な解析を開始した (佐々木（計画）が参加)。国際的に激しい競争の中にある当該分野において継続的に質の高い独創的な研究を続けるには、「新学術領域」として生殖細胞研究者とエピジェネティクス分野に実績のある研究者とが分野横断的に協力する必要がある。また「生殖エピゲノム」は流産、不妊症、動物の妊孕性改善などの生殖に関連する幅広い分野の発展に直接関連する。特にクローン動物作製や補助生殖医療のエピゲノム形成に及ぼす影響という問題の研究については学問的・社会的要請が高く、そのリスクや可能性についても実験動物を用いた更なる基礎研究を必要とする。

どのような取り組みを通じて当該領域をどのように発展させるか

本研究領域ではシンポジウムや若手主催合宿などの一般的な取り組みに加え、個別研究では不可能な成果を生み出すため、近年飛躍的に高度化した生殖細胞操作技術とエピゲノム解析技術について、他の参加者に支援と共同研究を推進している。1) 佐々木（計画）・幸田（計画・分担）によるエピゲノム解析、2) 小倉（計画）による顕微授精・核移植、3) 伊川（計画）による遺伝子改変マウス作製支援は世界のトップレベルであり、研究室が小さく、リソースが少ない若手研究者や公募班研究者の研究推進に非常に有効であると領域代表は期待して領域申請時に設置した。



2. 研究の進展状況〔設定目的に照らし、研究項目又は計画研究ごとに整理する〕(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、現在までにどこまで研究が進展しているのか記述してください。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、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究ごとに記述してください。

本研究領域は、生殖細胞研究者とエピゲノム研究者の共同研究による融合領域の創成を目指し、研究対象として特に 1) 時間軸に注目し、エピジェネティックネットワークが生殖系列細胞の発生過程においてどのように形成・維持されるのか、その分子機構の解明および 2) 生殖細胞のエピゲノム操作を設定する。本領域研究では、①生殖細胞の発生過程及び、②受精から初期胚形成過程という二つの時間軸にそって生殖系列細胞におけるエピゲノムダイナミクスの解明を研究するグループと最新の技術軸を中心として包括的に③生殖細胞のエピゲノム解析を行うグループとして、3つの研究項目(A01, 02, 03)を設定した。領域設定時に設置した技術支援グループによる班員の支援が功を奏し、計画班員平均では29.2%、公募班では25.9%が連携研究による共著論文を作成している。現在進行中の領域内共同研究は59件にのぼり、22班のうち17班が領域内で共同研究を行っている(以下に紹介した論文名があるものは全て責任著者もしくは第一著者のもの)。

生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム形成(A01)は、生殖細胞の初期発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム動態の解析と操作を行う。A01は、領域設計時の上記3つの研究対象の全てを含むが特に「2.異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展に資するもの」が該当する。以下に代表例を提示するが、主な研究成果(項目4)、研究組織と各研究項目の連携状況(項目6)に示すように連携研究をはじめとした各班の研究が順調に進捗し、当初の目的に照らして予定通り十分な成果をあげている。

- ① 始原生殖細胞:関(公募)は始原生殖細胞におけるエピゲノムプログラミングを解析する目的で生殖細胞の発生に必須である Prdm14 を Embryonic Stem (ES)細胞に強制発現し、この分子がES細胞の脱メチル化を誘導することを見いだした。阿部(公募)は発生転換期のエピゲノム形成機構を解明するために、マウス胚の形態を損なうことなく、個々の胚細胞における特定配列のDNAメチル化状態とタンパク質局在、RNA発現を同時に検出する方法として Whole mount MeFISH法を開発した (**PLoS ONE**)。また Epiblast Stem Cell (EpiSC)の新規培養法を考案した(**Stem Cell Reports**)。相賀(計画)はRNA制御に注目し始原生殖細胞の性特異的なエピゲノム確立機構の解明を目指す。雄化には Smad2 を介した TGFβ 経路が必要であり、雌化にはレチノイン酸と Smad4 を介した BMP シグナルが関与することを示した(**Development**)。これらのシグナルを制御することにより人為的に生殖細胞の性分化を操作できる可能性がある。また Nanos2 が mTORC を介して精子幹細胞の未分化制御に関わることも明らかにした(**Dev Cell in press**)。奥田(公募)はES細胞から精子を作成することを目的としており、Maxを欠損させたES細胞から試験管内で減数分裂初期の細胞を得られる実験系を開発した(投稿中)。
- ② 精子形成:生殖細胞は潜在的に多能性を持つが、それがどのように抑制されているのかは明らかになっていない。そこで篠原(計画)は自らが樹立した培養精子幹細胞株である Germline Stem (GS)細胞を用い、DNAメチル化維持酵素である Dnmt1 の発現を抑制することでGS細胞からES細胞と同等の多能性をもつ multipotent GS細胞を樹立することに成功した(**Genes Dev**)。これにより Dnmt1 がGS細胞のエピゲノムを維持するのに必要であり、この機構の破綻が生殖細胞の持つ潜在的な多能性を発露するのに必要であることを見いだした。またエピゲノムに影響する分子をスクリーニングする過程で、生殖細胞に悪影響を与えるとされている活性酸素が精子幹細胞の自己複製に関与することも証明した(**Cell Stem Cell**)。さらに予期しない成果として精子幹細胞の自己複製分裂の負の制御因子の同定(**PNAS**)と新規の精子幹細胞株の樹立にも成功した(**Stem Cell Report**)。宮川(公募)は Piwi-interacting RNA (piRNA)による遺伝子操作系の開発と利用を目指している。Miwi2のプロモーター下に EGFP のアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウス(Miwi2-asEGFP)を、

Oct4 promoter 下で EGFP を発現するトランスジェニックマウスに交配したダブルトランスジェニックマウスを用い、人為的な piRNA 発現を介して雄性生殖特異的遺伝子の抑制が可能であることを示した(**Curr Biol**)。また、この実験系が内在性遺伝子にも応用可能であることを明らかにし、新たな人為的エピゲノム操作法を開発した。**中馬(計画)**は体細胞分裂から減数分裂の移行メカニズムを調べる目的で、GS 細胞を用いて減数分裂誘導に関わる遺伝子を網羅解析した。その結果、レチノイン酸依存経路の下流に位置するクロマチン制御と並行してレチノイン酸非依存性の転写・翻訳制御が減数分裂に必要であることを示し、幹細胞から第 1 減数分裂ザイゴテン期までの進行に関わる転写因子・翻訳制御因子を同定した。更に DNA 組換え制御に関与する遺伝子欠損マウスを作成し、生殖細胞の複製ストレス応答と染色体安定性に関する分子機構の解析を行った(投稿中)。**立花(公募)**は H3K9 の脱メチル化酵素である Jmjd1a が性決定遺伝子である Sry を発現制御することを見いだした(**Science**)。さらにこの修飾が分化型細胞よりも未分化精原細胞において顕著に低いことから、H3K9 脱メチル化酵素である Jmjd1a と Jmjd1b を二重に欠損させたマウスを作成した。その結果、雄性生殖細胞の枯渇と未分化精原細胞における H3K9 のメチル化の亢進を見だし、精子形成の維持に H3K9 の脱メチル化が必須であることを示した。**山中(公募)**は Cas9 を用いて、特定のゲノム領域を濃縮する実験系の開発に取り組み、核内タンパク質群の濃縮に成功している。

- ③ **卵子形成:鈴木(公募)**は原始卵胞の活性化制御機構を調べる過程で、アルギニンメチル基転移酵素 Prmt5 がマウス卵巣では原始卵胞の卵母細胞に強発現していることを見出し、Prmt5 によるヒストンのアルギニン化が原始卵胞の維持に必要であることを示唆する結果を得た。

受精・初期胚におけるエピゲノム変化 (A02)では、卵子から初期胚への移行という短時間に最もエピゲノムが大きく変化するメカニズムに注目する。A02 は、領域応募時の 3 つの研究対象の全てを含むが特に「4. 当該領域の研究の進展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの」が該当する。当初の目的に照らし予定通り十分な進捗がみられ、その進捗状況は以下の通りである。

- ① **着床と受精:廣田(公募)**は胚着床が通常子宮体部で起こり子宮頸部では起こらないことに着目し、子宮体部では着床直前に miR-200a 発現が低下することから、子宮のホルモン作用および着床における microRNA によるエピジェネティックな調節機構が存在することを明らかにした。**齋藤(計画)**は小分子 RNA がどのようにエピゲノム形成に関与するかを調べている。これまでにショウジョウバエの Piwi-piRNA 複合体と相互作用する核内パートナー分子 DmGTSF1 を同定した(**Genes Dev**)。DmGTSF1 は哺乳類でも保存されており、広範な生物種で同様の抑制機構が働いていることが示唆される。また人工 piRNA による任意領域のエピゲノム改変に成功している。**伊川(計画)**は、受精を介した経世代エピゲノム変化を解析している。これまでに CRISPR/Cas システムを用いたマウス受精卵および ES 細胞でのゲノム編集技術を確立し、100 系統以上の遺伝子欠損マウスを作成し、Ly6k/Tex101 複合体が精子受精能力に必須であることを報告した(**Biol Reprod**)。また生殖細胞特異的な Calcineurin が精子運動能獲得に必須であり、避妊薬の標的になるうことを見いだしている(投稿中)。**青木(公募)**は、母性 mRNA がどのように受精直後のエピゲノム変化に関与するかを調べている。卵および初期胚の RNA シークエンスのデータより、初期胚ではプロモーターがないような遺伝子でも低レベルでゲノムワイドに遺伝子が発現しており、転写が起こっていても翻訳が起こりにくいという特徴をもつことを見出した(**EMBO J**)。
- ② **初期胚:中村(計画)**は着床前胚のエピゲノム動態の解析と制御を目指している。これまでに自らが同定した PGC7 遺伝子を用いて高品質の iPS 細胞の樹立方法を開発した(**Nat Commun**)。また受精卵の雄性クロマチン特異的な新規ヒストン修飾(ヒストン H2B の 112 番目のセリンの GlcNAc 化)が存在することを見いだしており、この修飾を触媒する酵素である Ogt と Tet3 が独立して受精卵の雄性クロマチンの修飾に働くことを明らかにしている。**束田(計画)**は卵子と初期胚のエピゲノム制御を解明すべく、受精卵の雄性核に特異的に起こる DNA

