

領域略称名：生殖エピゲノム  
領域番号：3502

平成30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

「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30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

1. 研究領域の目的及び概要	7
2. 研究領域の設定目的の達成度	9
3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	12
4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況	13
5. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	15
6. 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）	18
7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況	23
8. 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）	25
9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	29
10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	30
11. 総括班評価者による評価	31

**研究組織** (総：総括班, 支：国際活動支援班, 計：総括班及び国際活動支援班以外の計画研究, 公：公募研究)

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 総	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
Y00 支	15K21737 「生殖細胞のエピゲノ ムダイナミクスとその 制御」の国際活動支援に ついての研究	平成 27 年度～ 平成 29 年度	篠原 隆司	京都大学・医学研究科・教授	3
A01 計	25112002 R N A 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 ー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 R N A 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	国立遺伝学研究所系統生物研究センタ ー・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・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ングとDNAメチル化のダイナミクスと制御	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
統括・支援・計画研究 計 11 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・テニユアトラック助教	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	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

	比較エピゲノム解析				
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リ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
A01 公	16H01214 piRNA 生合成経路による翻訳制御機構	平成28年度～ 平成29年度	石津 大嗣	慶応義塾大学医学部・分子生物学教室・講師	1
A01 公	16H01216 生殖細胞のエピゲノムリプログラミング過程における多能性転写因子群の制御基盤の解明	平成28年度～ 平成29年度	栗本 一基	京都大学・大学院医学研究科・准教授	1
A01 公	16H01218 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28年度～ 平成29年度	立花 誠	徳島大学・先端酵素学研究所・教授	4

A01 公	16H01220 M a x タンパク質の減 数分裂抑制因子として の役割とその分子作用 機序	平成 28 年度～ 平成 29 年度	奥田 晶彦	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センタ ー・教授	1
A01 公	16H01221 減数分裂型 cell cycle に よる生殖細胞エピゲノ ム制御機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	石黒 啓一郎	熊本大学・発生医学研究所・独立准教 授	1
A01 公	16H01223 始原生殖細胞によるエ ピゲノムリプログラミングとその人為的制御	平成 28 年度～ 平成 29 年度	関 由行	関西学院大学・理工学部・准教授	1
A01 公	16H01224 生殖細胞のヒストン置 換に関わる因子の同定 および機能解析	平成 28 年度～ 平成 29 年度	品川 敏恵	独立行政法人理化学研究所・石井分子 遺伝学研究室・専任研究員	1
A01 公	16H01225 発生転換点におけるエ ピゲノム機能制御とヒ トーマウス比較エピゲ ノミクス	平成 28 年度～ 平成 29 年度	阿部 訓也	独立行政法人理化学研究所・バイオリ ソースセンター・チームリーダー	1
A02 公	16H01215 受精前の卵子は最終分 化した細胞なのか：全能 性獲得の準備段階とし ての卵子	平成 28 年度～ 平成 29 年度	青木 不学	東京大学・大学院新領域創成科学研究 科・教授	1
A02 公	16H01217 始原生殖細胞特異的な ヘテロクロマチン動態 の解析	平成 28 年度～ 平成 29 年度	山口 新平	大阪大学・生命機能研究科・助教	1
A02 公	16H01222 体細胞核の全能性獲得 に関わる分子機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	宮本 圭	近畿大学・生物理工学部・講師	2
A02 公	16H01226 卵母細胞の巨大な細胞 サイズの意義	平成 28 年度～ 平成 29 年度	北島 智也	独立行政法人理化学研究所・多細胞シ ステム形成研究センター・チームリー ダー	1
A03 公	16H01219 生殖細胞におけるヒス トンバリエントによる ゲノムマーキング機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	原田 哲仁	九州大学・生体防御医学研究所・助教	1

	の解明				
公募研究 計 26 件					

## 1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ以内）

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 世紀の半ばの報告された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た。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 19 人に一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のみならず、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。これらの発見はノーベル賞を授与され学問的に重要な発見であることが認められているが、単なる基礎研究にとどまらず、現在も

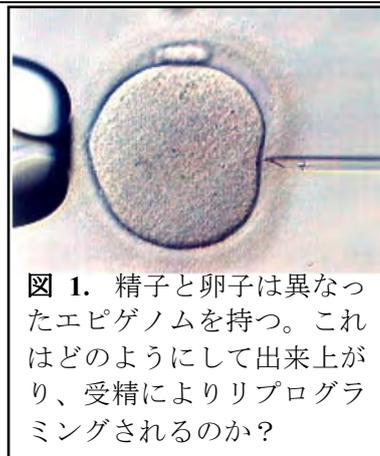


図 1. 精子と卵子は異なったエピゲノムを持つ。これはどのようにして出来上がり、受精によりリプログラミングされるのか？

**我々の生活様式に広汎な影響を及ぼしており、その後も続く新しい技術開発により未来へ向けて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)、「生殖系列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の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 である piwi-interacting RNA (piRNA) 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。エピジェネティクス研究は体細胞でも盛んに行われるようになったが、**生殖細胞は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間やその発生過程に大きくエピジェネティックな性質が変化する点で体細胞と大きく異なるため、エピジェネティクス研究の中心となり、その成果は多くの研究者から注目されてきた。**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である piRNA が存在し、生殖細胞のエピジェネティクス制御が体細胞よりも更に複雑であることを示している。また異なったエピジェネティック因子が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ており、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から益々その研究は盛んになってきた。

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ズ技術も急速に進歩している。クローン個体のような極端な異常でなくとも、生殖補助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。**特に次世代シークエンサーの機能向上によりごく少数の細胞でも全ゲノムのメチル化シークエンスを決定できる現在、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」はヒト不妊症・不育症、不妊症、動物の繁殖効率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生殖補助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、領域参加者に支援と共同研究を推進してきた。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。

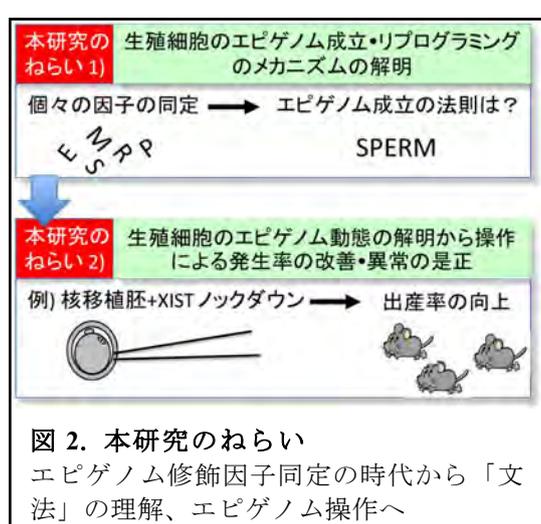


図 2. 本研究のねらい  
 エピゲノム修飾因子同定の時代から「文法」の理解、エピゲノム操作へ

## 2. 研究領域の設定目的の達成度（3ページ以内）

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、具体的に記述してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目ごとの状況も記述してください。

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し研究を行ってきた。本領域研究では、①生殖細胞の発生過程におけるエピゲノムダイナミクスの解明、②受精から初期胚形成過程におけるエピゲノムダイナミクスの解明という二つの時間軸にそって生殖系列細胞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、これら 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 25% (22/87 報)、公募班では 38% (20/53 報) が連携研究による共著論文を作成している。(以下で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った。当初の目的に照らして予定通り十分な成果をあげた。

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リ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 Epiblast-like (EpiLC) 細胞に強制発現することで Embryonic Stem (ES) 細胞に脱分化させることに成功した (**Stem Cell Reports**)。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 (EpiSC) 細胞の新規培養法を考案した (**Stem Cell Reports**)。相賀 (計画) は生殖細胞の性決定に関する雌化因子として Stra8 と Smad4 を同定し (**PLoS Biol**)、精子幹細胞の維持には Nanos2 を介した mRNP 機能が必須であり (**Dev Cell**)、Nanos2 の安定性に E3 リガーゼ Nedd4 が重要な役割を果たすことを見いだした (**Nat Commun**)。奥田 (公募) は ES 細胞や 篠原 (計画) が樹立した培養精子幹細胞である Germline Stem (GS) 細胞において Max の発現を抑制することにより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 (**Nat Commun**)。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 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。また一部の幹細胞のみが同時に子孫を作ることや (**Dev Cell**)、精子幹細胞の自己複製分裂の正と負の制御因子の同定 (**Cell Stem Cell, PNAS**)、自己複製における解糖系の役割の解明 (**Genes Dev**)、新規精子幹細胞株の樹立などにも成功した (**Stem Cell Reports**)。生殖細胞のエピゲノム操作に役立つ新技術として GS 細胞を用いた染色体導入マウスの作製 (**Stem Cell Reports**)、アデノ随伴ウイルスによる生体内生殖細胞への遺伝子導入法の開発を行った (**Stem Cell Reports**)。中馬 (計画) は DNA 組換え制御に関与する Pari 遺伝子の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 (**Mol Cell Biol**)。立花 (公募) は 小倉 (計画) および 阿部 (公募) との共同研究により 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**)。③ **卵子形成**：鈴木 (公募) は Lhx8-Lin28A 経路が最も初期の原始卵胞の活性化に寄与していることを見出した (**BMC Biol**)。

**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して研究を行い、予定通り十分な進捗がみられた。

① **着床と受精**：北島（公募）は独自の4D解析技術を駆使して、卵母細胞の大きな細胞質が排卵直後に頻発する染色体分配エラーの原因であることを証明した(**Dev Cell**)。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た結果、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**)。さらにPiwiとリンカーヒストンH1が直接結合し、トランスポゾンの転写領域にH1がリクルートされるとトランスポゾンが抑制されるというモデルを提唱した(**Mol Cell**)。受精卵が発生を開始するシグナルである精子由来の卵子活性化因子は長らく不明であったが、伊川（計画）は、精子PLCZ1が顕微授精時に必須な卵子活性化因子である一方、生理的条件下ではPLCZ1非依存性の卵活性化経路が存在することを明らかにした(**Sci Rep**)。また遺伝子編集技術を用いた遺伝子改変動物作成技術を国内で最も早く導入し国際活動支援班のサポートにより54種類の遺伝子欠損マウスを作成し、いずれもが精子形成に影響がないことを見出した(**PNAS**)。更にTcte1遺伝子が解糖系酵素の発現制御を介して精子の運動性に関与することも発見している(**PNAS**)。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た。卵および初期胚のRNAシーケンスのデータより、受精後に急速に分解されるmRNAをコードする遺伝子を次世代シーケンサーにより抽出した結果、Fbxwファミリーに属する遺伝子が減数分裂の調節に関与していることを証明した(**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、自らが同定したPGC7遺伝子を用いて高品質のinduced pluripotent stem cell (iPS)細胞の樹立方法を開発した(**Nat Commun**)。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、Tet3ノックアウトを作成することで、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ものの、この修飾自体が個体発生に必須でないことを証明した(**Sci Rep**)。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、代表的なインプリンティング制御配列であるH19 imprint control region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(**Development**)。遠藤（公募）は奥田（公募）との共同研究により、non-canonical PRC1(ncPRC1)のコンポーネントであるPCGF6に注目し、ncPRC1が奥田の研究対象であるMax/Mgaヘテロダイマーと結合することで生殖細胞・減数分裂遺伝子にリクルートされて転写を抑制し、着床前後の正常な胚発生に寄与することを明らかにした(**Elife**)。岡江（公募）は長らく困難であったヒトTrophoblast Stem (TS)細胞の樹立に成功した(**Cell Stem Cell**)。

