

領域略称名：配偶子産生制御
領域番号：3504

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

「動物における配偶子産生システムの制御」

(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 (筑波大学・生命領域学際研究センター・教授・小林 悟)

目 次

1. 研究領域の目的及び概要	6
2. 研究領域の設定目的の達成度	8
3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	11
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	12
5. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	14
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）	17
7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況	22
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）	24
9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	28
10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	29
11. 総括班評価者による評価	30

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	25114001 動物における配偶子産生システムの制御	平成 25 年度～ 平成 29 年度	小林 悟	筑波大学・生命領域学際研究センター・教授	6
Y00 支	15K21736 世界最先端の解析システムの構築による配偶子産生研究の国際展開	平成 27 年度～ 平成 29 年度	小林 悟	筑波大学・生命領域学際研究センター・教授	5
A01 計	25114002 ショウジョウバエ PGC の形成を制御する遺伝子ネットワークの解明	平成 25 年度～ 平成 29 年度	小林 悟	筑波大学・生命領域学際研究センター・教授	5
A01 計	25114003 マウス PGC の形成を制御する分子ネットワークの解明	平成 25 年度～ 平成 29 年度	松居靖久	東北大学・加齢医学研究所・教授	7
A01 計	25114004 マウス配偶子産生における GSC の制御機構の解明	平成 25 年度～ 平成 29 年度	吉田松生	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授	5
A01 計	25114005 サケ科魚類の進化に伴う GSC 制御機構の変化	平成 25 年度～ 平成 29 年度	吉崎悟朗	東京海洋大学・学術研究院・教授	1
A02 計	25114006 in vitro における PGC 産生および分化のための新規培養系開発	平成 25 年度～ 平成 29 年度	林 克彦	九州大学・医学研究院・教授	1
A02 計	25114007 in vitro において継続的に精子を産生する新規培養系の開発	平成 25 年度～ 平成 29 年度	小川毅彦	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授	3
A02 計	25114008 in vitro において卵を産生する新規技術の開発	平成 25 年度～ 平成 29 年度	尾畑やよい	東京農業大学・生命科学部・教授	2
統括・支援・計画研究 計 9 件					

A01 公	26114501 FGF-Wnt シグナル経路を介したプラナリア有性化による配偶子産生制御機構の解明	平成 26 年度～ 平成 27 年度	小林一也□	弘前大学・農学生命科学部・准教授	4
A01 公	26114502 生殖細胞の増殖制御に関与する Wnt-Piwi シグナル系の解明	平成 26 年度～ 平成 27 年度	山元大輔	東北大学・大学院生命科学研究科・教授	2
A01 公	26114504 哺乳類の進化的に保存された精原幹細胞ニッチの分子基盤の解明	平成 26 年度～ 平成 27 年度	金井克晃	東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授	1
A01 公	26114505 哺乳類生殖細胞における RNP 顆粒形成機構と機能	平成 26 年度～ 平成 27 年度	鈴木 敦	横浜国立大学・工学研究院・准教授	1
A01 公	26114506 体外精子形成を目指した生殖細胞間架橋関連因子の同定および細胞連結増殖への影響解析	平成 26 年度～ 平成 27 年度	岩森督子	九州大学・医学研究院・助教	1
A01 公	26114508 ショウジョウバエ生殖細胞の形成・分化を制御する新規因子の探索と分子機能解析	平成 26 年度～ 平成 27 年度	中村 輝	熊本大学・発生医学研究所・教授	2
A01 公	26114512 RNA 制御による原始卵胞維持機構の解明	平成 26 年度～ 平成 27 年度	加藤 譲	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教	1
A01 公	26114513 カタユレイボヤ PGC 形成に関わる遺伝子発現制御機構の解析	平成 26 年度～ 平成 27 年度	倉林麻貴 (白江麻貴)	名古屋大学・理学研究科・特任助教	5
A01 公	26114509 ミツバチの生殖機能制御機構の解析	平成 26 年度～ 平成 27 年度	鎌倉昌樹	富山県立大学・工学部・生物工学科・講師	2
A02 公	26114510 ヒト卵子再生と卵胞完全体外培養による新たな不妊治療法の開発	平成 26 年度～ 平成 27 年度	河村和弘	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授	3