酸化修飾に着目し、これがヒストンのアセチル化制御を介して起こることを示したが、一方この修飾は個体発生には必須でないことを証明した(投稿中)。**谷本(公募)**は、インプリント遺伝子のエピゲノム制御の解析を目指している。代表的なインプリンティング制御配列である H19 imprint control region (ICR)の外側にインスレーターを配することで精子におけるそのメチル化を阻害し、この結果、刷り込みメチル化の確立と維持の両方の分子メカニズムに迫る途を開いた。一方、H19-ICR 周辺(5'側)の転写阻害は、精子における刷り込みメチル化に影響しないことを示した。**遠藤(公募)**は、減数分裂のエピゲノム制御機構を解析している。ポリコーム群 MBLR 複合体が Mga/Max を介して減数分裂関連遺伝子のエピジェネティック制御を行い、同複合体が初期胚から始原生殖細胞の分化に関与していることを見いだしている。**岡江(公募)**はヒトサンプルのエピゲノム解析を行っており、これまでにヒト卵子、精子、胚盤胞のメチローム解析を行った。その結果、受精後の脱メチル化の程度はヒトとマウスで領域によって大きく異なり、インプリント遺伝子や一部のレトロトランスポゾンが脱メチル化から保護されることを明らかにした。さらに、雌性ゲノムの脱メチル化がほとんど起こらないことなど、マウスとの相違点も複数見出したことから、領域および種特異的なリプログラミング制御機構が存在しているのではないかと考えている(PLoS Genet)。

エピゲノム解析・制御技術(A03)では、最新のエピゲノム解析技術と胚操作技術を駆使して、生殖エピゲノム研究を推進する。特定のステージの生殖細胞にとどまらない包括的な研究を目的としている。A03 は、領域設計時の 3 つの研究対象の全てを含むが特に「3. 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの」が該当する。A03 の各研究者は A01, A02 の研究者との融合研究により本領域の新たな展開を目指すことが期待される。当初の目的に照らし予定以上の進捗・成果がみられ、その進捗状況は以下の通りである。

小倉(計画)は、生殖サイクルと世代交代の機構を明らかにするために、核移植クローン技術を用いて各ステージのエピゲノムの特性変化を追跡している。前精原細胞をドナーとした核移植実験により、父性インプリントの成立時期が胎齢 16.5-17.5 日であること、そしてインプリント領域依存的に刷り込み遺伝子発現機構が異なることを明らかにした(**Biol Reprod**)。また、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤 trichostatin A が体細胞クローン胚の発生を改善することに着目し、クローン胚の遺伝子発現解析により trichostatin A が胚由来の転写因子遺伝子を特異的に活性化していることを示している。さらに前核期における卵子のヒストンメチル化酵素 Methyltransferase 3 (Mettl3) が標的部位を H3R17me2a で修飾し、それが Tet3 を誘導することで能動的に DNA 脱メチル化を開始させることも見いだした。小倉の卓越した胚操作技術を基盤として**幸田(計画・分担)**は受精直後の遺伝子変化を調べる目的で、次世代シーケンサーを用いてマウス初期胚の遺伝子発現プロファイルを胚一個で解析できる系を確立した。この方法を用いて体外受精と顕微授精によって作成したマウス胚で最初に発現する遺伝子の同定に成功している。また生殖細胞や初期胚におけるゲノムのメチルシトシンの脱メチル化に重要であるヒドロキシメチルシトシンの1塩基解像度での新しい解析法(Enzyme assisted Identification of Genome Modification Analysis, EnIGMA 法)を確立した。**佐々木(計画)**はゲノムインプリンティングやレトロトランスポゾンの抑制系をモデルとして、配偶子形成過程におけるエピゲノム確立機構と受精後の維持機構の解明を目指している。これまでにクローンマウスに共通のインプリンティング異常があること、始原生殖細胞のヒストン H3K9 メチル化がレトロトランスポゾンの DNA メチル化と抑制を制御すること、熱ショックタンパク質が piRNA 合成に関わることを共同研究で証明した。**永瀬(公募)**は、エピゲノムをゲノム領域特異的に変更することを念頭に HDAC 阻害剤と配列認識 DNA 副溝結合化合物の複合体を多数作成した。その中で分化した細胞の形態を未分化細胞に誘導でき、ES 細胞の発現パターンに近づけることの出来る化合物や K-RasV12 によるがん細胞の増殖を抑制する化合物を得た (**Nat Commun**)。このように現在までのところまで順調に研究は進行しており、発表論文の 44 報/144 報(共同研究による重複分含)が共同研究の論文となっている(30.5%)。

3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況 (2ページ程度)

審査結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該コメント及びそれへの対応策等を記述してください。

部会では以下のコメントを頂いた(抜粋)

「次世代シーケンサーから産生される大量のデータを扱うことになるため、バイオインフォマティクスと数理解析の専門家を加える必要がある。また、一部の計画研究代表者については、他の大型研究課題との研究内容の切り分けに留意することが必要である。」

1. 「バイオインフォマティクスと数理解析の専門家」の参加

これに対応するために、佐々木 (計画)の研究室に所属する一柳健司准教授(連携研究者)がバイオインフォマティクス解析を担当しているほか、CREST で雇用している藤特任講師(バイオインフォマティシャン)及びテクニカルスタッフ(システムエンジニア)が常時解析をサポートする体制を構築している。また、九州大学生体防御医学研究所情報生物学分野の須山幹太教授にも常時サポート、アドバイスをお願いしており、現在投稿中の共著論文も多数ある。

上記バイオインフォマティクスについて対応に加え、数理解析面では京都大学 iPS 細胞研究所(初期化機構研究部門) から山本拓也助教にテクニカルアドバイザーとして参加して頂いている。山本氏は数理解析・次世代シーケンスに造詣が深く、RNA スupraシングなど本領域に欠けていた数理・情報解析についても相談できる人材であり今後の新学術領域の研究に役立つものと期待している。

2. 「他の大型研究課題との研究内容の切り分け」

他の大型研究課題との内容の切り分けについては、申請時には4名(篠原: CREST、相賀: 基盤(S)、佐々木: CREST、小倉: 基盤(S))が該当していたが、現在は2名(小倉、佐々木)である。

小倉 (計画)が基盤研究(S)の最終年度である(H27 年度は本人に 21,600 千円)。この基盤研究(S)は特定のマウス系統(129系)のゲノムに存在すると予想される未知の高度ゲノム可塑性因子を同定し、その因子を用いて iPS 細胞樹立やクローン家畜作出などに応用しようとするものである。129 系統が、ES 細胞の樹立効率や精巢性テラトーマなど、独特の特性を持つことに着目したものであり、実験動物学と順遺伝学的方法論(forward genetics)を組み合わせ、研究を進めている。それに対して、新学術領域研究課題は、哺乳類の生殖サイクルと世代交代の機構を明らかにするために、核移植クローン技術を用いて各ステージのエピゲノムの特性変化を追跡するものである。目的と方法が大きく異なる、別の研究課題である。

佐々木 (計画)は CREST によりヒトエピゲノム解析を行っている(H27 年度は本人に 26,000 千円)。これは国際ヒトエピゲノムコンソーシアムに参画してヒトの胎盤や子宮内膜を解析するものであり、実験動物であるマウスを対象としている本領域の研究とは直接の重複はない。

4. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理する] (3 ページ程度)

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果（発明及び特許を含む）について、新しいもの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ごとに計画研究・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。

生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム形成 (A01)

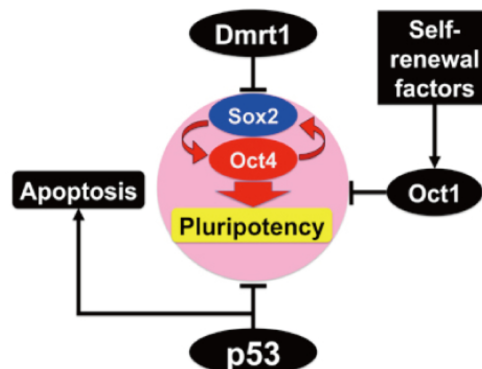
計画研究

相賀（計画） は生殖細胞の雄化には Smad2 を介した TGFβ1 シグナルが必須で、雌化には Retinoic acid と Smad4 を介した BMP シグナルが必須であることを明らかにした (*Dev Biol* 2014; *Development* 2015)。また Nanos2 が mTORC を介して精子幹細胞の未分化制御に関わることを示した (*Dev Cell* 2015)。篠原（計画） は生殖細胞腫瘍の多くがインプリンティング遺伝子である H19 の differentially methylated region の DNA 脱メチル化を伴うことに注