**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、領域全体の研究を推進した。

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、その結果ヒストンシャペロンCAF01がヒストンバリエントH3.1をリクルートし、体細胞の抑制ゲノム状態を誘導することを示した(**PNAS**)。また父方発現をするマイクロRNA群が胚体外組織の発生に必須であることを明らかにし(**Cell Rep**)、受精時における父方ゲノムの再プログラム化にヒストンH3におけるアルギニン残基メチル化H3R17me2aが必須であることを証明した(**Cell Rep**)。幸田（計画・分担）は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(**Nucleic Acids Res**)、卵子のエピゲノム状態は両親の年齢に影響を受けることを報告した(**Sci Rep**)。佐々木（計画）は多能性幹細胞から培養下で誘導した始原生殖細胞のDNAメチル化及び遺伝子発現を詳細に解析に、転写制御因子Prdm14による制御とインプリント制御領域の脱メチル化機序を明らかにした(**Dev Cell**)。次世代シーケンサーを駆使することで精子幹細胞の分化過程におけるエピゲノム変化についても解析を行った(**BMC Genomics**)。また、これまで未解明であった卵子におけるpiRNAに焦点を当て、卵子形成過程におけるpiRNA産生のプロファイリングを行い、piRNAの産生が雌雄で異なっていることを発見した(**Nucleic Acids Res**)。原田（公募）は伊川（計画）との共同研究により、精巣特異的なヒストンバリエントであるH3t遺伝子のノックアウトを作成し、この遺伝子が精巣で一過性に発現するにも

関わらず精子形成にも必要であるというユニークな特性をもつことを見出した(**Cell Rep**)。永瀬(公募)は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複数の化合物を得た (**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 48 報/140 報 (34%; 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。

#### 設定した研究対象に照らしての達成度合い

領域設立時に設定した生殖細胞における時間軸に沿ったグローバルなエピゲノムダイナミクスの解析については、主にシニア研究者である佐々木(計画)と小倉(計画)が行った。佐々木(計画)は次世代シーケンサーを駆使することで多能性幹細胞からの生殖細胞の発生過程 (**Dev Cell**)、精子幹細胞の分化過程におけるエピゲノム変化について解析を行った(**BMC Genomics**)。卵子発生過程における Non-CpG メチル化部位のゲノムワイド解析 (**PLoS Genet**)、及び piRNA プロファイリングもこれに該当する(**Nucleic Acids Res**)。いずれも卵子のエピゲノム解析のスタンダードとなる成果として意義が大きい。小倉(計画)が生殖サイクルと世代交代の機構を明らかにするために行った、核移植クローン技術を用いた各ステージのエピゲノム特性変化の解析も領域内共同研究による我が国のみで技術的に可能な重要な成果である(**Epigenetics**)。

もう一つの目標であるエピゲノムの操作については篠原(計画)の DNA の脱メチル化による精子幹細胞からの多能性幹細胞の誘導が代表的な成果として挙げられる(**Genes Dev**)。エピゲノム操作はクローン技術にも適用された。現在クローン動物の作成はさまざまな体細胞を使って可能であるが、成体ニューロンを用いてクローン動物を作成することは不可能である。小倉(計画)はこれに着目し、培養下でヒストン脱アセチル化剤であるトリコスタチン処理を行うことで、初めてニューロンからクローン動物の作成に成功した(**Biol Reprod**)。宮川(公募)による piRNA による DNA 脱メチル化法の開発もエピゲノム操作のユニークな成果として挙げられる。この仕事では 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**)。

本計画班にはヒトを対象とした研究がほとんどなかったために公募研究でこれを補充しようと計画していた。その意味では若手研究者である、岡江(公募)によるヒト TS 細胞の樹立は当初計画研究に欠けていたヒト生殖系列細胞研究を補った画期的な成果である(**Cell Stem Cell**)。この研究は佐々木(計画)との共同研究となされたもので、ヒトの着床不全や習慣性流産の原因解明に役立つものであり、技術支援グループの成果としても代表的なものとして挙げられる。

当初予期していなかったにも関わらず得られた重要な知見も報告できた。伊川(計画)による精巣特異的 Calcineurin による精子形成の制御は特筆に価する (**Science**)。免疫抑制剤である FK506 やサイクロスポリンの副作用として精子形成の抑制が起こることが知られていたが、この論文はそのメカニズムを明らかにしたものであり、男性用ピルの開発としての応用が期待される。篠原(計画)が小倉(計画)と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研究も現在の不妊治療の考え方に変更を迫る予期しなかった重要な成果である(**Cell Stem Cell**)。同じく、篠原(計画)による一部分の精子幹細胞のみが同時期に次世代に遺伝情報を伝達しているという発見も予想外の成果であった(**Dev Cell**)。

### 3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1ページ以内）

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。

#### ①研究遂行上で生じた問題点等

##### 問題点1 次世代シーケンサーのトラブル

本領域では次世代シーケンサーを用いた解析を含め支援業務が重要な役割を果たすこととなり、エピゲノム解析研究のインフラの確立に力を注いだ。しかしながら、佐々木（計画）が Illumina HiSeq を用いて次世代シーケンスを行ったところ、HiSeq の異なったバージョンのソフトウェア (HiSeq control software; HCS) を用いると、ゲノム全体の CpG メチル化レベルが異なった結果となることが分かった。同じライブラリーを評価して 5%程度異なるので、一度解析したサンプルを再度解析する必要が生じた。

##### 問題点1に対する対策

この問題を解決するために、既知の CpG メチル化レベルが確定したサンプルを用いて異なったバージョンの HCS により比較検討したところ、HCS v2.0.5 が最適な結果を出すことを見いだした。このため領域内の支援業務で用いたサンプルの再解析を行うこととなり研究が遅延するという問題が発生した。その後はこの問題は解決されたものの、この結果は Illumina HiSeq を使用する研究者に大きな影響を与えるために、論文として報告した(BMC Genomics 2017)。

##### 問題点2 公募研究者による最終年度の研究費の繰り越し

山口（公募）のグループにおいて最終年度にマウス飼育管理のトラブルがあり、このため研究費を半年の間繰り越す事態が生じた。代表者は Tet1 欠損マウスの卵、およびその卵と野生型マウスの精子を受精させた受精卵を用いてメジャーサテライトの発現量を測定する実験を試みた。当初の目的では平成 29 年度 8 月までに Tet1 ヘテロマウスの交配を行い十分な Tet1 欠損メスマウスを増やしたのちに、卵の回収や受精卵の作成を行い、平成 30 年度 3 月までにデータを回収する予定で研究を開始した。しかしながら、Tet1 欠損マウスの繁殖の過程で想定以上に致死が生じ、殆どのメスのノックアウト個体が回収できないという事態が発生した。通常 25%がホモとなり、オスでは理論値に近い 20%程度でホモ個体を得ることができたが、メスの場合には 5%程度しかホモ個体を得ることができず、実験に十分な数の個体を揃えることが不可能であった。山口（公募）が過去に米国で同様の実験を行った場合には、順調に実験が出来たために、この事態を事前に予測するのは困難であった。このため、直接経費 800 千円、間接経費 96 千円、合計 896 千円を平成 30 年 9 月まで繰り越しを生じるという事態が発生した。公募研究者が大阪大学に繰越申請を提出したのは 2018 年 1 月 22 日であり、大学はそれを受理した。

##### 問題点2に対する対策

領域代表者にこの事態の連絡があったのは領域終了後の 2018 年 4 月 4 日の段階であり、同日に学術審議官に連絡、4 月 11 日に文部科学省より、対応についての連絡があった。平成 30 年 4 月 4 日に学術審議官に公募班における繰り越しの旨を報告した。同 4 月 11 日に対応について文部学省から連絡があった。

#### ②組織変更の有無

該当なし。

#### 4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況（2ページ以内）

審査結果の所見及び中間評価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。

##### <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>

###### 【指摘事項】

「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。」

###### 【対応状況】

###### 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た上に、CRESTで雇用している藤特任講師（バイオインフォマティクス）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た。加えて、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に参加して頂き、アドバイスを得た。

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）の山本拓也助教と生命動態研究センターの本田直樹准教授にテクニカルアドバイザーとして参加して頂いた。山本氏は数理解析・次世代シーケンスに造詣が深く、RNA スプラッ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、佐々木（計画）、栗本（公募）との共著論文が発表された（Cell Rep, EMBO J）。現在も計画班員との共同研究が進行している。また篠原（計画）らは本田直樹准教授との共同研究により数理解析を用いた論文も2報発表することができた（Dev Cell, Biol Reprod）。

###### 2. 「他の大型研究課題との研究内容の切り分け」

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、中間評価時には2名（小倉、佐々木）であった。小倉（計画）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った。それに対して、新学術領域研究では、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研究を行った。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においてヒトエピゲノム解析を行った。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、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該当しないと考えられ、研究内容についても適切に切り分けを行った。

##### <中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

【指摘事項】融合研究がある程度行われているものの、研究成果はまだ少ない印象がある。今後の更なる研究成果を期待したい。研究分野が近い他の新学術領域研究との連携を期待したい。また、以前からの研究の延長ではなく、新学術領域研究として研究体制を組んだことで初めて可能になる「エピジェネティクスのダイナミクス」について、他の学問分野にも普遍的に波及するオリジナルでインパクトの高い成果を期待したい。

###### 【対応状況】

###### 1. 融合研究について

融合研究は領域の後半になり増加し、140本の発表論文のうち48本が領域内共同研究による研究成果となった。

## 2. 研究分野が近いほかの新学術領域との連携

研究分野が近い他の新学術領域研究との連携を行うため、「ステムセルエイジングから解明する疾患原理（幹細胞老化）」班（代表：岩間厚博士）とは共同で平成 28 年度に公開シンポジウムを行った。このシンポジウムでは両方の班から計画代表者と公募研究者が参加し、双方の領域に欠けているもの、若手研究者が取り組むべき未来の課題についてなど領域外総括班員を交えて総合討論を行った。さらに若手勉強会においても平成 28 年度に「幹細胞老化」班と、更に平成 29 年度に「幹細胞老化」班に加えて「動的クロマチン構造と機能（クロマチン動構造）」班（代表：胡桃坂仁志博士）を合わせた 3 班合同の勉強会もおこなった。合計 93 名の参加があり、活発な討議が行われた。各研究室紹介や留学体験、技術指導についてのトピックについての議論が特に活発に行われた。