A01 公	16H01249 プラナリア有性化因子 で解除される Wnt シグ ナルを介した生殖器官 分化抑制機構の解明	平成 28 年度～ 平成 29 年度	小林一也	弘前大学・農学生命科学部・准教授	3
A01 公	16H01250 転写制御による尾索動 物胚始原生殖細胞産生 システムの制御	平成 28 年度～ 平成 29 年度	熊野 岳	東北大学・生命科学研究科・教授	2
A01 公	16H01251 哺乳類の進化的に保存 された精原幹細胞ニッ チの分子基盤の解明	平成 28 年度～ 平成 29 年度	金井克晃	東京大学・大学院農学生命科学研究 科・准教授	1
A01 公	16H01252 始原生殖細胞における 潜在的分化多能性の制 御機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	鈴木 敦	横浜国立大学・工学研究院・ 准教授	1
A01 公	16H01253 トランスジェニック技 術を用いたニワトリ始 原生殖細胞形成機構の 解析	平成 28 年度～ 平成 29 年度	西島謙一	名古屋大学・工学研究科・准教授	1
A01 公	16H01254 精巣の新生をも可能に するイモリ PGC の運命 決定とその維持機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	林 利憲	鳥取大学・医学部・准教授	3
A01 公	16H01255 精子形成を可能とする 精巣間質組織の再構築 機構とその破綻	平成 28 年度～ 平成 29 年度	嶋 雄一	川崎医科大学・解剖学教室・准教授	1
A01 公	16H01257 体細胞型から減数分裂 型の細胞周期調節への 切替え機構	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	16H01258 生殖細胞形成機構の動 物種を超えた共通原理 と種特異性	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	116H01259 RNA 結合タンパク質間の拮抗作用が介する原始卵胞の維持と活性化の制御機構	平成 28 年度～ 平成 29 年度	加藤 譲	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教	1
A01 公	16H01260 カイコ <i>Sex-lethal</i> による二型精子産生システムの制御機構の解明	平成 28 年度～ 平成 29 年度	新美輝幸	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授	1
公募研究 計 21 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。

【研究の背景と目的】

配偶子（精子と卵）を産生して次世代へ生命を伝えることは、生物の最も根源的な機能である。動物が安定して子孫を残すためには、配偶子の元となる始原生殖細胞(PGC)を作り出すこと、PGCに由来する配偶子幹細胞(GSC)の働きにより配偶子を継続して産生することが不可欠である。この配偶子産生システムを理解することは生物学にとって長年の中心課題であるが、未だその全容解明には及ばない。本研究では、本申請領域に参加する研究者によって得られた新たな研究成果に基づき、動物の配偶子産生システム制御機構を解明することを目的とする。このとき、動物種を越えてPGCやGSC中で機能する細胞自律的な共通メカニズムに注目すること、in vivoの解析とともにin vitroで配偶子産生過程を再現することを連携して行い、より深い理解を目指す。

研究項目 A01: 配偶子産生システムの制御機構を知る

PGCの形成機構を知る PGCは動物種に共通して多能性細胞から作り出される。しかし、その形成様式は動物種間で異なり、「前成的」と「後成的」に大別される。前者の様式をとるショウジョウバエでは卵に含まれる特殊な細胞質（生殖質）を取り込むことによってPGCを形成するのに対し、後者の形成様式をとるマウスでは周囲の体細胞からのシグナルによりPGCが誘導される。そのためPGC形成機構の研究は、動物種ごとにそれぞれの形成メカニズムを解明することを目指し発展してきた。