目し、マウス GS 細胞において DNA メチル化酵素である Dnmt1 の遺伝子発現を抑制することで多能性幹細胞である multipotent GS 細胞を樹立することに成功した (*Genes Dev* 2013, 小倉（計画）との共同研究)。Dnmt1 の発現抑制は性決定遺伝子の一つである Dmrt1 の発現抑制を引き起こし、その結果 ES 細胞の転写因子ネットワークを構成する Sox2 遺伝子の発現上昇を引き起こす。GS 細胞では山中因子の全てが mRNA レベルでは発現するが、唯一 Sox2 のみタンパク質になっていない。しかしながら、Dmrt1 の発現抑制により Sox2 が翻訳されることで多能性の獲得に繋がることが予想された（上図）。また DNA の脱メチル化を誘導する化合物をスクリーニングする過程で、活性酸素を産生する Nox 阻害剤が GS 細胞の増殖を抑制することを見出した。通常活性酸素は生殖細胞に悪影響を与えるが、適度な活性酸素レベルを保つことが精子幹細胞の自己複製に必要であることを示した (*Cell Stem Cell* 2013)。中馬（計画） は GS 細胞を幹細胞から第 1 減数分裂前期期まで試験管内分化させることに成功した。この系を用い減数分裂誘導に関わる遺伝子を探索し、ChIP-seq、RNA-seq 等によるエピゲノム・遺伝子発現解析、および相対定量プロテオーム解析により古典的な Retinoic acid 依存経路の下流に位置するクロマチン制御に並行して Retinoic acid 非依存性の転写・翻訳制御が減数分裂誘導に必要であることを明らかにした。

公募研究

鈴木（計画） は始原生殖細胞の生存に必要であるアルギニンメチル基転移酵素 Prmt5 がマウス卵巣では特に原始卵胞の卵母細胞に強い発現を示し、同分子がヒストンのアルギニン化に寄与することが原始卵胞の維持に必要であること示唆する結果を得た。立花（計画） は H3K9 のジメチル化に着目して研究しこのヒストンメチル化の除去に関わる酵素である Jmjd1a が性決定遺伝子 Sry の発現を制御することで性決定に関わることを示した (*Science* 2013, 小倉（計画）、阿部（公募）との共同研究)。さらに分化型精原細胞に比べ、未分化精原細胞では H3K9 のメチル化レベルが低いことに着目し、H3K9 脱メチル化酵素である Jmjd1a と Jmjd1b を二重に欠損させたマウスを作成したところ、雄性生殖細胞の枯渇と未分化精原細胞における H3K9 のメチル化の亢進を見だし、精子形成の維持に H3K9 の脱メチル化が必須であることを示した。宮川（公募） は新たに作製した Miwi2-asEGFP トランスジェニックマウスを、Oct4 遺伝子プロモーター下に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを用い、人為的な piRNA 発現を介して雄性生殖特異的遺伝子サイレンシングが可能であることを示した (*Curr Biol* 2015, 小倉（計画）との共同研究)。奥田（公募） は ES 細胞において Myc のパートナー分子である Max を欠損させることで試験管内において減数分裂初期の細胞を得た。現在 GS 細胞でも同様な現象が起こるかを検討している。ChIP 法は興味あるタンパク質がゲノムのどの位置にあるかを検証する方法として広く用いられているが、その逆に山中（公募）は

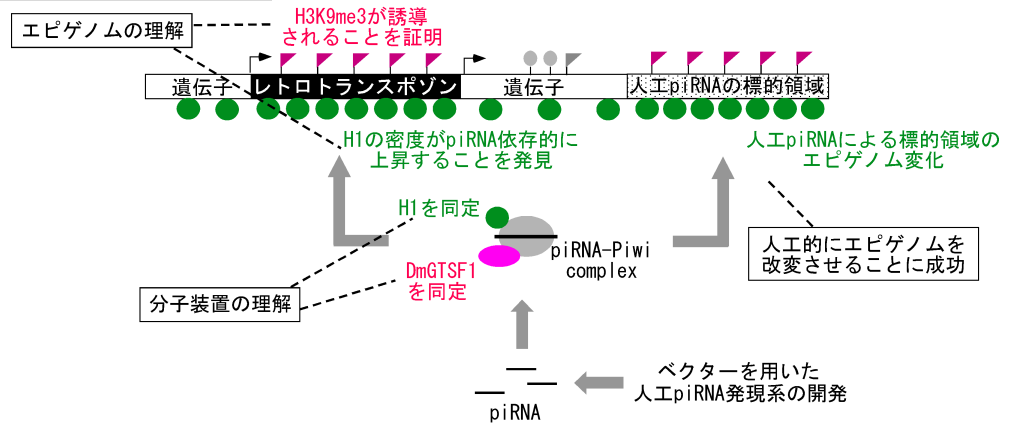


CRISPR/Cas9 を用いて特定ゲノム領域を濃縮し、その部位に存在するタンパク質を同定する系を構築しつつある。関（公募）は始原生殖細胞における DNA 脱メチル化に重要な因子である Prdm14 を、ES 細胞において強制発現させたところ、多能性を制御する転写因子ネットワークを安定化させることに成功した。阿部（公募）は EpiSC の新規樹立法を確立した (*Stem Cell Report* 2015, 小倉（計画）との共同研究)。さらに、個々のマウス胚細胞における特定配列の DNA メチル化状態とタンパク質局在、RNA 発現を同時に検出する Whole mount MeFISH 法を報告した (*PLoS ONE* 2014, 佐々木（計画）との共同研究)。

受精・初期胚におけるエピゲノム変化 (A02)

計画研究

piRNA (PIWI interacting RNA) は生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA であり、遺伝子の DNA メチル化を介して、レトロトランスポゾンの発現を抑制することが知られている。齋藤（計画）は本領域で唯一シ



ョウジョウバエを対象として研究しており、核にある Piwi と直接相互作用する分子として DmGTSF1 を発見した (*Genes Dev* 2013)。DmGTSF1 は piRNA を乗せた Piwi の核内パートナーだと予想される。更に Piwi が相互作用する新たなクロマチン因子、リンカーヒストン H1 を発見しており (投稿中, 上図)、人工 piRNA による任意領域のエピゲノム変化に成功している (投稿準備中)。伊川（計画）は CRISPR/Cas システムを用いたマウス受精卵および ES 細胞でのゲノム編集技術を確立し、精巣特異的発現遺伝子の遺伝子欠損マウスを 100 系統以上、作製し解析している。これまでに Ly6k/Tex101 複合体が精子受精能力に必須であることを報告した (*Biol Reprod* 2014)。また精巣特異的 Calcineurin が精巣上体での精子運動能獲得に必須であり、避妊薬の標的となりうることを見出した (投稿中)。中村（計画）は自らが同定した PGC7 遺伝子を用いて高品質の iPS 細胞の樹立方法を開発した (*Nat Commun* 2015)。また受精卵の雄性クロマチン特異的なヒストン H2B の 112 番目のセリンの GlcNAc 化が存在することを見いだしており、この修飾を触媒する酵素である Ogt と Tet3 が独立して受精卵の雄性クロマチンの修飾に働くことが受精後に生じる胚性遺伝子の活性化に必要であることを見出している。受精卵においては雄特異的にその DNA が酸化修飾を受けることが知られるが、その生理的な意義は不明であった。しかしながら、束田（計画）は雄性 DNA 酸化修飾が個体発生には必要でないことを明らかにした (投稿中)。また卵母細胞で高発現するヒストン脱メチル化酵素の阻害剤の開発に成功した (*J Med Chem* 2013)。

公募研究

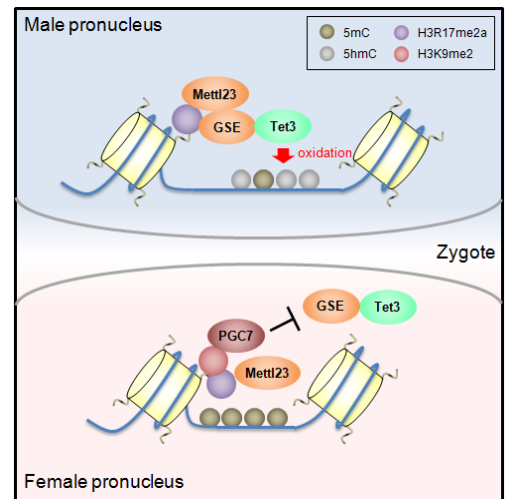
岡江（公募）は佐々木（計画）、小倉（計画）との共同研究により、クローン動物に特異的なインプリンティング遺伝子の異常を見つけた (*Hum Mol Genet* 2014)。更にヒト卵子、精子、胚盤胞のメチローム解析を行い、受精後の脱メチル化の程度は領域によって大きく異なり、インプリント遺伝子や一部のレトロトランスポゾンが脱メチル化から保護されることを示した。さらに、雌性ゲノムの脱メチル化がほとんど起こらないことなど、マウスとの相違点も複数見出した。以上の成果は、領域および種特異的なリプログラミング制御機構の存在を示唆している (*PLoS Genet* 2014)。谷本（公募）は代表的な刷り込み制御配列である H19-ICR の外側にインスレーターを配することで精子における DNA メチル化を阻害し、この結果、刷り込みメチル化の確立と維持の両方の分子機構に迫る途を開いた。一方、H19-ICR 周辺 (5'側) の転写阻害は、精子における刷り込みメチル化に影響しないことを示した。胚着床は通常子宮体部で起こり子宮頸部では起こらない