「動物における配偶子産生システムの制御（配偶子形成）班（代表：小林悟博士）とは本領域のヒト精子幹細胞研究のために共同研究者として来日した Dirk de Rooij 博士（オランダ・ユトレヒト大学）、John McCarrey 博士（米国テキサス大学・サンアントニオ校）を交えて共同研究打ち合わせをおこなった。前者とは「染色体オーケストレーションシステム（染色体 OS）」班（代表：白鬚克彦博士）のメンバーと議論する機会も設けた。また、平成 29 年度に「配偶子形成班」の国際シンポジウムが行われたときに、本領域の計画研究者、公募研究者も参加し、共同主催で領域の交流が行われた。これらの交流をきっかけにこれらの領域との共同研究もスタートし小倉（計画）や伊川（計画）による技術支援により配偶子班及びクロマチン班と論文発表も行われた(Sci Rep, Cell Rep)。

## 3. 新学術領域研究として研究体制を組んだことで初めて可能になる「エピジェネティクスのダイナミクス」

本領域の特徴である分子生物学者と生殖細胞研究者の共同研究による論文として、いくつか特筆すべき論文が発表された。たとえば、岡江（公募）によるヒト TS 細胞の樹立は若手研究者による重要な成果であった（**Cell Stem Cell**）。これまでヒト ES 細胞の樹立が注目されていたが、同じく胚盤胞から樹立が可能とされていた TS 細胞についてはヒトでの樹立は報告されていなかった。岡江（公募）により樹立された細胞の解析を佐々木（計画）が次世代シーケンサーを用いたインプリンティング遺伝子解析を行うことで充実した内容となり完成した。若手研究者である岡江（公募）の発見をシニアメンバーによる技術支援で論文にまとめることができた点で領域設定時の支援班を設立した目論見がうまく達成できた成果として位置付けられる。ヒト TS 細胞の樹立は世界初の成果であり、今後不妊症や流産の機構解明に役立つと期待される。また佐々木（計画）と栗本（公募）らの共同研究では試験管内で ES 細胞より分化誘導された始原生殖細胞における DNA メチル化の変動が解析された（**Dev Cell**）。この場合もインプリンティング遺伝子の発現動態解析が次世代シーケンサーを用いて行われた。この成果も多能性幹細胞からの生殖細胞誘導技術とエピゲノム解析技術を組み合わせることで初めて可能となったもので、本技術の将来のヒト生殖医療への応用の是非を考える上で重要な成果である。

中間評価時に「公募研究で若手を積極的に採択した点は評価できる」とのコメントを頂いたが、北島（公募）や岡江（公募）など、若手研究者による著しい成果が挙がっており、教授に就任したものが 5 名も領域から出たことは予想外の成果であった。

## 5. 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 ページ以内)

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。記述に当たっては、本研究課題により得られたものに厳に限ることとします。

### 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」

計画研究 1（研究代表者 相賀裕美子） は Nanos2 が精子幹細胞の未分化制御に関わることを示した(*Dev Cell* 2015)。生殖細胞の性決定に関わる雌化因子として、Stra8 と Smad4 を同定した (*PLoS Biol* 2016)。また、精子幹細胞の維持には Nanos2 を介した mRNP 機能が必須であり、Nanos2 の安定性に E3 リガーゼ Nedd4 が重要な役割を果たすことを証明した(*Nat Commun* 2017)。

計画研究 2（研究代表者 篠原隆司） は GS 細胞の自己複製に活性酸素が必要であることを示し(*Cell Stem Cell* 2013)、GS 細胞における Dmrt1 の発現低下が GS 細胞のリプログラミングを誘導して多能性を誘導することを明らかにした (*Genes Dev* 2013)。更に精子幹細胞のがん化に関わる Myc 遺伝子の発現制御がユビキチンリガーゼである Fbxw7 により起こり (*PNAS* 2014)、Myc が GS 細胞の解糖系を促進することで自己複製分裂が活性化されることを見いだした (*Genes Dev* 2016)。GS 細胞を介した遺伝現象を解析する過程で、精子幹細胞の一部のみが子孫に遺伝情報を伝達することを数理解析の手法を用いて発見した (*Dev Cell* 2016)。技術的には人工染色体やアデノ随伴ウイルスを用いた GS 細胞の遺伝子導入技術の開発も行った(*Stem Cell Reports* 2017, *Stem Cell Reports* 2018)。特に人工染色体導入は GS 細胞のゲノムに挿入されずに安定的に維持できるため、GS 細胞のエピゲノム操作に有効な手法となった。

計画研究 3（研究代表者 中馬新一郎） は、GS 細胞を幹細胞から第一減数分裂前期まで試験管内分化させることに成功した。また生殖系列サイクルの遺伝情報の継承と再編を制御する分子基盤を解明するため、ES 細胞、GS 細胞の in vitro 増殖分化系およびマウス in vivo サンプルを用いたマルチオミクス解析とゲノム安定性の詳細な検討を行った。その結果、生殖系列サイクルのゲノム安定性は発生段階に応じた特徴的な調節を受けること、またゲノム安定性に関わる遺伝子群（トランスポゾン制御を含む）と減数分裂制御に関わる遺伝子群の興味深いクロストーク制御を明らかにすることが出来た (*Mol Cell Biol* 2017)。

### 公募研究

立花（公募） は 小倉（公募） および 阿部（公募） との共同研究により H3K9 のジメチル化の除去に関わる酵素である Jmj1a が性決定遺伝子である Sry の発現制御に関わることを示した(*Science* 2013)。栗本（公募） は 佐々木（計画） との共同研究により始原生殖細胞のエピゲノムリプログラミング過程における、潜在的な多能性の制御機構を解析し、生殖細胞形成に必要な転写因子 Blimp1 の標的ゲノム部位を再構成始原生殖細胞とリプログラミングの進行した雌雄生殖細胞において決定し、比較検討した (*Nucleic Acids Res* 2017)。奥田（公募） は ES および GS 細胞において転写因子 Max をノックダウンすることで、減数分裂パキテン期の細胞を誘導することに成功した(*Nat Commun* 2016)。阿部（公募） は 小倉（計画） との共同研究により Wnt シグナル阻害剤を用いた初期胚由来の EpiSC の新規培養法を開発した (*Stem Cell Reports* 2015)。また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* 2014)。関（公募） は ES 細胞から分化誘導した EpiLC 細胞に Prdm14 遺伝子を強制発現すると、脱分化が起こり ES 細胞様細胞へと変化することを見いだした(*Stem Cell Reports* 2016)。

## 研究項目 A02「受精・初期胚におけるエピゲノム変化」

計画研究 4 (研究代表者 齋藤都暁)はショウジョウバエにおいて Piwi に結合する核内因子 DmGTSF1 が piRNA による H3K9 トリメチル化誘導に必須であることを示した (**Genes Dev** 2013)。また、Piwi がリンカーヒストン H1 と直接相互作用し、H1 のトランスポゾン領域における密度を正に制御することを見いだした (**Mol Cell** 2016)。

計画研究 5 (研究代表者 中村肇伸)は、受精後の DNA 脱メチル化制御に関与する Dppa3 を用いることにより、高い分化能を示す高品質 iPS 細胞を誘導できることを明らかにした(**Nat Commun** 2015)。また、MuERV-L の LTR 制御下で tdTomato を発現する ES 細胞を作製し、ES 細胞に含まれる全能性細胞を可視化する実験系を構築した。この ES 細胞を用いて全能性細胞を誘導できる培養条件の検討を行い、全能性細胞の割合を 0.01% から約 20% まで増加させることに成功した。

計画研究 6 (研究代表者 伊川正人)は、CRISPR/Cas9 システムによる迅速 KO マウス作製法を確立し、精巣特異的に発現する 54 遺伝子が単独では妊孕性に必須でないことを明らかにした (**PNAS** 2016)。一方、妊孕性に必須な遺伝子も同定しており、その解析から精子カルシニューリンが精子中辺部の屈曲に必須であり、その選択的阻害剤が男性避妊薬の候補となることを報告した (**Science** 2015)。

計画研究 7 (研究代表者 東田裕一)は、受精卵における雄性 DNA の Tet3 による能動的脱メチル化が、実は発生には必須でないことを明らかにした (**Sci Rep** 2015)。

## 公募研究

岡江 (公募)は佐々木 (計画)との共同研究によりヒト胚盤胞からの TS 細胞の樹立に成功した (**Cell Stem Cell** 2018)。ヒト TS 細胞の樹立はこれまでに多くの研究者が挑戦してきた課題であったが、培養条件の確定が困難であった。岡江らは EGF の添加、Wnt シグナル活性化、TGF-beta シグナル、ヒストン脱アセチル化、ROCK シグナルの抑制を組み合わせ、ヒト胎盤細胞と同等の遺伝子発現を持つ細胞の樹立を行った。この細胞はヒト不妊症や着床不全の研究に役立つと期待されている。谷本 (公募)は巨大 DNA 分子を用いたトランスジェニックマウスを用いることで、ゲノムインプリンティングが受精後も精密な制御を受けていることを証明した。H19 遺伝子は生殖細胞における DNA メチル化で完成するのではなく、受精後もアリの由来を認識する機構が働き、DNA メチル化を維持することで正常性を保証されている可能性が明らかになった(**Development** 2015)。北島 (公募)はライブイメージングと顕微操作を合わせたアプローチを用いて、卵母細胞の巨大な細胞質サイズは、染色体分配エラーを起こしやすい性質と結びついていることを明らかにした(**Dev Cell** 2017)。この発見は流産や先天性疾患の原因である染色体数異常を理解するための基盤となる成果である。

## 研究項目 A03「エピゲノム解析・制御技術」

計画研究 8 (研究代表者 小倉淳郎)は着床前後のエピジェネティクス変化に着目し、ヒストンシャペロン CAF-1 がヒストンバリエント H3.1 をリクルートし、体細胞の抑制ゲノム状態を誘導することを示し (**PNAS** 2015)、父方発現をするマイクロ RNA 群が胚体外組織の発生に必須であることを明らかにした (**Cell Rep** 2017a)。さらに受精時における父方ゲノムの再プログラム化にヒストンメチル化 H3R17me2a が必須であることを証明した(**Cell Rep** 2017b)。これらの仕事により、これまで生殖サイクルのエピゲノム変化の多くは、DNA メチル化で説明されてきたが、核移植技術を駆使することで、ヒストンメチル化が大きな役割を果たしていることを明らかにすることができた。また、抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いて、ダニおよび卵白アルブミンアレルギーマウスを作出することにも成功している (**EMBO Rep** 2017)。

計画研究 8 (研究分担者 幸田尚) はヒト胚盤胞期胚の遺伝子発現プロファイルを解析し、最も多くの遺伝子の発現に影響を及ぼす因子は母親年齢であり、変動する遺伝子には *Pttg1* や *Aurkc* といった減数分裂時の染色体分配に重要な遺伝子が含まれていることを明らかにした (**Sci Rep** 2018)。これと並行して、DNA 脱メチル化の中間体であるヒドロキシメチルシトシンの新しい原理に基づく解析法の開発を行った(**Nucleic Acids Res** 2017)。

計画研究 9 (研究代表者 佐々木裕之) は精子幹細胞分化におけるエピゲノムと遺伝子発現の変化を明らかにし、それらを制御する新規候補因子を抽出した (**BMC Genomics** 2015)。また卵子の発生過程における Non-CpG メチル化部位のゲノムワイド解析 (**PLoS Genet** 2013)、piRNA のプロファイリングを行った (**Nucleic Acids Res** 2017)。更に多能性幹細胞から 培養下で誘導した始原生殖細胞の DNA メチル化及び遺伝子発現を詳細に調べ、転写制御因子 *Prdm14* による制御とインプリント制御領域の脱メチル化機序を明らかにした (**Dev Cell** 2016)。

### 公募研究

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複数の化合物を得た。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複数の化合物を得た(**Nat Commun** 2015)。原田 (公募) は伊川 (計画) との共同研究によりヒストンバリエントの一つである、H3t 遺伝子を欠損したマウスの作成を行った (**Cell Reports** 2017)。このヒストンはもう一つのバリエントである H3.1 と 3 つのアミノ酸しか異なっていないにも拘らず、H3t 遺伝子のノックアウトマウスでは分化型の精原細胞より後のステージの生殖細胞が欠損して不妊になるという結果を得た。このヒストンは未分化型精原細胞や精子にも見当たらず、精子形成で一過性に発現するのみであるが、精子形成に必要という新しいタイプのヒストンであった。また H3.6, H3.7, H3.8 の発現部位を確認し、H3.5 は閉塞性無精子症の患者において発現が低いこと、ホルモン療法により H3.5 の発現が回復することを明らかにした(**Andrology** 2018)。

## 6. 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ページ以内）

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。記述に当たっては、本研究課題により得られたものに厳に限ることとします。

- 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。
- 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。
- 補助条件に定められたとおり、本研究課題に係り交付を受けて行った研究の成果であることを表示したもの（論文等の場合は謝辞に課題番号を含め記載したもの）について記載したもののについては、冒頭に▲を付してください（前項と重複する場合は、「◎▲・・・」と記載してください）。
- 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。

【**発表論文**】合計 406 件からの抜粋。392 報が査読あり。

### 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」

#### 計画班

#### A01-01（計画・相賀 裕美子） 計 1 4 件（査読有 1 4 件、査読無 0 件）

▲Zhou, Z., Kawabe, H., Suzuki, A., Shinmyozu, K., and \*Saga, Y. (2017). NEDD4 controls spermatogonial stem cell homeostasis by regulating messenger ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8, 15662.

▲Kato, Y., Katsuki, T., Kokubo, H., Masuda, A., and \*Saga, Y. (2016). Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat. Commun.* 7, 11272.

▲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* 34, 96-107.

#### A01-02（計画・篠原 隆司） 計 2 3 件（査読有 2 3 件、査読無 0 件）

▲Shinohara, T., Kazuki, K., Ogonuki, N., Morimoto, H., Matoba, S., Hiramatsu, K., Honma, K., Suzuki, T., Hara, T., Ogura, A., Oshimura, M., \*Kanatsu-Shinohara, M., and \*Kazuki, Y. (2017). Transfer of a mouse artificial chromosome into spermatogonial stem cells generates transchromosomal mice. *Stem Cell Reports* 9, 1180-1191.

▲Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Ogonuki, N., Ogura, A., Morimoto, H., Cheng, P. F., Eisenman, R. N., Trumpp, A., and \*Shinohara, T. (2016). Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 30, 2637-2648.

▲\*Kanatsu-Shinohara, M., Naoki, H., and Shinohara, T. (2016). Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev. Cell* 38, 248-261.

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.

\*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.

Takashima, 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.

#### A01-03（計画・中馬 新一郎） 計 9 件（査読有 9 件、査読無 0 件）

▲Mochizuki, A.L., Katanaya, A., Hayashi, E., Hosokawa, M., Moribe, E., Motegi, A., Ishiai, M., Takata, M., Kondoh, G., Watanabe, H., Nakatsuji, N., and \*Chuma, S. (2017). PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. *Mol Cell Biol.* 37, e00117-17.

#### 公募班（平成 28～29 年度）

#### A01（公募・石津 大嗣） 計 3 件（査読有 3 件、査読無 0 件）

Ishizu, H., Sumiyoshi, T., \*Siomi, M.C. (2017) Use of the CRISPR-Cas9 system for genome editing in cultured *Drosophila* ovarian somatic cells. *Methods.* 126, 186-192.

#### A01（公募・栗本 一基） 計 5 件（査読有 5 件、査読無 0 件）

▲Mitani, T., Yabuta, Y., Ohta, H., Nakamura, T., Yamashiro, C., Yamamoto, T., \*Saitou, M., and \*Kurimoto, K. (2017). Principles for the regulation of multiple developmental pathways by a versatile transcriptional factor, BLIMP1. *Nucleic Acids Res* 45, 12152-12169.

A01 (公募・立花 誠) 計 9 件 (査読有 9 件、査読無 0 件)

▲Kuroki, S., Nakai, Y., Maeda, R., Okashita, N., Akiyoshi, M., Yamaguchi, Y., Kitano, S., Miyachi S., Nakato, R., Ichianagi, K., Shirahige, K., Kimura, H., Shinkai, Y., and \*Tachibana, M. (2018). Combined loss of Jmjd1a and Jmjd1b reveals critical roles for H3K9 demethylation in the maintenance of embryonic stem cells and early embryogenesis. *Stem Cell Reports*. 10, 1340-1354.

A01 (公募・奥田 晶彦) 計 5 件 (査読有 4 件、査読無 1 件)

Suzuki, A., Hirasaki, M., Hishida, T., Wu, J., Okamura, D., Ueda, A., Nishimoto, M., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Matsui, Y., Izpisua Belmonte, J. C., and \*Okuda, T. (2016). Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. *Nat. Commun.* 7, 11056.

A01 (公募・石黒 啓一郎) 計 2 件 (査読有 2 件、査読無 0 件)

▲Ishiguro, K., Nakatake, Y., Chikazawa-Nohtomi, N., Imura, H., Akiyama, T., Oda, M., Ko, SBH., and Ko, MSH. (2017). Expression analysis of the endogenous Zscan4 locus and its coding proteins in mouse ES cells and preimplantation embryos. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Anim.* 53, 179-190.

A01 (公募・関 由行) 計 2 件 (査読有 1 件、査読無 0 件)

▲Okashita, N., Suwa, Y., Nishimura, O., Sakashita, N., Kadota, M., Nagamatsu, G., Kawaguchi, M., Kashida, H., Nakajima, A., Tachibana, M., and \*Seki, Y. (2016). PRDM14 drives Oct3/4 recruitment via active dimethylation in the transition from primed to naïve pluripotency. *Stem Cell Reports* 7, 1072-1086.

A01 (公募・品川 敏恵) 計 1 件 (査読有 1 件、査読無 0 件)

Padavattan, S., Thiruselvam, V., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and \*Kumarevel, T. (2017). Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophys. Chem.* 221, 41-48.

A01 (公募・阿部 訓也) 計 1 3 件 (査読有 1 3 件、査読無 0 件)

▲Yanokura, M., Banno, K., Adachi, M., Aoki, D., and \*Abe, K. (2017). Genome-wide DNA methylation sequencing reveals miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer. *International Journal of Oncology* 50, 1934-1946.

公募班 (平成 26~27 年度)

A01 (公募・鈴木 仁美) 計 5 件 (査読有 7 件、査読無 0 件)

#Ren, Y., #Suzuki, H., Jagarlamudi, K., Golnoski, K., McGuire, M., Lopes, R., Pachnis, V., and Rajkovic, A. (#co-first authors) (2015). Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol.* 13, 39.

A01 (公募・立花 誠) 計 5 件 (査読有 5 件、査読無 0 件)

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., \*Tachibana, M. (2013). Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science* 341, 1106-1109.

A01 (公募・宮川 さとみ) 計 3 件 (査読有 3 件、査読無 0 件)

Itou, D., Shiromoto, Y., Yukiho, S.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.

A01 (公募・奥田 晶彦) 計 1 0 件 (査読有 9 件、査読無 1 件)

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 ESS status in the absence of nucleostemin expression. *Stem Cells* 33, 1089-1101.

A01 (公募・山中 総一郎) 計 1 件 (査読有 1 件、査読無 0 件)

Yashiro, R., Murota, Y., Nishida, K., Yamashiro, H., Fujii, K., Ogai, A., Yamanaka, S., Negishi, L., Siomi, H., and \*Siomi, MC (2018). Piwi nuclear localization and its regulatory mechanism in Drosophila ovarian somatic cells. *Cell Reports* in press

A01 (公募・関 由行) 計 1 件 (査読有 1 件、査読無 0 件)

Okashita, N., Sakashita, N., Ito, K., Mitsuya, A., Suwa, Y., and \*Seki, Y. (2015). PRDM14 maintains pluripotency of embryonic stem cells through TET-mediated active DNA demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 466, 138-145.

A01 (公募・阿部 訓也) 計 1 0 件 (査読有 1 0 件、査読無 0 件)

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.

研究項目 A02 「受精・初期胚におけるエピゲノム変化」  
計画班

A02-01 (計画・齋藤 都暁) 合計 5 件 (査読有 5 件、査読無 1 件)

Iwasaki, Y. W., Murano, K., Ishizu, H., Shibuya, A., Iyoda, Y., Siomi, M. C., \*Siomi, H., and \*Saito, K. (2016). Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons. *Mol. Cell* 63, 408-419.

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.

A02-02 (計画・中村 肇伸) 合計 20 件 (査読有 18 件、査読無 2 件)

Furuta A, \*Nakamura, T. (2017). DNA hypomethylation circuit of mouse rDNA repeats in the germ cell lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490, 429-433.

#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.

Funaki, S., \*Nakamura, T., Nakatani, T., Umehara, H., Nakashima, H., and \*Nakano, T. (2014). Inhibition of maintenance DNA methylation by Stella. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 455-460.

A02-03 (計画・伊川 正人) 合計 66 件 (査読有 66 件、査読無 0 件)

▲Castaneda, J. M., Hua, R., Miyata, H., Oji, A., Guo, Y., Cheng, Y., Zhou, T., Guo, X., Cui, Y., Shen, B., Wang, Z., Hu, Z., Zhou, Z., Sha, J., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Yu, Z., Ramirez-Solis, R., \*Ikawa, M., \*Matzuk, M. M., and \*Liu, M. (2017). TCTRE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, E5370-E5378.

▲Miyata, H., Castaneda, J. M., Fujihara, Y., Yu, Z., Archambeault, D. R., Isotani, A., Kiyozumi, D., Kriseman, M. L., Mashiko, D., Matsumura, T., Matzuk, R. M. Mori, M., Noda, T. Oji, A., Okabe, M., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Ramirez-Solis, R., Satouh, Y., Zhang, Q., \*Ikawa, M., and \*Matzuk, M. M. (2016). Genome engineering uncovers 54 evolutionally conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 113, 7704-7710.