ことが知られているが、廣田（公募）はマウス子宮体部と頸部の着床直前の分子変化を比較したところ、子宮頸部では子宮体部に比較して miR-200a が増加しており、プロゲステロン受容体発現の低下と局所でのプロゲステロン代謝促進を介して、プロゲステロンシグナルが低下していることを見出した。逆に子宮体部では着床直前に miR-200a 発現が低下することから、子宮のホルモン作用および着床における microRNA によるエピジェネティックな調節が胚の着床部位の決定に関わると予想している。青木（公募）は卵・初期胚の RNA シークエンスのデータより、初期胚ではプロモーターがないような遺伝子でも低レベルでゲノムワイドに遺伝子が発現しており、転写が起こっていても翻訳が起こりにくいという特徴をもつことを見出した (**EMBO J 2015**)。遠藤（公募）はポリコム群 MBLR 複合体が転写因子 Mga/Max に依存して減数分裂関連遺伝子に結合し、ヒストン H2A モノユビキチン化修飾を介して転写抑制に寄与することを示した。MBLR 欠損 ES 細胞は始原生殖細胞様細胞への分化が促進されていた。この結果は A01 の 奥田（公募）のデータを補完するものであり、MBLR 複合体が減数分裂関連遺伝子のエピジェネティック制御を介して、始原生殖細胞の分化に関与している可能性を示唆する。今後、ES 細胞からの配偶子形成に関する研究の進展が期待できる。

エピゲノム解析・制御技術 (A03)

計画研究

小倉（計画）は前精原細胞を用いた核移植実験により、父性インプリントの成立時期が胎齢 16.5-17.5 日であり、インプリント領域依存的に刷込み遺伝子発現機構が異なることを見出した (**Biol Reprod 2014**)。また、受精直後の前核期における能動的 DNA 脱メチル化機構を解析し、卵子においてヒストンメチル化酵素 Mettl23 が標的部位を H3R17me2a で修飾し、それが Tet3 を誘導することで DNA 脱メチル化を開始させることを明らかにした (右図)。幸田（計画・分担）は次世代シーケンサーを用いてマウス初期胚の遺伝子発現プロファイルを胚 1 つから解析可能な実験系を構築し、通常の体外受精と顕微受精によって作成したマウス胚の胚性遺伝子の活性化時期に発現変化が誘導される遺伝子を同定した (小倉（計画）との共同研究)。また、生殖細胞や初期胚においてゲノムのメチルシトシンの脱メチル化の過程において重要と考えられる、ヒドロキシメチルシトシンの 1 塩基解像度での新しい解析法(EnIGMA 法)を確立した。佐々木（計画）は、クローンマウスに共通のインプリンティング異常があること (**Hum Mol Genet 2014**、岡江（公募）、小倉（計画）との共同研究)、始原生殖細胞のヒストン H3K9 メチル化がレトロトランスポゾンの DNA メチル化と抑制を制御すること (**Genes Dev 2014**)、熱ショックタンパク質が piRNA 合成に関わることを共同研究で証明した (**Nucl Acids Res 2014**、中馬（計画）、宮川（公募）との共同研究)。



公募研究

永瀬（計画）はエピゲノムをゲノム領域特異的に変更することを目標としヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と配列認識 DNA 副溝結合化合物の複合体を多数作成した。その中で分化細胞の形態を未分化細胞に誘導し、ES 細胞の発現パターンに近づけることが出来る化合物や K-RasV12 によるがん細胞の増殖を抑制する化合物を得た (**Nat Commun 2015**)。認識する配列は異なるが、同様の遺伝子群とその下流遺伝子群の発現を変更しており、この情報から共通認識領域の割り出しをバイオインフォマティクスの手法も使い試みている。

5. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果の公表の状況（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、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に記載し、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。また、別添の「(2) 発表論文」の融合研究論文として整理した論文については、冒頭に◎を付してください。

【論文】 全て査読有り。合計 144 件から抜粋。

● 2015 年：計画班

A01 計画班

Zhou, Z., Shirakawa, T., Ohbo, K., Sada, A., Wu, Q., Hasegawa, H., Saba, R., and *Saga, Y. (2015). The RNA binding protein Nanos2 organizes a post-transcriptional buffering system to retain primitive states of mouse spermatogonial stem cells. *Dev. Cell in press*

Wu, Q., Fukuda, K., Weinstein, M., Graf, J. M., and *Saga, Y. (2015). SMAD2 and p38 signaling pathways act in concert to determine XY primordial germ cell fate in mice. *Development 142*, 575-586.

Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A., and *Shinohara, T. (2015). Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Reports. 4*, 489-502.

A01 公募班

Ito, D., Shiromoto, Y., Shin-Ya, Y., Ishii, C., Nishimura, T., Ogonuki, N., Ogura, A., Hasuwa, H., Fujihara, Y., *Kuramochi-Miyagawa, S., and *Nakano, T. (2015). Induction of DNA Methylation by Artificial piRNA Production in male germ cells. *Curr Biol. 25*, 901-906.

Katano, M., Ema, M., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Hirasaki, M., Suzuki, A., Ueda, A., Nishimoto, M., Takahashi, S., Okazaki, Y., and *Okuda, A. (2015). Forced expression of Nanog or Esrrb preserves the ESC status in the absence of *nucleostemin* expression. *Stem Cells 33*, 1089-1101.

Hishida, T., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Katano, M., Okazaki, Y., Ema, M., Takahashi, S., Hirasaki, M., Suzuki, A., Ueda, A., Nishimoto, M., Hishida-Nozaki, Y., Vazquez-Ferrer, E., Sancho-Martinez, I., *Izpisua Belmonte, J.C., and *Okuda, A. (2015). Functional crosstalk between Myc and PI3K signaling for supporting unlimited self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells 33*, 713-725.

Sugimoto, M., Kondo, M., Koga, Y., Shiura, H., Ikeda, R., Hirose, M., Ogura, A., Murakami, A., Yoshiki, A., Chuva de Sousa Lopes, S., and *Abe, K. (2015). A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition. *Stem Cell Reports 4*, 744-757.

A02 計画班

Nakatani, T., Yamagata, K., Kimura, T., Oda, M., Nakashima, H., Hori, M., Sekita, Y., Arakawa, T., Nakamura, T., and *Nakano, T. (2015). Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation. *EMBO Rep. 16*, 582-589.

#Xu, X., #Smorag, L., #Nakamura, T., Kimura, T., Dressel, R., Fitzner, A., Tan, X., Linke, M., Zechner, U., Engel, W., and *Pantakani K. (#co-first authors) (2015). *Dppa3* expression is critical for generation of fully-reprogrammed iPS cells and maintenance of *Dkl1-Dio3* imprinting. *Nat. Commun. 6*, 6008.

A02 公募班

Abe, K., Yamamoto, R., Franke, V., Cao, M., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Vlahovicek, K., *Svoboda, P., *Schultz, R.M., and *Aoki, F. (2015). The first murine zygotic transcription is promiscuous and uncoupled from splicing and 3' processing. *EMBO J 34*, 1523-1537.

A03 計画班

*Inoue, K., Oikawa, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Nakamura, T., Nakano, T., Abe, K., and *Ogura, A. (2015). Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Sci. Rep. 5*, 10127.

Kurotaki, Y.K., Hatanaka, Y., Kamimura, S., Oikawa, M., Inoue, H., Ogonuki, N., Inoue, K., and *Ogura, A. (2015).

Impaired active DNA demethylation in zygotes generated by round spermatid injection. *Hum. Reprod.* 30, 1178-1187.

A03 公募班

Hiraoka, K., Inoue, T., Taylor, R.D., Watanabe, T., Koshikawa, N., Yoda, H., Shinohara, K., Takatori, A., Sugimoto, H., Maru, Y., Denda, T., Fujiwara, K., Balmain, A., Ozaki, T., Bando, T., Sugiyama, H., and *Nagase, H. (2015). Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. *Nat. Commun.* 6, 6706.

● 2014年 :

A01 計画班

Saba, R., Wu, Q., and *Saga, Y. (2014). CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. *Dev. Biol.* 389, 173-181.

*Ishii, K., Ishiai, M., Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Niwa, O., Takata, M., and *Shinohara, T. (2014). The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 676-689.

*Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K.I., and Shinohara, T. (2014). Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 8826-8831.

A01 公募班

Shinomura, M., Kishi, K., Tomita, A., Kawasumi, M., Kanezashi, H., Kuroda, Y., Tsunekawa, N., Ozawa, A., Aiyama, Y., Yoneda, A., Suzuki, H., Saito, M., Picard, J.Y., Kohno, K., Kurohmaru, M., Kanai-Azuma, M., and *Kanai, Y. (2014). A novel AMH-Treck transgenic mouse line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads. *Reproduction* 148, 1-9.

Ueda, J., Ho, J.C., Lee, K.L., Kitajima, S., Yang, H., Sun, W., Fukuhara, N., Zaiden, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and *Poellinger, L. (2014). The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3702-3720.

Warr, N., Siggers, P., Carréa, G.A., Bogani, D., Brixey, R., Akiyoshi, M., Tachibana, M., Lydia Teboul, L., Wells, S., Sanderson, J., and *Greenfield, A. (2014). Transgenic Expression of Map3k4 Rescues T-associated Sex Reversal (Tas) in Mice. *Hum. Mol. Genetics* 23, 3035-3044.

Kamon, M., Katano, M., Hiraki, K., Hishida, T., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Suzuki, A., Hirasaki, M., Ueda, A., Nishimoto, M., Kato, H., and *Okuda, A. (2014). Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 23, 2170-2179.

©Shiura, H., Okamoto, A., Sasaki, H., and *Abe, K. (2014). A novel technique for simultaneous visualization of specific DNA methylation and protein/RNA expression. *PLoS One* 9, e95750.

A02 計画班

Murota, Y., Ishizu, H., Nakagawa, S., Iwasaki, Y.W., Shibata, S., Kamatani, M.K., Saito, K., Okano, H., Siomi, H., and *Siomi, M.C. (2014). Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly. *Cell Reports* 8, 103-113.