Miyata, H., Satouh, Y., Mashiko, D., Muto, M., Nozawa, K., Shiba, K., Fujihara, Y., Isotani, A., Inaba, K., and \*Ikawa, M. (2015). Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* 350, 442-445.

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.

A02-04 (計画・東田 裕一) 合計 3 件 (査読有 2 件、査読無 0 件)

▲\*Tsukada, Y., Akiyama, T., and Nakayama, K. I. (2015). Maternal TET3 is dispensable for embryonic development but is required for neonatal growth. *Sci. Rep.* 5, 15876.

公募班 (平成 28~29 年度)

A02 (公募・青木 不学) 合計 8 件 (査読有 8 件、査読無 0 件)

Ooga, M., Funaya, S., Hashioka, Y., Fujii, W., Naito, K., Suzuki, M.G. and \*Aoki, F. (2018). Chd9 mediates highly loosened chromatin structure in growing mouse oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 500, 583-588.

A02 (公募・山口 新平) 合計 0 件

A02 (公募・宮本 圭) 合計 9 件 (査読有 9 件、査読無 0 件)

▲\*Miyamoto, K., Tajima, Y., Yoshida, K., Oikawa, M., Azuma, R., Allen, G.E., Tsujikawa, T., Tsukaguchi, T., Bradshaw, C.R., Jullien, J., Yamagata, K., Matsumoto, K., Anzai, M., Imai, H., Gurdon, J.B., and \*Yamada, M. (2017). Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol. Open* 6, 415-424.

A02 (公募・北島 智也) 合計 4 件 (査読有 3 件、査読無 1 件)

▲Kyogoku, H., and \*Kitajima, T. (2017). Large cytoplasm is linked to the error-prone nature of oocytes. *Dev. Cell* 41, 287-298.

公募班 (平成 26~27 年度)

A02 (公募・岡江 寛明) 合計 8 件 (査読有 5 件、査読無 3 件)

▲\*Okabe, H., Toh, H., Sato, T., Hiura, H., Takahashi, S., Shirane, K., Kabayama, Y., Suyama, M., Sasaki, H., and \*Arima, T. (2018). Derivation of human trophoblast stem cells. *Cell Stem Cell* 22, 50-63.

A02 (公募・谷本 啓司) 合計 3 件 (査読有 3 件、査読無 0 件)

▲Matsuzaki, H., Okamura, E., Takahashi, T., Ushiki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Hata, K., Fukamizu, A. and \*Tanimoto, K. (2015) *De novo* DNA methylation through the 5'-segment of the *H19* ICR maintains its imprint during early embryogenesis. *Development* 142, 3833-3844.

A02 (公募・廣田 泰) 合計 4 0 件 (査読有 3 1 件、査読無 9 件)

©Hiraoka, T., \*Hirota, Y., Saito-Fujita, T., Matsuo, M., Egashira, M., Matsumoto, L., Haraguchi, H., Dey, S. K., Furukawa, K. S., Fujii, T., and Osuga, Y. (2016). STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI insight*. 1, e87591, 2016

A02 (公募・青木 不学) 合計 8 件 (査読有 8 件、査読無 0 件)

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, 1523-153.

A02 (公募・遠藤 充浩) 合計 1 件 (査読有 1 件、査読無 0 件)

▲Endoh, M., Endo, T. A., Shinga, J., Hayashi, K., Farcas, A., Ma, K. W., Ito, S., Sharif, J., Endoh, T., Onaga, N., Nakayama, M., Ishikura, T., Masui, O., Kessler, B. M., Suda, T., Ohara, O., Suzuki, A., Klose, R., and Koseki, H. (2017). PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *Elife* 6, e21064.

研究項目 A03 「エピゲノム解析・制御技術」  
計画班

A03-01 (計画・小倉 淳郎、(分担) 幸田 尚) 合計 6 2 件 (査読有 6 0 件、査読無 2 件)

©▲Hatanaka, Y., Tsusaka, T., Shimizu, N., Morita, K., Suzuki, T., Machida, S., Satoh, M., Honda, A., Hirose, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Nakamura, T., Inoue, K., Hosoi, Y., Dohmae, N., Nakano, T., Kurumizaka, H., Matsumoto, K., Shinkai, Y., and \*Ogura, A. (2017). Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming the paternal genome in zygotes. *Cell Rep.* 20, 2756-2765.

▲\*Inoue, K., Hirose, M., Inoue, H., Hatanaka, Y., Honda, A., Hasegawa, A., Mochida, K., and \*Ogura, A. (2017). The rodent-specific microRNA cluster within the *Sfmbt2* gene is implicated and essential for placental development. *Cell Rep.* 19, 949-956.

▲Hatanaka, Y., Inoue, K., Oikawa, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Kodama, E.N., Ohkawa, Y., Tsukada, Y., and \*Ogura, A. (2015) Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14641-14646.

▲\*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.

▲Kawasaki, Y., Kuroda, Y., Suetake, I., Tajima, S., Ishino, F., and \*Kohda, T. (2016). A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution. *Nucleic Acids Res.* 45, e24.

A03-02 (計画・佐々木 裕之) 合計 2 0 件 (査読有 1 5 件、査読無 5 件)

▲Maenohara, S., \*Unoki, M., Toh, H., Ohishi, H., Sharif, J., Koseki, H., and \*Sasaki, H. (2017). Role of UHRF1 in de novo DNA methylation in oocytes and maintenance methylation in preimplantation embryos. *PLoS Genet.* 13, e1007042.

▲Inoue, K., \*Ichiyonagi, K., Fukuda, K., Glinka, M., and \*Sasaki, H. (2017). Switching of dominant retrotransposon silencing strategies from posttranscriptional to transcriptional mechanisms during male germ cell development in mice. *PLoS Genet.* 13, e1006926.

▲Shirane, K., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yamaji, M., Satoh, J., Ito, S., Watanabe, A., Hayashi, K., Saitou, M., and \*Sasaki, H. (2016). Global landscape and regulatory principles of DNA methylation reprogramming for germ cell specification by mouse pluripotent stem cells. *Dev. Cell* 39, 87-103.

公募班 (平成 28~29 年度)

A03 (公募・原田 哲仁) 合計 1 1 件 (査読有 1 1 件、査読無 0 件)

▲\*#Ueda, J., #Harada, A., #Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami, J., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tanaka, H., Tachiwana, H., Yao, T., Yamada, M., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Okada, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and \*Yamagata, K. (#co-first authors) (2017). Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* 18, 593-600.

公募班 (平成 26~27 年度)

A03 (公募・永瀬 浩喜) 合計 2 5 件 (査読有 2 2 件、査読無 3 件)

©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.

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 CpGi methylation within the third exon. *Int. J. Oncol.* 44, 1669-1677.

#### 【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】(主催シンポジウム合計 20 (海外 5, 国内 15 件); ワークショップ等 16 件より抜粋)

##### ● 2017年: 計画班

<佐々木裕之>シンポジウム企画 (企画: 佐々木裕之、眞貝洋一, Robert Feil, Pierre-Antoine Defossez) : France-Japan Epigenetics Workshop-2017, 2017, Paris, France. 2017.11. 06-08

##### ● 2016年: 計画班

<佐々木裕之>シンポジウム企画 (企画: 佐々木裕之、Genevieve Almouzni, Yang Shi, Bing Zhu) : Cold Spring Harbor Asia Conference on Chromatin, Epigenetics & Transcription, 2017, 蘇州, 中国. 2016.05. 09-13

##### ● 2015年: 計画班

<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 27 the 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 26 the 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-. 2013.09.10

<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」2013.09.11-13

#### 【アウトリーチ活動等】(合計 186 件より抜粋)

<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、細胞培養から見えてきた生命像・東京で学ぶ京大の知 (京都大学東京オフィス) 2015.07.30

<小倉淳郎>顕微授精技術研修 (5 回、17 名)、マウス胚・精子凍結技術研修(2 回、7 名)、実験動物の発生工学の講義と発生工学実験室の案内 (中学 1 回、高校生 27 回、大学 3 回、 合計 31 回) 理研 BRC

## 7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況（2ページ以内）

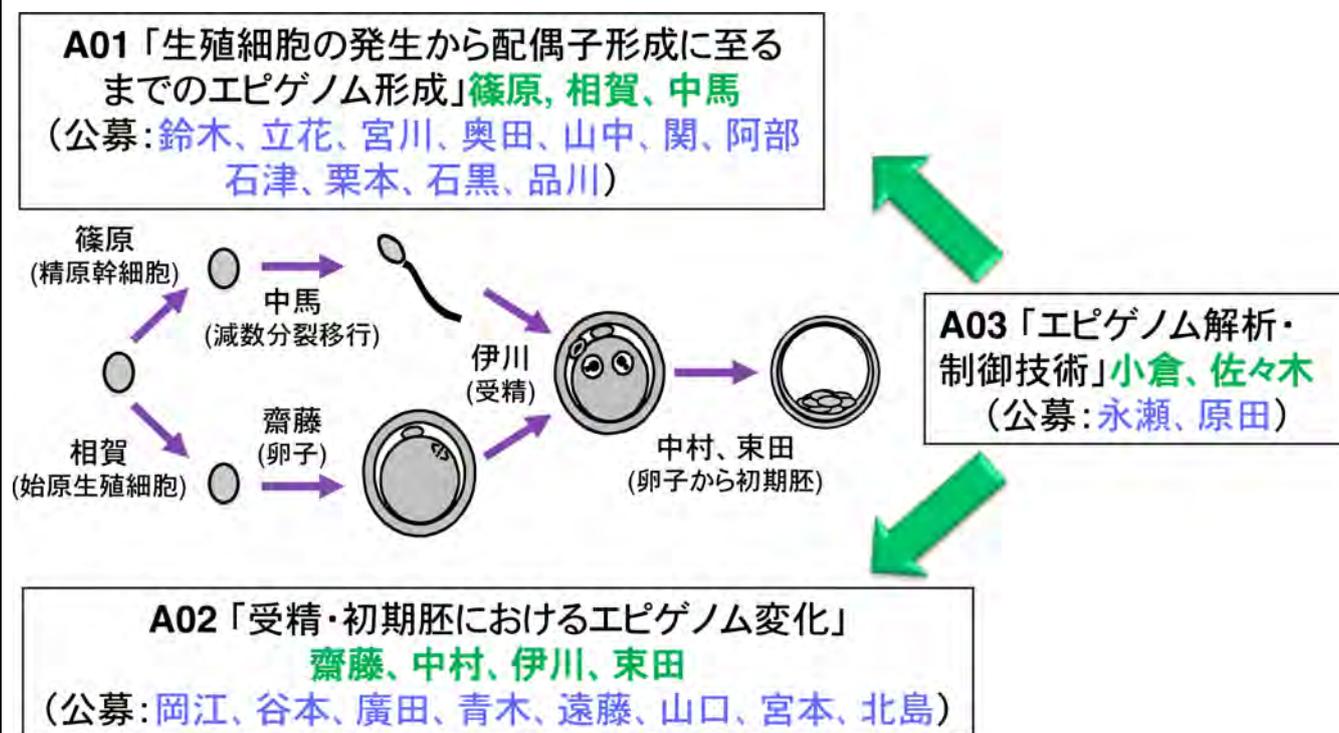
領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、総括班研究課題の活動状況も含め、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