Hirano, T., Iwasaki, Y.W., Lin, Z.Y., Imamura, M., Seki, N.M., Sasaki, E., Saito, K., Okano, H., Siomi, M.C., and *Siomi, H. (2014). Small RNA profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset, a model primate. *RNA* 20, 1223-1237.

Fujihara, Y., Okabe, M., and *Ikawa, M. (2014). GPI-anchored protein complex, LY6K/TEX101, is required for sperm migration into oviduct and male fertility in mice. *Biol. Reprod.* 90, 60.

Mashiko, D., Young, S.A., Muto, M., Kato, H., Nozawa, K., Ogawa, M., Noda, T., Kim, Y.J., Satouh, Y., Fujihara, Y., and *Ikawa, M. (2014). Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev. Growth Differ.* 56, 122-129.

A02 公募班

Okoe, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Kikuchi, H., Yoshida, H., Tanaka, A., Suyama, M., and *Arima, T. (2014). Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human

development. *PLoS Genet.* *10*, e1004868.

Haraguchi, H., Saito-Fujita, T., *Hirota, Y., Egashira, M., Matsumoto, L., Matsuo, M., Hiraoka, T., Koga, K., Yamauchi, N., Fukayama, M., Bartos, A., Cha, J., Dey, S.K., Fujii, T., and Osuga, Y. (2014). MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol. Endocrinol.* *28*, 1108-1117.

A03 計画班

Takahashi, S., Lee, J., Kohda, T., Matsuzawa, A., Kawasumi, M., Kanai-Azuma, M., Kaneko-Ishino, T., and *Ishino, F. (2014). Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development* *141*, 3842-3847.

©Ichiyanagi, T., Ichiyanagi, K., Ogawa, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chuma, S., Sasaki, H. and *Udono, H. (2014). HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucl. Acids Res.* *42*:11903-11911.

Liu, S., Brind'Amour, J., Karim, M.M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., Sasaki, H., Shinkai, Y., and *Lorincz, M.C. (2014). Setdb1 is required for germ line development and silencing of H3K9me3 marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes. Dev.* *28*, 2041-2055.

©Okae, H., Matoba, S., Nagashima, T., Mizutani, E., Inoue, K., Ogonuki, N., Chiba, H., Funayama, R., Tanaka, S., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., Ogura, A., and *Arima, T. (2014). RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 992-1001.

A03 公募班

©Uekusa, S., Kawashima, H., Sugito, K., Yoshizawa, S., Shinojima, Y., Igarashi, J., Ghosh, S., Wang, X., Fjiwara, K., Ikeda, T., Koshinaga, T., Soma, M., and *Nagase, H. (2014). Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpG methylation within the third exon. *Int. J. Oncol.* *44*, 1669-1677.

● 2013年 :

A01 計画班

Hasegawa, K., Namekawa, S.H., and *Saga, Y. (2013). MEK/ERK Signaling Directly and Indirectly Contributes to the Cyclical Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cells* *31*, 2517-2527.

Takahashi, S., Hirose, M., Ogonuki, N., Ebisuya, M., Inoue, K., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Nishida, E., Ogura, A., and *Shinohara, T. (2013). Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes. Dev.* *27*, 1949-1958.

Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C., and *Shinohara, T. (2013). ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* *12*, 774-786.

Pandey, R.R., Tokuzawa, Y., Yang, Z., Hayashi, E., Ichisaka, T., Kajita, S., Asano, Y., Kunieda, T., Sachidanandam, R., Chuma, S., Yamanaka, S., and *Pillai, R.S. (2013). Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 16492-16497.

A02 計画班

Ohtani, H., Iwasaki, Y.W., Shibuya, A., Siomi, H., *Siomi, M.C., and *Saito, K. (2013). DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in *Drosophila*. *Genes Dev.* *27*, 1656-1661.

Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata, H., Isotani, A., and *Ikawa, M. (2013). Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* *3*, 3355.

Hasuwa, H., Ueda, J., Ikawa, M., and *Okabe, M. (2013). MiR-200b and miR-429 Function in Mouse Ovation and Are Essential for Female Fertility. *Science* *341*, 71-73.

*Suzuki, T., Ozasa, H., Itoh, Y., Zhan, P., Sawada, H., Mino, K., Walport, L., Ohkubo, R., Kawamura, A., Yonezawa, M., Tsukada, Y., Tumber, A., Nakagawa, H., Hasegawa, M., Sasaki, R., *Mizukami, T., Schofield, C., and *Miyata, N. (2013). Identification of the KDM2/7 Histone Lysine Demethylase Subfamily Inhibitor and its Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* *56* 7222-7231.

A03 計画班

Hirasawa, R., Matoba, S., Inoue, K., and *Ogura, A. (2013). Somatic donor cell type correlates with embryonic, but not extra-embryonic, gene expression in postimplantation cloned embryos. *PLoS One* *8*, e76422.

Kuroki, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Nozaki, M., Kanai, Y., and *Shinkai, Y., and *Tachibana M. (2013). Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science* 341, 1106-1109.

*Honda, A., Hatori, M., Hirose, M., Honda, C., Izu, H., Inoue, K., Hirasawa, R., Matoba, S., Togayachi, S., Miyoshi, H., and Ogura, A. (2013). Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 288, 26157-26166.

Wakayama, S., Kohda, T., Obokata, H., Tokoro, M., Li, C., Terashita, Y., Mizutani, E., Nguyen, V.T., Kishigami, S., Ishino, F., and *Wakayama, T. (2013). Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell* 12, 293-297.

【総説・図書】

● 2015年：

A02 計画班

Nakamura, T. and Nakano, T. (2015). Stella and zygotic reprogramming. In “Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming”, Epigenetics and Human Health series, A. Meissner, and J. Walter, Eds., (Germany: Springer), pp. 31-42.

● 2014年：

A01 計画班

*Chuma, S. (2014). LINE-1 of evidence for fetal oocyte attrition by retrotransposon. *Dev. Cell.* 29, 501-502.

*中馬新一郎. (2014). 減数分裂の発生制御とゲノム情報の継承. *実験医学* 32, 853-858.

A01 公募班

Yamanaka, S., Siomi, M.C., and Siomi, H. (2014). piRNA clusters and open chromatin structure. *Mobile DNA.* 5, 22.

A02 計画班

*Saito, K. (2014). RNAi and overexpression of genes in ovarian somatic cells. *Methods in Molecular Biology* 1093: 25-33.

Fujihara, Y., and *Ikawa, M. (2014). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Mice by Single Plasmid Injection. *Methods Enzymol.* 546, 319-336.

A02 公募班

Hiura, H., Okae, H., Chiba, H., Miyauchi, N., Sato, F., Sato, A., and *Arima, T. (2014). Imprinting methylation errors in ART. *Reprod. Med. Biol.* 13, 193-202.

A03 計画班

小倉淳郎, 黒滝陽子. (2014). 顕微授精でわかること、できること. *細胞工学* 33, 400-405.

● 2013年：

A01 計画班

*Kanatsu-Shinohara, M., and *Shinohara, T. (2013). Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 29, 163-87

A02 計画班

Shi, Y., and Tsukada, Y. (2013). The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5

A03 計画班

*Ogura, A., and Inoue, K. (2013). Clone-specific X-linked gene repression caused by ectopic *Xist* transcripts from the active X chromosome. In *Principles of Cloning*, 2nd Edition, I. Wilmut, R. Jaenisch, J. Gurdon, R. Lanza, M. West, K. Campbell and J. Cibelli, eds. (USA: Academic Press), pp. 161-172.

*Kohda, T. (2013). Effects of embryonic manipulation and epigenetics. *J. Hum. Genet.* 58, 416-20.

【ホームページ】

当領域ホームページ URL <http://reprod-epigenome.biken.osaka-u.ac.jp/>

【主催シンポジウム等】

● 2015年：計画班

<伊川正人>シンポジウム企画（コーディネーター：真下知士，伊川正人）：第62回実験動物学会総会シンポジウム「ゲノム編集が導く実験動物学のパラダイムシフト」2015.05.28

<小倉淳郎>ワークショップ主催：第1回ゲノム編集マウスワークショップ 2015.03.17

● 2014年：計画班

<相賀裕美子>Organizer: The 27th annual meeting of Mouse molecular Genetics, 2014, Asilomar, CA, USA. 2014.09.29-10.03

<伊川正人>シンポジウム企画（コーディネーター：三輪佳宏，伊川正人）：第61回実験動物学会総会シンポジウム「in vivo ライブイメージングによる高次生命現象の可視化と応用」2014.05.16

<伊川正人>講習会主催：千里ライフサイエンス振興財団・技術講習会"CRISPR/Cas システム"によるマウスゲノム編集 2014.06.05

<佐々木裕之>シンポジウム企画（企画：佐々木裕之、角谷徹仁）：第86回日本遺伝学会 Symposium on Epigenetics: Its Role in Development, Chromosome Regulation and Genome Evolution 2014.09-17-19

● 2013年：計画班

<相賀裕美子>Organizer: The 26th annual meeting of Mouse molecular Genetics, 2013, Hinxton, UK. 2013.09.18-21

<東田裕一，佐々木裕之>シンポジウム主催（オーガナイザー：大川恭行，東田裕一，佐々木裕之）：The Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013, -Expanding Frontiers of Genomic Science-. 2013.9.10

<東田裕一>シンポジウム企画（オーガナイザー：大川恭行，東田裕一）：第86回日本生化学会大会シンポジウム「ミクロなクロマチン研究で解くマクロなエピジェネティクス研究」2013.9.11-13

【アウトリーチ活動等】(合計 54 件より抜粋；広報誌 14 件、一般向け講演会 7, 小中高向け授業 19, サイエンスカフェ 3, イベント参加 5, プレスリリース 6)

<篠原隆司>精子を作る幹細胞のお話 京大アカデミックデイ（京都府京都市）2013.12.21

<齋藤都暁>生命現象を操り想像する -RNAi を例にして- (愛知県立明和高等学校(Super Science High School 指定校 60 名対象) 東京大学浅野キャンパス 2013.7

<中村肇伸>特別講義「幹細胞とクローン」(西舞鶴高校) 西舞鶴高校(京都府舞鶴市) 2014.12.09

<小倉淳郎>実験動物の発生工学の講義と発生工学実験室の案内(見学旅行高校生対象 計 12 回) 理研 BRC

<関由行>もっと身近に万能細胞 -再生医療の歴史・現在そして未来-神戸新聞淡路総局主催 淡路政経懇話会(兵庫県洲本市) 2014.7.25

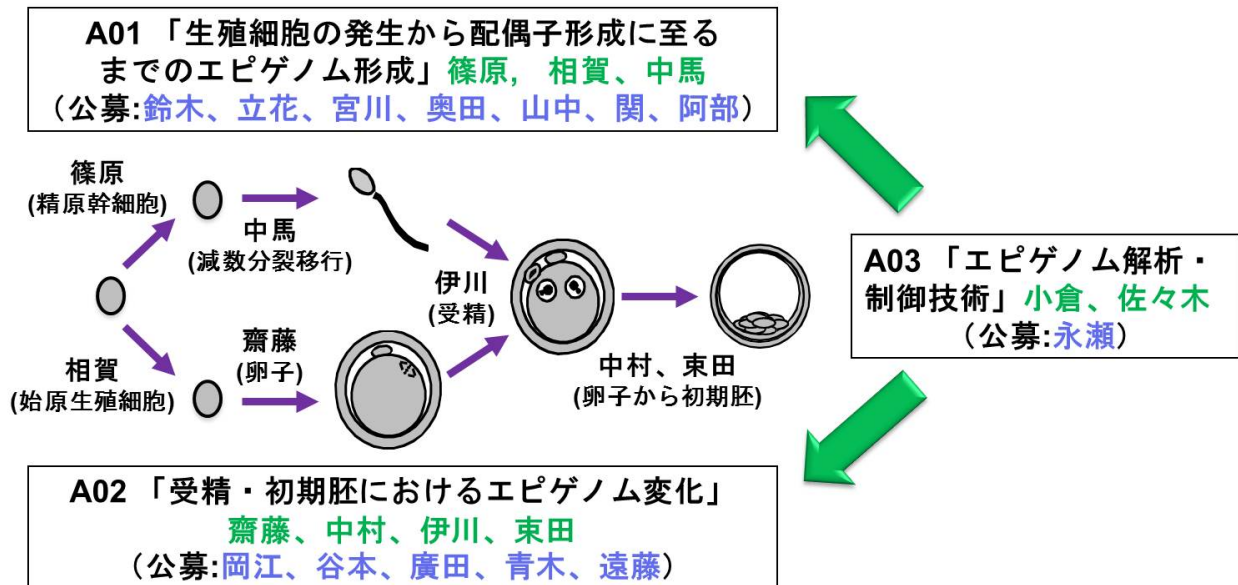
<谷本> 「親の環境は子の健康に影響する？～親から子に伝わる DNA 以外の情報～」 筑波大学生命領域学際研究センター(茨城県つくば市) 2014.7.30

6. 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、研究組織間の連携状況について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。

[研究組織と各研究項目との関係]

本領域は生殖細胞とエピゲノム研究の専門家が結集し、A01「生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム形成」、A02「受精・初期胚におけるエピゲノム変化」、A03「エピゲノム解析・制御技術」を研究する三つのグループを構成する。A01とA02により雌雄生殖細胞が受精を境目にして次世代へと繋がる全発生段階を網羅できる。本領域は医(7)、薬(2)、理(9)、農(4)、獣医学(1)の博士取得者からなる多彩な学術背景を持っており、融合研究を進めるのに最適な体制を整えてある。



発生の時間軸に沿ったA01とA02を技術軸のA03が支援

研究項目 A01: 生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム形成

精子形成に伴うエピゲノムの変化は多段階に起こる。まず胎生期には生殖細胞が生殖巣に入ると親から受け継いだインプリンティングが消失し、それと相前後して多能性制御分子の抑制が起こる。胎生後期に細胞分裂が停止し、雄型のDNAメチル化がインプリンティング遺伝子に入り、生後の精子幹細胞ではエピジェネティックに安定な状態が確立される。その後、減数分裂を経て精子を生じる過程ではヒストンがプロタミンに置換され次世代への遺伝情報伝達の準備が行われる。一方、卵子形成は精子形成と異なり1) 減数分裂が胎生期から開始しており、2) 雌型のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化は出生後の卵胞形成に伴って起こり、雄とは大きな違いがある。本領域では相賀(計画)、阿部(公募)、関(公募)は胎生期の細胞から精子幹細胞への発生過程、篠原(計画)、中馬(計画)、宮川(公募)、奥田(公募)、山中(公募)は精子幹細胞から精子に至るまでのエピジェネティック制御のコア分子の解明を試みつつ、その操作を試みる研究を行う。卵子については相賀(計画)と鈴木(公募)が特に始原生殖細胞から原始卵胞の状態に注目して解析を行う。

研究項目 A02: 受精・初期胚におけるエピゲノム変化

受精では配偶子の持っているエピゲノム情報が完全にリセットされる必要がある。伊川(計画)はこの一連のメカニズムを遺伝子改変マウスの解析により検証し、齋藤(計画)、谷本、廣田、青木、遠藤(全て公募)はその中で鍵を握る分子を同定すると共に中村(計画)、東田(計画)は全能性幹細胞の樹立を目指す。岡江(公募)はヒトサンプルとの比較を行う。

研究項目 A03: エピゲノム解析・制御技術

生殖細胞研究は顕微授精やクローン作成技術などの特殊技術を必要とする上、エピゲノム解析技術も次

世代シーケンサーを用いることで近年高度に複雑化している。生殖エピゲノムの効果的な研究には生殖細胞研究者とエピゲノム研究者の緊密な連携が不可欠であることから、本項目の小倉（計画）、佐々木（計画）、幸田（計画・分担）は最先端の技術を駆使して生殖細胞のエピゲノム解析を行うと共に A01, A02 の項目の研究者の支援も行う。永瀬（公募）はエピゲノム操作に関わる小分子化合物を班員に提供する。

時間軸（A01, A02）と技術軸（A03）を交差させたグループ構成の結果、本領域では緊密な共同研究が行われている。発表論文に示されている通り、計画研究グループ間のみならず、計画班と公募班との研究、公募班同士の共同研究も行われている。特に 18 報の既に発表された論文においては、うち 15 報が支援班との共同研究による点は特筆すべきである。これは当初の期待通りシニア研究者が共同研究のハブとして支援していることを示す。また領域代表者が樹立した培養精子幹細胞株 GS 細胞の資材提供などによる班員間の発表論文も既に報告されている。

合計として 144 報の論文が発表されており、このうち 44 報（共同研究による重複分含）が共同研究の論文となっている（30.6%）。責任著者論文数は 53 報（計画班 31 報/10 名、公募班 22 報/13 名）であり、各計画班員平均では 29.2%、公募班では 25.9%が連携研究による共著論文を作成している。現在進行中の共同研究は 59 件ののぼり、22 班のうち 17 班が領域内で共同研究を行っている。

このような異なる専門領域にまたがる共同研究体制が速やかに構築され、順調に成果を出していることは、本領域の設立なしには成し得ない。特に公募研究者がエピゲノム解析の新技術を開発し、計画班や他の公募班の研究にも関心を向けて当領域に参画してきたことや、独自の胚操作技術を持つ研究者が、公募班の研究者と連携してエピゲノム解析を行うようになったことで、世界的にも稀なエピゲノム研究体制が構築されている。このように本領域は計画班・公募班とも「生殖エピゲノム」の理解と操作に向けた適切な班員の配置と、相互交流が有機的に効率良く機能しており、今後も多くの優れた研究成果が期待される。