### [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、時間軸に沿ったグループ 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」と技術軸を交差して A03「エピゲノム解析・制御技術」として領域研究を行ってきた。本領域の計画研究者は医(2)、薬(2)、理(3)、農(2)、獣医学(1)の博士号をもつ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た。

多様な背景を持つ研究者の学際的交流活性化により、本領域では緊密な共同研究が行われた。各計画班員平均では 25% (22/87 報)、公募班では 38% (20/53 報) が連携研究による共著論文を作成した。合計 140 報 (計画班 87 報/10 名、公募班 54 報/14 名) の発表論文のうち、48 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 (34%)。この共同研究論文のうち 42 報が支援班との共同研究による (30%) 点は特筆すべきである。

以下には成果発表済みの共同研究のみを列挙する (全て筆頭著者か責任著者論文)。



### 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

関 (公募) は立花 (公募) と共に Prdm14 を強制発現することで EpiLC 細胞を ES 細胞へと変換させることに成功した (Stem Cell Reports)。阿部 (公募) も小倉 (計画) との共同研究により EpiSC 細胞の新規培養法の確立を報告している (Stem Cell Reports)。奥田 (公募) は篠原 (計画) が樹立した GS 細胞や多能性幹細胞において Max をノックダウンすることで減数分裂期の zygotene 期の細胞を誘導した。宮川 (公募) も小倉 (計画) との共同研究により、人工的に piRNA を操作することで個体レベルにおいて特定の DNA 配列の脱メチル化を誘導することに成功した (Curr Biol)。

生後の精子幹細胞において篠原 (計画) が Dmrt1 が精子幹細胞の多能性制御に重要な分子であること (Genes Dev)、活性化酸素が精子幹細胞の自己複製に必須であること (Cell Stem Cell) をいずれも小倉 (計画) との共同研究により見出した。

### 研究項目 A02: 受精・初期胚におけるエピゲノム変化

岡江 (公募) は佐々木 (計画) との共同研究によりクローン動物のゲノムインプリンティング異常の解析に加

え (**Hum Mol Genet**)、ヒト TS 細胞の樹立に成功した (**Cell Stem Cell**)。谷本 (公募) は中村 (計画) との共同研究により H19 遺伝子の制御領域の解析を行った結果、H19 の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 (**Development**)。遠藤 (公募) は奥田 (公募) との共同研究により、non-canonical PRC1 コンポーネントの一つである Pcgf6 の機能解析を行い、この分子が Max/Mga ヘテロダイマーにより生殖細胞・減数分裂遺伝子にリクルートされて転写を抑制し着床前後の正常な胚発生に寄与することを明らかにした (**Elife**)。

#### 研究項目 A03: エピゲノム解析・制御技術

小倉 (計画) は東田 (計画) との共同研究により、ヒストンシャペロンである CAF1 が着床前胚の段階で内因性レトロウイルスを抑制するのに重要な役割を果たしていることを明らかにした (**PNAS**)。また中村 (計画) ととも共同研究によりヒストン H3 の Arg17 が父方ゲノムの受精時にリプログラミングに必須であることも見出している (**Cell Rep**)。中馬 (計画) とは RNA ヘリカーゼ D1Pas1 が第一減数分裂に必要であることを報告した (**BBRC**)。阿部 (公募) とは 15 件の共同研究を行った。核移植関連では X 染色体不活化とクローン動物作成効率の関与の解明を解析し (**Epigenetics**)、これまで核移植が不可能であった成体ニューロンをトリコスタチン処理により初めてクローン動物の作成に成功した (**Biol Reprod** 2015)。さらに核移植の効率改善効果をもつトリコスタチンの標的遺伝子の同定した (**Sci Rep**)。共同でマウス TS 細胞の性質解析を行い、幹細胞コロニーを 4 種類のコロニーの中から分類した (**Biol Reprod**)。技術面でも阿部 (公募) と共に野生マウスでの遺伝子編集にも初めて成功した (**Sci Rep**)。伊川 (計画) とウサギの遺伝子編集個体の作成に成功している (**Sci Rep**)。佐々木 (計画) は中馬 (計画)、相賀 (計画) と共に卵子における piRNA の役割解析を行った (**Nucleic Acids Res**)。また栗本 (公募) と多能性幹細胞からの始原生殖細胞の誘導過程におけるエピゲノム変化をゲノムワイドに解析した (**Dev Cell**)。原田 (公募) は伊川 (計画)、立花 (公募) と共に精巣特異的ヒストンバリエント H3t 欠損マウス作成によりこのヒストンが精子形成に一過性に発現するにも拘らず、精子形成に必要であることを示した (**Cell Rep**)。

これらの結果から本領域が我が国の生殖エピゲノム研究者にとって大きな役割を果たしたことがわかる。

国際研究支援は 2016 年度より開始されたが、その結果、**計画班員 10 名のうち、8 名が国際共著論文を発表**することができた。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相互交流が有機的に効率良く機能した領域となっており、世界的にも稀なエピゲノム研究体制が構築されている。領域終了後も多くの優れた研究成果が期待される。

#### 領域内共同研究による代表的な成果 (48 件の中より抽出)

1. 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**)
2. 篠原 (計画 A01) - 小倉 (計画 A03) 精子幹細胞における活性酸素の役割 (**Cell Stem Cell**)
3. 篠原 (計画 A01) - 小倉 (計画 A03) 解糖系亢進による精子幹細胞の自己複製促進 (**Genes Dev**)
4. 宮川 (公募 A01) - 小倉 (計画 A03) piRNA 操作による人為的脱メチル化誘導 (**Curr Biol**)
5. 岡江 (計画 A02) - 佐々木 (計画 A03) ヒト TS 細胞の樹立 (**Cell Stem Cell**)
6. 小倉 (計画 A03) - 立花 (公募 A01) - 阿部 (公募) ヒストン脱メチル化酵素と性決定 (**Science**)
7. 小倉 (計画 A03) - 東田 (計画 A02) 着床前胚における AF1 による内因性ウイルス抑制 (**PNAS**)
8. 小倉 (計画 A03) - 中村 (計画 A02) ヒストン H3 Arg17 のリプログラミングにおける機能解析 (**Cell Rep**)
9. 佐々木 (計画 A03) - 栗本 (公募 A01) 多能性幹細胞由来始原生殖細胞のエピゲノム解析 (**Dev Cell**)

## 8. 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 ページ以内）

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記述してください（総括班における設備共用等への取組の状況を含む。）。

### 1. 支援グループによる領域内研究サポート

近年のエピジェネティクス研究は技術が高度化しており、このために若手研究者や新規参入者が近づき難い状況となっている。そこで本領域ではシニアメンバーによる技術支援グループを設立し、この問題の解決に当たった。即ち、佐々木（計画）による次世代シーケンサー解析、小倉（計画）による初期胚操作、伊川（計画）による遺伝子ノックアウト・遺伝子編集グループ、幸田（計画）によるエピゲノム解析である。これらの支援は計画研究、公募研究の区別なく全てのグループに対して行われ、総括班から経費を支給し、できるだけ多くの共同研究を生み出す努力を行った。

前項に記載したように領域研究期間中に誌上発表した共同研究が42件にのぼる。それらの中には、試験管内でのES細胞からの始原生殖細胞形成時におけるエピゲノム変動（*Dev Cell* 2016）、活性酸素による精子幹細胞の自己複製分裂の促進（*Cell Stem Cell* 2013）、DNAメチル化の抑制による多能性幹細胞の樹立（*Genes Dev* 2013）などは本領域の支援グループによる成果であり、本領域の発展に大きな貢献が見られた。以下、それぞれのグループからの支援について列挙する。

1. 小倉（計画）による初期胚操作による支援は28件行われた。小倉（計画）はこれらの実験でマイクロマニピュレーター（篠原（計画））との顕微授精、佐々木（計画）との前核移植、東田（計画）との核移植）とリアルタイムPCR（東田（計画））との着床前胚の遺伝子発現解析）を利用している。このうち特筆すべき成果は活性酸素による精子幹細胞の自己複製分裂の促進（*Cell Stem Cell* 2013）、DNAメチル化の抑制による多能性幹細胞の樹立（*Genes Dev* 2013）などが挙げられる。
2. 佐々木（計画）による次世代シーケンサー支援も本領域には欠かせないものであり、佐々木（計画）は篠原、東田（計画）、立花、栗本、岡江（公募）との共同研究に利用した。通常のシーケンス解析に加えて、全ゲノムDNAメチル化解析も行われた。これにより試験管内でのES細胞からの始原生殖細胞形成時におけるエピゲノム変動（*Dev Cell* 2016）やヒトTS細胞の樹立（*Cell Stem Cell* 2018）などの成果が報告された。
3. 幸田（計画）はドロップレットPCRシステムQX100を利用して、中村、東田（計画）との共同研究で微量サンプルからのRNA-seqの結果のバリデーションに活用した。
4. 伊川（計画）は領域内で10件のゲノム編集マウスを作成した（中村（計画） :5系統、宮本（公募） :2系統、山口（公募） :1系統、宮川（公募） :1系統、原田（公募） :1系統）。これらの実験ではFemtojetとエレクトロポレーターNEPA21を利用し、それぞれ受精卵への前核注入、エレクトロポレーションに利用した。論文発表されたものの中でもHistone Variant H3tのノックアウトは研究領域が近い2つの新学術領域の共同研究成果として発表された（*Cell Rep* 2017）。また精子運動解析装置CEROSIIのアップグレードおよび倒立型リサーチ顕微鏡レリーフコントラストは精子の運動解析を高解像度で実施することを可能とするもので、共同研究に供してきた。国際活動支援班からの支援のもと、伊川（計画）はバイラー医科大のMatzuk博士とも遺伝子改変マウス作成を行って成果を挙げた（*PNAS* 2016）。

### 2. 研究試料・情報の領域内共有

領域内の研究情報交換窓口を利用して、抗体やマウスの共有が数多く行われたが、特筆すべきものとして篠原（計画）が樹立した精子幹細胞の培養株であるGS細胞を用いて共同研究成果が複数の公募班から報告された（*Epigenetics* 2014; *Cell Rep* 2017; *Nat Commun* 2016 など）。これは独立して核研究室で樹立されたものや、篠原班で樹立して提供されたものも含まれる。さらにGS細胞におけるChIPシーケンスデータの共有も行われた（未発表）。また佐々木（計画）による次世代シーケンサー支援については、ライブラリーの作成や実際のrunにかかる消耗品については全額または半額を負担し、利用者の負担を軽減する措置を取った。