既に成果を挙げている連携（18 報）

1. 篠原（計画 A01）-小倉（計画 A03） 新規樹立の精子幹細胞株からの子孫作成 (**Stem Cell Reports**)
2. 篠原（計画 A01）-小倉（計画 A03） GS 細胞の無血清培養系の確立 (**Biol Reprod**)
3. 篠原（計画 A01）-小倉（計画 A03） 新規多能性幹細胞によるキメラ個体作成 (**Genes Dev**)
4. 伊川（計画 A02）-小倉（計画 A03） Cas9 を使った多重トランスジェニック動物の作成 (**BMC Genomics**)
5. 伊川（計画 A02）-小倉（計画 A03） Cas9 を使ったウサギ遺伝子破壊個体の作成 (**Exp Anim**)
6. 伊川（計画 A02）-阿部（公募 A01） 小分子化合物を使った多能性幹細胞の樹立 (**Stem Cells**)
7. 幸田（計画・分担 A03）-小倉（計画 A03） 核移植胚のゲノムインプリンティング解析 (**Biol Reprod**)
8. 佐々木（計画 A03）-中馬（計画 A01）-宮川（公募） piRNA 形成とトランスポゾン抑制 (**Nucl Acids Res**)
9. 佐々木（計画 A03）-阿部（公募 A01） 阿部の開発した新技術による DNA メチル化の可視化 (**PLoS ONE**)
10. 佐々木（計画 A03）-小倉（計画 A03）-岡江（公募 A02） クローン動物のゲノムインプリンティング異常 (**Hum Mol Genet**)
11. 小倉（計画 A03）-阿部（公募 A01） X 染色体不活化とクローン動物作成効率の関与の解明 (**Epigenetics**)
12. 小倉（計画 A03）-立花（計画 A01）-阿部（公募 A01） ヒストン脱メチル化酵素と性決定 (**Science**)
13. 小倉（計画 A03）-阿部（公募 A01） 新規 GS 細胞株の樹立 (**Genesis**)
14. 中村（計画 A02）-中馬（計画 A01）-宮川（公募 A01） GS 細胞における piRNA 合成 (**RNA**)
15. 中馬（計画 A01）-宮川（公募 A01） 原始卵胞における piRNA 合成 (**Development**)
16. 小倉（計画 A03）-阿部（公募 A01）-中村（計画 A02） 核移植へのトリコスタチンの影響の解析 (**Sci Rep**)
17. 阿部（公募 A01）-青木（公募 A02） ES 細胞におけるヒストンバリエントの解析 (**PLoS ONE**)
18. 阿部（公募 A01）-小倉（計画 A03）-立花（公募 A01） 生体の任意細胞集団回収法の開発 (**Genesis**)

7. 若手研究者の育成に係る取組状況（1ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

本領域の班員の平均年齢は46.3歳であり（男性21名、女性2名）、うち40歳以下の研究代表者は7名（30.4%）となっており、比較的若い研究者が多い。将来日本のサイエンスをリードする若手研究者の育成を領域代表（46歳）の重要な責務と位置づけ、以下の活動に取り組んだ。

- 1) 公募研究代表に独立前後の若手研究者を積極的に採択した。
- 2) 毎年夏に若手メンバーが主催する二泊三日の合宿を行っている。これには全ての計画班および公募班から若手メンバーを中心として行われている。発表の内容を全員で評価し、優秀な評価を得たものには賞状および賞金を授与している。表彰をうけた若手（大学院生を含む）は翌年度の会を主催する義務を持ち、受け身で外部講演者の話を聞くのではなく、自分たちの今後のキャリアアップに必要なものという条件で内容を提案させている（2014年7月16-18日 於つくば市、57名参加）。
- 3) リサーチリソースや技術支援については、若手代表研究者を優先して行った（26件中7件）。
- 4) 総括班の若手研究者の支援活動を受け2015年6月現在、領域内の研究者10名（うち計画班5名）が昇進しており、そのうち教授1（束田（計画・本人））、独立准教授2（伊川（計画））、遠藤（公募）本人）、テニュアトラックポジション1（篠原（計画））が独立ポジションを得ている。また公募班を含む班員間での助教の採用も2件あったことから順調に人的交流は進んでいる。
- 5) 若手研究者育成の成果としては文部科学省若手科学者賞を中村（計画、H25）、齋藤（計画、H27）に受賞した。中馬（計画）は日本発生生物学会からH25年度のDGD Wiley-Blackwell Prize、H27年度のEditor in chief prizeを受賞した。束田（計画）は九州大学研究活動表彰をH25、H26に受賞している。他にも研究室若手メンバーが学会賞（4件）、ポスター賞（8件）を受賞している。

8. 研究費の使用状況（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。

構成メンバー

<p>【研究代表者・所属・職名】 篠原隆司（京都大学・医学研究科・教授）</p> <p>【分担研究者・所属・職名】 伊川正人（大阪大学・微生物病研究所・教授）</p> <p>【連携研究者・所属・職名】 小倉淳郎（理化学研究所・バイオリソースセンター・室長） 幸田尚（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授） 齋藤都暁（慶応大学・医学部・准教授） 相賀裕美子（国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授） 中馬新一郎（京都大学・再生医科学研究所・准教授） 中村肇伸（長浜バイオ大学・准教授） 佐々木裕之（九州大学・生体防御医学研究所・教授） 東田裕一（九州大学・稲森フロンティア研究センター・教授）</p>	<p>【総括班における役割】 領域全体の総括、総括班の運営</p> <p>事務局、遺伝子改変動物作成支援・研究情報交換窓口</p> <p>顕微授精・クローン作出支援</p> <p>エピゲノム解析支援</p> <p>研究情報交換窓口</p> <p>若手育成・集会</p> <p>研究情報交換窓口・集会</p> <p>広報</p> <p>エピゲノム解析支援、研究情報交換窓口</p> <p>広報</p>
<p>【研究協力者：アドバイザー・所属・職名】 石野史敏（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・所長） 斎藤通紀（京都大学・医学研究科・教授） 長澤丘司（京都大学・再生医科学研究所・教授） 仲野徹（大阪大学・医学研究科・教授） 中辻憲夫（京都大学・医学研究科・特任教授）</p>	<p>評価者（領域の評価、提言）</p> <p>評価者（領域の評価、提言）</p> <p>評価者（領域の評価、提言）</p> <p>評価者（領域の評価、提言）</p> <p>評価者（領域の評価、提言）</p>

- 1) サイトビジット:全ての班の準備状況、方向性を確認するために領域代表がサイトビジットを行った。
- 2) 領域推進会議（班会議）開催:年1回開催し、領域研究の方向付けの確認、情報交換、リソースの共有、共同研究の推進を行った。これに追加して夏の合宿を開催し、班内外から多くの研究者が参加した。
- 3) 研究広報、アウトリーチ活動:領域ホームページの開設を行い領域の研究成果の発信につとめた。また、ホームページ上で最新の論文や研究成果について顕著な成果が挙げた場合には班員間に紹介している。これまでに、さらに研究会やシンポジウムを共催し、一般、学生（大学から小学生まで）に研究活動の紹介や、実際に研究に触れていただくなど、様々なアウトリーチ活動（合計54件）を推進している。
- 4) 国際連携:本年度に国際シンポジウム（H28.2）を企画している。第一線で活躍する内外の研究者を招聘して意見交換を行い、国際的な研究コミュニティの設立に努めている。
- 5) 研究リソースの共有:共同研究を促進するために領域メンバーが有する遺伝子、抗体、遺伝子改変マウスの保有状況を把握し、一覧表にして、全班員に配布している。
- 6) 技術支援班の設置:本領域ではシニアメンバーに技術支援班としての役割も果たすという組織を作った。具体的には次世代シーケンサーによるエピゲノム解析（**佐々木**）、顕微授精・クローン動物作成（**小倉**）、遺伝子改変動物作成（**伊川**）、RNA シークエンス解析（**幸田**）が計画・公募班の支援を行っている。またこれらの活動を支援するために、総括班から毎年共同研究経費を提供した。技術支援班メンバーは領域外メンバーに対しても技術研修会も開催しており、本領域で利用されている技術が他の分野にも展開していくための活動も行っており、研究会の費用も拠出した。

9. 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。

中辻 憲夫 (京都大学大学院医学研究科・特任教授)

当該新学術領域研究の特徴は、哺乳類などの生殖系列サイクルを、個体発生過程だけでなく次世代への引き継ぎまで含めて、異分野の研究者が結集し、協働して、総合的に世界をリードする研究を進めようとしていることである。過去に大きな成功を生み出した生殖関連特定領域が、我が国の生殖系列研究を世界のトップに押し上げた実績を基盤にして、引き続き急速に発展するゲノムエピゲノムおよび生殖工学技術の進展を有効活用しながら、若手研究者を迎え入れて研究分野の持続的な発展に成功しつつあると、高く評価できる。特筆すべきは、当報告書にも強調されているように、世界最先端の生殖工学技術に熟達した研究者グループと、急速な進歩を続けるエピゲノムの包括的解析技術を保有する研究者グループが、当領域研究に分担研究者として参加しているだけでなく、若手研究者や公募研究者を含めた参加グループに積極的な技術支援と共同研究を提供していることである。これこそ、各研究者が各々優れた研究を進めるだけでなく、領域研究に参加することで初めて可能となる異分野研究者との協働を可能にすることによって、画期的な学際研究成果を生み出しつつある。領域代表者および総括班研究者による、分野と年代を超えた協働体制を構築して推進する領域運営は大きく成功しており、この生命現象の本質に迫る研究分野であると同時に、生殖医療や多能性幹細胞など社会にとっても重要な意義を有する生殖系列サイクルの研究領域において、文字通り世界をリードする研究成果が優れた論文発表などとして数多く生み出され、国際連携や社会広報にも積極的に取り組んでおり、今後も引き続き、新学術領域研究の特色を生かした優れた研究成果が期待できる。

長澤 丘司 (京都大学再生医科学研究所・教授)

本領域は、実績のある研究者で構成されており、計画研究代表者の多くが、すでに権威ある国際的学術誌上で論文を発表している。中でも、領域代表者である篠原らの研究成果が注目される。彼らは、以前樹立に成功した精子幹細胞株(GS細胞)で多能性胚性幹細胞株(ES, iPS細胞)の未分化性維持に必須のSox2蛋白質の発現が認められないことを見出し、GS細胞では、DNAメチル化酵素であるDnmt1が雄性化に必須の遺伝子Dmrt1の発現を促進することでSox2の蛋白質の翻訳を抑制していることを明らかにした。一方、GS細胞の自己複製において、活性酸素を産生する酵素(Nox1)が促進的に働くことを示し、必須のエピジェネティック制御に活性酸素が関与する可能性を示した。また、若手研究者では、立花らが転写に抑制的なメチル化ヒストン(H3K9)の脱メチル化酵素Jmjd1が精子形成特異的に必須の役割を果たすことを明らかにした研究成果が印象的である。Jmjd1により発現が調節される精子形成に重要な遺伝子の同定を含む研究の進展が期待される。これらの研究は、すでに論文発表に至っている。課題は、上記の研究の他に、生殖細胞での研究から他の分野にも波及効果を及ぼすようなエピジェネティクスに関する独創的な研究成果があまり見えていないことである。残された研究期間での奮闘が望まれる。総じては、優れた総括と運営のもと、研究が順調に進行していると考えられ、残りの研究期間に重要な成果が出ることが十分期待できる。

斎藤 通紀 (京都大学大学院医学研究科・教授)

本領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」は、生殖細胞の発生過程におけるエピゲノム動態の解明とその制御技術の開発を目的とし、3つの研究項目「生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム(A01)」「受精・初期胚におけるエピゲノム変化(A02)」「エピゲノム解析・制御技術(A03)」を設定して研究を推進中である。2013年度に発足以来、すでに53報(計画班31報/10名、公募班22報/13名)の責任著者論文を発表しており、また領域内の共同研究、技術支援も活発で、当初の目的に向けて順調に研究が進展しつつある。A01領域では、レチノイン酸とBMP4による始原生殖細胞の性分化機構の解明、GS細胞の脱分化機構・活性酸素による自己複製制御機構の解明、エピゲノム制御による遺伝子発現抑制技術の開発、ヒストン脱メチル化酵素による体細胞の性決定制御機構の解明、A02領域では、Piwi-piRNA複合体と相互作用する因子の同定、生殖細胞特異的Calcineurinの精子運動能獲得過程における機能解明、PGC7のiPS細胞誘導過程における役割の解明、ヒト初期胚のメチル化解析、A03領域では、

顕微受精による遺伝子発現異常の解析、5hmC の 1 塩基解像度での解析法の確立、熱ショック蛋白質の piRNA 合成への関与の証明、などそれぞれの領域で顕著な成果が多数あがっている。領域代表者を中心に、若手育成や国際連携、研究成果の広報活動も適切に推進・計画されており、研究期間終了までにさらに多くの優れた研究成果が発表されると期待される。本新学術領域の環境を活かし、今後の期間における若手の一層の活躍を期待したい。

石野 史敏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所・所長)

生殖細胞系列の研究は我が国が世界に誇る学術領域の一つである。本新学術領域は、計画班員および公募班員のそれぞれが、この良き伝統を引き継いで活発な活動を展開していると評価される。また、若手研究者育成支援にも力を注ぎ、次世代の研究者にも良い影響を与えていると評価される。この分野においては、個々の研究者の非常に高い独自性を活かした研究が幾つも生まれてきているが、それに加えて本新学術領域は、目標の一つに「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展を目指す」ことをあげている。すでに 59 件に及ぶ共同研究が進行中であり、計画は順調に進んでいると評価できる。領域代表者のまとめにあるように、このような連携・融合研究においても、成果を世界にアピールできるよう頑張ってもらいたい。

本領域のような基礎的・基盤的領域の場合に求められていることは、一人一人の研究者が、時間をかけて独自性、独創性の高い研究を完成させることであろうと思われる。近年、成果をあげることが声高々に叫ばれて、得てして短期間で成果のあがるテーマに走りがちの風潮にある。成果をあげることが重要であることは間違いではないが、シニア研究層および若手研究者に十分な研究期間を保証することでそれを達成してこそ、新学術領域推進の意味があり、日本の学術研究の振興に本当に寄与することになるであろう。日本のオリジナリティーの高い科学を一般社会や世界に向かって発信するために、本領域の活動に多いに期待している。

仲野 徹 (大阪大学大学院生命機能研究科長)

『生殖細胞の発生から配偶子形成に至るまでのエピゲノム形成 (A01)』、『受精・初期胚におけるエピゲノム変化 (A02)』、『エピゲノム解析・制御技術 (A03)』のいずれにおいても、おおよそ予定通りに研究が進捗している。

特に、A01 では、領域代表の篠原による、multipotent GS (Germline Stem) 細胞における、DNA メチル化と細胞分化の多能性についての研究、公募班員である立花による、ヒストン修飾酵素 Jmjd1a による雄性の性決定機構の解析など、雄性生殖細胞の発生・分化において顕著な業績があげられた。ほかにも、小分子 RNA である piRNA の制御機構の解析および操作法の開発 (A01、A02)、インプリント領域によってインプリンティング遺伝子の発現機構 (A03) など、いずれのテーマにおいても優れた研究がおこなわれ、論文として発表されている。

領域内における共同研究は活発におこなわれており、すでに 20 報近くの論文が、班員間の共同研究として発表されている。また、エピゲノム解析、クローン動物作成、RNA シークエンス解析などの支援も活発におこなわれている。これらのことは、本新学術領域が非常に有機的に機能していることを如実に示している。

研究は全体として順調に進捗していると考えられるが、投稿準備中や投稿中の論文が多く、論文業績としては、一部の班員を除いて十分とは言いがたい状態にある。可及的速やかに、研究成果をまとめ、ピアレビューを受け、しっかりと論文業績として仕上げていくことが必要である。これについては、若手班員も多いことから、領域長が強いリーダーシップをもって指導することが望ましい。

10. 今後の研究領域の推進方策（2ページ程度）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上での問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募研究での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

1. 研究領域の推進方策

総括班の活動方策

本新学術領域は申請時に (2) 異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展を目指すもの、(3) 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの、(4) 当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすものを研究対象として発足した。現段階での論文発表の状況を鑑みると、共同研究は非常に緊密に行われておりおおむね順調に進んでいると考えている。既に 59 件に及ぶ共同研究が進行中であることから、申請時の計画に沿って連携・融合研究はこれからも進展していくものと確信している。今後期待されているのは、この成果を世界にアピールするべく質の高い論文を書くことであると認識している。これは、残りの研究期間に全力を持って当たりたい。現段階でより力点をおいて進めて行きたいものとして以下の項目が挙げられる。

1) 国際交流の強化

10名の計画班員のうちの半数が国際共同研究を行っており、うち既に論文として成果を発表しているものもある。人材交流も活発に行われており、計画班のみで10名（米国、英国、中国、オーストラリア、イタリア、マレーシア）の海外の研究者がポストドク・大学院生として研究に参加している。より一層の交流をはかるために、こうした海外の研究者にも公開シンポジウムや若手合宿などの機会を利用して海外の研究室の研究の進め方や進路についても紹介して頂く。

2) 「エピゲノム制御」の促進

既にさまざまな発生段階の生殖細胞のエピゲノム制御に関わる因子の同定に成功している。また齋藤（計画）はショウジョウバエで、宮川（公募）はマウスにおいてエピゲノムを操作できるようになっている。これら新規に開発された技術については班員間で共有し、共同研究の発展につなげたい。

3) 新規のエピゲノム解析技術の紹介

我が国発の新規の技術開発は研究促進に大きく役立つ。例えば、近年のエピゲノム解析ではハイドロキシメチル化が通常のDNAメチル化と区別することが困難になっている。幸田（計画・分担）はこれを克服するためにEnIGMA法を開発し、部位特異的に両者を簡単に区別する方法を考案した。この手法をゲノムワイドで次世代シーケンサーを用いて解析できるようになれば、大きな技術革新となる。またA03班のエピゲノムについての新規技術開発研究には、阿部（公募）が開発したDNAメチル化の可視化技術により新展開を示している。両技術を班員に紹介し、共同研究を促進する。

4) 技術支援の強化

次世代シーケンサーを使ったエピゲノム解析をより活発化させる必要がある。近年の急速な進歩を取り込める、密接な情報交換が行える環境を作りたい。また伊川（計画）が中心となって進めているCRISPR/Cas9による遺伝子改変動物の作成のノウハウなども班員間で共有し、実質的な成果を挙げられるよう進めたい。

5) 「ヒト」サンプルの解析

我が国は実験動物での成果が世界をリードしているものの、ヒトサンプルについては研究が遅れている。本領域では公募班から岡江（公募）がマウスとヒトのエピゲノムを比較する研究を行っており、

計画班の研究を補強できた。更に海外の研究者との連携を強くはかり、現段階では情報収集をしっかり行っておきたい。

6) リソース共有

発足後 3 年を迎え徐々に集積しつつある、多くの独自リソースを公開し、班員が自由に利用できる環境を整備する。研究情報交換窓口は領域に参加した研究者の同意を得て、領域終了後も維持して広く試料の提供を続けることで研究領域の今後の発展にも寄与できると考えている。

7) 若手研究者育成支援

これまでと同様の支援を引き続き行う。具体的には若手合宿の開催を継続支援し、生殖エピゲノムに関する先駆的研究者を積極的に招聘し交流の機会を提供する。特に研究の進め方や論文の執筆についてシニア研究者からのアドバイスを若手の合宿などでテーマとして取りあげるなど工夫をしたい。

2. 目標達成に向けた問題点

以下の二点についてはより工夫をして改善していきたい。

1) 一般市民への波及効果

8 名（うち 4 名の計画研究代表者）の研究者から 37 件の新聞報道、3 件のテレビ報道があった。市民を対象とする公開講座や高校への授業を含むアウトリーチ活動に精力的にも取り組んでいるが（5 名（50%）の計画研究代表者と 4 名（31%）の公募研究代表者）、活動していない場合も見られる。優れた成果を挙げた場合には出来るだけ研究成果を発表する機会を設けるよう呼びかけたい。

2) 新規技術の特許化

新規のエピゲノム操作技術開発が開発されつつある。しかしながら、特許として申請されているものは少ないため、可能な限り特許化することを推奨していきたい。