・研究費の使用状況（（１），（２），（３）を合わせて３ページ以内）

（１）主要な物品明細（計画研究において購入した主要な物品（設備・備品等。実績報告書の「主要な物品明細書」欄に記載したもの。）について、金額の大きい順に、枠内に収まる範囲で記載してください。）

年度	品名	仕様・性能等	数量	単価（円）	金額（円）	設置(使用)研究機関
25	セルソーター	バイオラッド・145-1002J1	1	15,950,000	15,950,000	長浜バイオ大学
	共焦点顕微鏡高感度デテクター	オリンパス・V12-HSD-DU	1	3,350,000	3,350,000	国立遺伝学研究所
	Droplet Reader システム D	バイオラッド・QX100 BR-186-3	1	2,275,880	2,275,880	東京医科歯科大学
	96-well Shuttle デバイス	ロンザ・AAM-1001S	1	2,268,000	2,268,000	慶応大学
26	超遠心機一式	ベックマン・Optima EX-90	1	9,968,400	9,968,400	京都大学
	高速液体クロマトグラフ	島津製作所 Nexera システム	1	8,066,714	8,066,714	京都大学
	顕微鏡マニピュレーター	オリンパス・IX73P1-22RC-H	1	4,856,760	4,856,760	長浜バイオ大学
27	自動洗浄乾燥機	Steelco・LAB500C	1	2,795,580	2,795,580	慶応大学
	リアルタイム PCR	バイオラッド・CFX Connect	1	2,106,000	2,106,000	京都大学
28	リアルタイム PCR	アプライドバイオシステムズ・QuantStudio 7 Flex, 384 well 用	1	11,394,000	11,394,000	理化学研究所
29	オールインワン蛍光顕微鏡一式	キーエンス・BZX-710	1	5,823,781	5,823,781	長浜バイオ大学
	共焦点顕微鏡高感度デテクター	オリンパス・FV12-HSD-MHYR	1	4,999,320	4,999,320	京都大学
	4D-Nucleofector	ロンザ・AAF-1002B/ X	1	2,116,800	2,116,800	慶応大学

(2) 計画研究における支出のうち、旅費、人件費・謝金、その他の主要なものについて、年度ごと、費目別に、金額の大きい順に使途、金額、研究上必要な理由等を具体的に記述してください。

【平成25年度】

・旅費

総括班（篠原）領域会議（大阪大学）52,860円

・人件費・謝金

総括班 領域事務担当者人件費（篠原・伊川各1名）・謝金 3,283,361円

総括班 研究会補助・謝金 51,040円

計画研究（齋藤）研究員人件費2名 4,716,990円

計画研究（小倉）研究員人件費1名 2,124,738円

・その他

総括班（伊川）領域事務用パソコンなど 426,930円、領域ホームページ管理 ノートパソコン 1,500,000円

計画研究（佐々木） Takeru cluster system 拡張（次世代シークエンサー・領域内支援機器）4,935,000円

【平成26年度】

・旅費

総括班（篠原）領域会議（九州大学）202,490円

総括班（篠原）領域代表サイトビジット 93,900円

計画研究（相賀）国際学会参加1名 449,384円

・人件費・謝金

総括班 領域事務担当者人件費（篠原・伊川各1名）・謝金 4,192,407円

総括班（篠原）講師謝金 101,820円

計画研究（相賀）研究員人件費2名 8,718,800円、技術補助員人件費4名 6,078,293円

計画研究（小倉）研究員人件費2名 7,272,230円

計画研究（篠原）研究員人件費1名 4,836,568円

計画研究（佐々木）技術補助員人件費1名 2,393,548円

計画研究（齋藤）研究員人件費2名 2,326,321円

・その他

総括班（伊川）若手勉強会会場費（つくばグランドホテル）834,750円

総括班（伊川）領域ホームページ管理など 520,258円

総括班（篠原）領域会議会場費 47,112円

計画研究（伊川）遺伝子導入システム（ネッパジーン・NEPA21・領域内支援機器）2,000,000円

【平成27年度】

・旅費

総括班（篠原）領域会議（京都大学 国際シンポジウム開催、海外演者13名含む）5,538,797円

総括班（篠原）領域代表サイトビジット 106,830円

・人件費・謝金

総括班 領域事務担当者人件費（篠原・伊川各1名）・謝金 4,361,308円

計画研究（相賀）研究員人件費2名 5,239,987円、技術補助員人件費3名 5,042,557円

計画研究（小倉）研究員人件費2名 8,580,255円

計画研究（篠原）研究員人件費1名 4,594,446円

計画研究（佐々木）技術補助員人件費2名 4,179,664円

計画研究（齋藤）技術補助員人件費2名 3,928,279円

計画研究（中村）研究員人件費1名 2,878,445円

・その他

総括班（伊川）領域ホームページ管理など 2,067,456円

総括班（篠原）国際シンポジウム会場費 1,208,520円

総括班（伊川）若手勉強会会場費（ラフォーレ修善寺）764,640円

総括班（篠原）篠原 国際シンポジウム会議費 240,853円

総括班（篠原）国際シンポジウム消耗品 530,996円

計画研究（篠原）メタボローム受託解析 1,225,800円

【平成28年度】

・旅費

総括班（篠原）領域会議（国立遺伝学研究所）200,140円

総括班（篠原）領域代表サイトビジット 95,500 円

・人件費・謝金

総括班 領域事務担当者人件費（篠原・伊川各1名）・謝金 3,382,959 円  
計画研究（相賀）研究員人件費1名 1,560,680 円、技術補助員人件費3名 6,014,431 円  
計画研究（佐々木）技術補助員人件費3名 6,961,196 円  
計画研究（齋藤）技術補助員人件費2名 5,364,513 円  
計画研究（小倉）研究員人件費1名 3,459,016 円、技術補助員人件費2名 1,646,904 円  
計画研究（篠原）研究員人件費1名 4,613,591 円  
計画研究（中村）研究員人件費1名 4,114,669 円  
計画研究（中馬）技術補助員人件費1名 1,251,554 円

・その他

総括班（伊川）若手勉強会会場費（別府亀の井ホテル）888,408 円  
総括班（伊川）領域ホームページ管理など 313,818 円  
総括班（篠原）領域会議会場費 112,820 円  
計画研究（篠原）DNA ライブラリー購入 13,608,000 円

【平成29年度】

・旅費

総括班（篠原）領域会議（理化学研究所）339,010 円  
計画研究（中村）国際学会参加2名 1,099,462 円

・人件費・謝金

総括班 領域事務担当者人件費（篠原・伊川各1名）・謝金 2,882,241 円  
計画研究（小倉）研究員人件費2名 8,282,048 円  
計画研究（佐々木）技術補助員人件費3名 6,824,545 円  
計画研究（篠原）研究員人件費1名 2,834,907 円  
計画研究（中村）研究員人件費1名 1,327,590 円  
計画研究（中馬）技術補助員人件費1名 669,836 円  
計画研究（齋藤）研究員人件1名 340,623 円

・その他

総括班（伊川）領域ホームページ管理など 999,096 円  
総括班（伊川）若手勉強会会場費（南紀 白浜温泉 旅館むさし）780,840 円  
総括班（篠原）領域会議会場費 290,398 円

（3）最終年度（平成29年度）の研究費の繰越しを行った計画研究がある場合は、その内容を記述してください。

該当なし。

## 9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1ページ以内）

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。

生殖系列細胞の研究はこれまでにクローン動物の作成や不妊治療への応用などのノーベル賞の受賞対象となる大きなインパクトがある研究成果を生み出してきた。本領域では世界トップレベルの生殖細胞研究者と分子生物学者を融合し、生殖エピゲノムの新たな領域を開拓することを目指した。領域の学問分野への貢献を終了直後に正確に評価することは難しいが、引用回数および技術的革新性に注目し以下に代表的な成果を列挙する。

篠原（計画）と小倉（計画）の共同研究による活性酸素が精子幹細胞の自己複製を促進するという発見は従来の男性不妊治療では活性酸素を抑制するとされていたことからとりわけ注目された（**Cell Stem Cell**, 引用回数95回/5年）。この成果から場合によっては不妊症の治療法を見直す必要が生じる可能性がある。精子幹細胞の自己複製因子と考えられていたGDNFに依存しない新規精子幹細胞の同定も、新たな分野を切り開くものとして注目されている(**Stem Cell Reports**, 45回/3年)。さらに伊川（計画）は一般的に免疫抑制剤として使われているサイクロスポリンやFK506を服用した男性の受精能が低下することに着目し、精子の成熟に精子特異的カルシニューリンが関与していることを見出した(**Science**, 36回/3年)。この成果は長らく不明であった薬剤の副作用の機序を解明した点で大きな貢献であり、今後精子特異的カルシニューリンに特異的な阻害剤は男性避妊薬の候補となる可能性がある。齋藤（計画）によるDmGTSF1によるpiRNA制御もDmGTSF1がpiRNAをのせたPiwiの核内パートナー分子であることを強く示唆するものであり、競争が激しい分野で新たな制御因子を明らかにした重要な成果であった（**Genes Dev**, 58回/5年）。生殖サイクルの細胞のエピゲノム変化の多くはDNAメチル化で説明されてきたが、小倉（計画）の核移植技術を駆使した解析により、ヒストンメチル化が大きな役割を果たしていることを明らかにした点も見逃せない（**Cell Rep**, 29回/3年）。

次世代シーケンサー技術に秀でた佐々木（計画）の成果では卵子発生過程におけるNon-CpGメチル化部位のゲノムワイド解析は特に注目されている(144回/5年)。次世代シーケンサーの領域内支援により、多くの重要な成果が挙げられた。特に、立花（公募）による性決定遺伝子であるSryのエピジェネティクス制御機構の解明は小倉（計画）および阿部（公募）による領域内共同研究による重要な成果である(**Science**, 115回/5年)。また岡江（公募）によるヒトTS細胞の樹立は非常に大きな成果であり、これまで長く課題となっていたヒトの胎盤発生の研究に大きく貢献するものとして将来不妊症や流産の原因解明やその治療に役立つものと期待される(**Cell Stem Cell**, 5回/0年)。栗本（公募）との共同研究によるES細胞から試験管内で分化誘導された始原生殖細胞のエピジェネティクス動態の解析と生体内で見られる発生過程との比較も、試験管内で得られた生殖細胞の品質を包括的に評価する上では初めての成果であった（**Dev Cell**, 22回/2年）。

当初の目標の一つとして掲げたエピゲノムの操作については、篠原（計画）と小倉（計画）の共同研究によるDNAの脱メチル化による精子幹細胞からの多能性幹細胞の誘導が最もインパクトがある成果として挙げられる（**Genes Dev**, 引用数36回/5年）。

技術面での成果もいくつか大きなインパクトを持つものがあった。まず受精卵を用いたものでは、伊川（計画）によるCrispr-Cas9を一つのcircular型プラスミドに発現させる方法による遺伝子編集個体の作成は領域内共同研究の推進に大いに役立った（**Sci Rep**, 166回/5年）。これは従来別々のベクターでCas9 mRNAとguide RNAを発現させていたのに比べてより簡便であり、迅速に遺伝子編集個体を作成できる点で優れていた。またこの技術は領域内共同研究として小倉（計画）による遺伝子編集ウサギの作成にも応用された（**Exp Anim**, 45回/3年）。精子形成細胞を用いたものでは、篠原（計画）によるアデノ随伴ウイルスによる精子形成細胞への遺伝子導入は精細管外からでも基底膜や血液精巣関門を通過して生殖細胞へ遺伝子が導入できる点で画期的な手法であった。この方法は精子形成の指示細胞であるセルトリ細胞へも適用できるために、ヒト不妊治療への応用が期待されている（**Stem Cell Reports**, 0回/0年）。GS細胞への染色体導入マウスの作成はES細胞よりも安定に染色体を導入できる点、キメラを介せずとも染色体導入マウスが作成できる点がES細胞を用いた従来法よりも優れている（**Stem Cell Reports**, 2回/1年）。分子生物学的な面では幸田（計画・分担）によるEnIGMA法が特筆に値する（**Nuc Acids Res**, 4回/2年）。近年のエピゲノム解析ではヒドロキシメチル化が通常のメチル化と区別することが困難になってきているが、EnIGMA法を用いれば部位特異的に両者を区別できることが可能となるという点で注目されている。

## 10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ以内）

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。

※研究代表者・研究分担者・連携研究者・研究協力者として参画した若手研究者を指します。

本領域はシニアメンバーから若手メンバーまで年齢分布が幅広く、シニアメンバーからの若手育成が行いやすい環境を作ってきた。特に、9名の計画研究代表者のうち傑出した研究業績を有する30代(3名)、40代前半(3名)の若手研究者を計画研究の研究代表者に配置した。また例年2泊3日で行われる若手勉強会においては、優秀な発表を行った若手研究者を参加者全員で投票によりベストプレゼンター賞を決定し、次の勉強会の運営と企画を行った。ここから国際活動支援班の補助により10名の若手研究者の海外派遣を行った。

特に公募研究においては独立前後の若手研究者を積極的に採択し、その結果、若手研究者からも例えば岡江（公募）によるヒトTS細胞の樹立（Cell Stem Cell）や北島（公募）による卵子サイズと染色体異常の関係（Dev Cell）を始めとして重要な成果が発表された。

上記の様な取り組みが奏功したのか、本領域研究からは多くの若手研究者が巣立っている。計画研究では4名、公募研究では1名が教授に昇進した（連携研究者を合わせると6名）。特に若手計画研究代表者4名のうち、3名が教授に就任した点は予想を超えた成果であった。これに加えて1名の公募研究参画者が独立准教授として研究室を主宰した。全体では、計画研究代表の齋藤都暁(国立遺伝学研究所系統生物研究センター教授)を含め、25名の若手研究者が昇任しており、研究協力者として参加した若手研究者のうち7名が助教に就任している。加えて10名が海外(アメリカ4名、イギリス4名、オランダ1名など)でポスドク研究員として研究に従事し、多くの若手が研究者として巣立っている。領域内での若手研究者の異動人事も10件報告されている。

さらに、計画研究の齋藤都暁、中村肇伸、北島智也が文部科学大臣表彰若手科学者賞、計画研究協力者の宮田治彦がCALAS International Award for Young Scientists, 前之原章司がCold Spring Harbor AsiaでのBest poster awardを受賞したのをはじめ、多くの若手が学会賞(14件)、ポスター賞(10件)を受賞するなどの活躍をした。

## 11. 総括班評価者による評価（2ページ以内）

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。

仲野 徹（大阪大学大学院・生命機能研究科・教授）

生殖細胞のエピゲノムダイナミクス解析とその制御を目的とした本新学術領域は、ほぼ当初の計画通りの進捗があったのみでなく、予期されていなかった進展もみせ、以下のように、十分な研究成果をあげたと判断する。

領域代表の篠原による、精子幹細胞のエピゲノム解析とその操作、計画班員である小倉による初期胚でのエピゲノム解析、同じく計画班員である佐々木によるインフォマティクス解析を駆使した始原生殖細胞の解析、齋藤による小分子 RNA によるエピゲノム制御機構の解析などを優れた業績としてあげることができる。また、公募班員からも、北島による染色体分配エラーの解析や、岡江によるヒト TS 細胞株の樹立など、十分な業績をあげること成功した。

領域内における共同研究は非常に活発で、計画班員平均で 25%、公募班では 38%もの論文が連携研究による共著論文であったことは特筆すべき事項である。これは、技術支援グループによる支援のみだけでなく、領域内の連携が非常に活性化され、十分に機能したためであると考えられる。

問題点としては、シニアの計画研究班員に比較し、若手の業績がやや見劣りする傾向をあげることができる。ただ、そのうち 5 名が研究期間中に教授就任しており、今後の奮起に期待したい。

石野 史敏（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・所長）

本新学術領域は 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・制御技術の 3つの班で研究活動が行われたが、計画班のメンバーはそれぞれ順調に業績を発展させたと評価できる。特に、篠原の「GS 細胞から Dnmt1 の発現抑制による multipotent GS 細胞を樹立成功」や、「精子幹細胞の自己複製分裂の正と負の制御因子の同定」、相賀の生殖細胞の性決定に関する「雌化因子 Stra8 と Smad4 の同定」、「精子幹細胞の維持における Nanos2 を介した mRNP 機能の必須機能の証明」、小倉の「受精時の父方ゲノムの再プログラム化にヒストン H3 アルギニン残基メチル化が必須であることの証明」、幸田の「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) の確立」、佐々木の「始原生殖細胞におけるインプリント制御領域の脱メチル化機序の解析」、伊川の「精巣特異的 Calcineurin による精子形成の制御」などのいくつもの高い業績を上げたことが評価される。公募班にも良いメンバーを揃えているが、特に立花の「性決定遺伝子である Sry が Jmjd1a に発現制御されていることの発見」、奥田の「Max の発現抑制で GS 細胞に減数分裂初期反応の誘導」、岡江の「ヒト TS 細胞の樹立成功」、原田の「精巣特異的なヒストンバリエーションである H3t 遺伝子が精子形成に必須な機能を持つことの証明」などは独自性が高い業績と評価できる。また領域全体で、領域内での共同研究による論文数の割合が計画班員平均で 25% (22/87 報)、公募班で 38% (20/53 報)となり十分な研究連携が行われたことも評価できる。

中辻 憲夫（京都大学 iCeMS 設立拠点長）

当領域は、哺乳類の生殖という基本的な生命現象の中で、生殖系列におけるエピゲノム制御を多様な研究方法を駆使して先端的研究を行う研究者を結集して、各々の研究者の研究を推進すると同時に、学際的な共同研究を育てる役割を果たした。更に若手研究者を公募班に採択する事によって、次世代の研究者育成についても大きな成果を挙げた。領域代表者と総括班による適切で強い指導力が発揮され、参加研究者の全員が大きな研究成果を挙げた事は、発表論文の多さとレベルの高さから明瞭である。それに加えて、領域に参加した研究者

には、領域研究に参加してキャリアアップに成功した班員も多く、当領域が研究者コミュニティに果たした役割は大きい。これまでも、生殖系列領域は日本の研究者達が世界をリードする研究を発展させて来た分野であり、欧米の当分野を代表する研究者からの評価も高い。日本の生命科学領域における顕著な成功例として評価される事は確実である。

#### 齋藤 通紀 (京都大学・医学研究科・教授)

本研究領域では、生殖細胞の発生機構とそれに関与するエピゲノム動態、それらを制御する方法論の開発を中心とする研究が行われた。計画研究班がその中心となる研究を遂行し、公募研究班がそれを適切に補完・さらには発展させる研究を遂行した。シニア・中堅・若手研究者をバランス良く配備し、領域内における共同研究も活発で、研究期間中に、140本の論文を発表し、そのうち48本が領域内共同研究という堂々たる成果を残した。計画研究班からは、精子幹細胞の増殖における活性酸素の役割の解明、精子幹細胞の維持に関わる Nanos2 の機能解明、精子カルシニューリンの役割の解明とその阻害剤の避妊薬としての可能性の提唱、多能性幹細胞から誘導した始原生殖細胞における DNA 脱メチル化機構の解明、生殖サイクルのエピゲノム変化におけるヒストンメチル化の役割の解明、ショウジョウバエを用いた piRNA の機能制御機構の解明を含む成果が、公募研究班からは、H3K9 脱メチル化酵素 Jmj1a による性決定遺伝子 Sry の発現制御機構の解明、卵母細胞の巨大な細胞質サイズと染色体分配エラーの関係に関する研究、ヒト TS 細胞の樹立、を含む画期的な成果が発表された。総括班評価者は主に年に一度の領域会議において領域の研究の進捗を評価、議論した。中間評価であげられた種々の指摘にも適切に対処したと評価出来、その結果、生殖細胞研究における数理解析の導入や上記のヒト TS 細胞の樹立といった顕著な業績、領域に属する若手5名が教授に昇進するという優れた成果をあげ、本領域の継続的な発展の礎を築いたと評価出来る。一方で、一部の班員は当初の期待通りには成果が得られなかったと言えるかもしれない。また、本研究領域を代表する研究者が集結した研究班である点を考慮すると、生殖細胞研究やエピゲノム制御に関する次の大きな方向性を明確に提示する研究は必ずしも多くはなく、その点においては今後のさらなる発展を期待したい。

#### 長澤 丘司 (大阪大学・生命機能研究科・教授)

本領域の計画研究代表者の多くが、領域発足前の優れた研究を着実に進め、重要な成果を権威ある国際的学術誌で論文発表した。例えば、篠原は、培養精子幹細胞(GS細胞)を用いて、DNAメチル化酵素 Dnmt1 が精子形成に必須の転写因子 Dmrt1 の発現を促進することで、多能性胚性幹細胞株の未分化性維持に必須の Sox2 の蛋白質翻訳を抑制していることを明らかにした。更に、GS細胞の自己複製において、Myc、活性酸素が促進的に働くことを示した。また、相賀は、精子幹細胞の維持に必須の RNA 結合蛋白質 Nanos2 が、精子幹細胞の分化を進める遺伝子の mRNA を減少させることを示し、その作用の分子機構を明らかにした。齋藤は、Piwi が、トランスポゾン抑制因子 DmGTSF1 と結合してトランスポゾン活性を抑制することを見出した。公募研究でも研究が進み、例えば、立花は、セルトリ細胞の形成に必須の転写因子 Sry (Y染色体上の雄性決定因子) の発現には、セルトリ細胞特異的に発現するメチル化ヒストン(H3K9)脱メチル化酵素 Jmjd1 が必須であることを明らかにした。この成果は特筆に値し、細胞系列決定におけるエピゲノム制御など、他の分野への波及効果が期待できる。総じて本研究領域は、優れた総括と運営のもと、研究が順調に進行し、多様で優れた研究成果が出たと考えられる。