ショウジョウバエでは、生殖質中のミトコンドリアRNAがPGC形成に必須であるという小林の発見を端緒とし、生殖質中の分子によるPGC形成機構の解明が始まった。一方、マウスでは、PGCを誘導するシグナル分子と下流メカニズムの解明が進んできた。現在に至るまで、ショウジョウバエとマウスに共通するPGC形成機構は明らかになっていないが、その存在は、小林が蓄積してきた研究成果によって強く示唆される。まず、ショウジョウバエPGC分化に関わる分子として同定したNanosが、マウスPGCの発生にも必須であることが明らかとなった。Nanosは、PGCが体細胞に分化するのを阻害する翻訳抑制因子であったため、小林は、PGC形成機構を「PGC特異的遺伝子の発現活性化」ととらえ、これを直接制御する分子の探索を行ってきた。その結果、PGC自律的に機能する転写因子Ovoを同定した（論文作成中）。Ovoは生殖質に含まれ、PGCの発生に必須であるとともに、マウスでもPGC自律的に同様の機能を果たす。これにより、動物に共通する細胞自律的な配偶子産生遺伝子ネットワークが存在するという新しい概念が現実のものとなり、その実体を解明する機が熟した。そこで、小林は、① PGCの発生に関わるOvoや他の転写制御因子により活性化される下流遺伝子ネットワークを解明する。

一方、マウスにおいて松居は、胚細胞由来のES細胞株や自身が樹立したEG細胞株などの多能性細胞からPGCが形成される機構を精力的に解析してきた。最近、松居は、多能性細胞からのPGC形成を負に制御するMax遺伝子（ヒストンメチル化修飾制御因子）を見出した。これは、多能性細胞からPGC形成を細胞自律的に制御する遺伝子として初めての例である。逆にPGCから多能性細胞への転換を正に制御するAkt（シグナル伝達因子）や負に制御するDnd1（RNA代謝制御因子）も見出した。そこで、松居は、② PGCと多能性幹細胞との違いを生み出している遺伝子ネットワークをMaxやAktなどの機能を中心に解明する。

GSCの自己複製と配偶子産生の制御機構を知る 次世代を確実に残すためには、配偶子へ分化するとともに自己複製するGSCの働きにより、十分な数の配偶子を長期間産生することが不可欠である。ショウジョウバエの研究から、GSCは微小環境（ニッチ）の支配下で非対称分裂を繰り返し、自己複製する娘細胞と分化する娘細胞を生むと信じられてきた。吉田は、マウスGSCが特定のニッチ領域に留まらずに動き回ることで、さらに自己複製と分化が確率的に起こることを発見し、GSC自律的な機構の存在を示唆した。ショウジョウバエにおいてもごく最近、同様の機構の存在が示唆された。そこで、③ GSCの自己複製と分化を制御する細胞自律的な遺伝子ネットワークを明らかにする。さらに、吉田は、マウス精巣のニッチ細胞を同定し、そこからのシグナル因子Fgf5を発見した。Fgf5が欠損するとGSCの数が減少する。このことから、ニッチの役割はGSC自律的な機構に作用して、GSCの数を適正に保つことと考えられる。そこで、④上記の遺伝子ネットワークに対するニッチシグナル（FGF5等）の制御を明らかにする。

GSC の自己複製と分化を制御すれば、配偶子産生の量と期間を調節できる。この柔軟性は動物の配偶子生産にとって重要な特性である。サケ科魚類には、生涯に一回のみ配偶子を産生し死を迎える種（サケ型：ヤマメなど）と複数年にわたり配偶子産生を繰り返す種（マス型：ニジマスなど）がある。吉崎は、サケ科魚類で GSC を移植する実験系を独自に確立し、魚類で初めて GSC の存在を機能的に証明した。興味深いことに、マス型魚種では GSC は配偶子へと分化すると同時に翌年の繁殖期に向けて GSC を維持する一方、サケ型魚種では GSC は自己複製することなく分化することを発見した。さらに、ニジマス（マス型）の GSC をヤマメ（サケ型）宿主へ異種間移植したところ、本来は配偶子産生の後に死亡する宿主個体が生残し、翌年も配偶子産生を継続した。これは、サケ型の環境下であってもマス型 GSC が自律的に自己複製と分化のバランスをとることを意味している。そこで、吉田のマウス GSC 維持に関わる遺伝子やシグナル分子の情報を参考に、⑤ この細胞自律的な GSC 制御に関わる遺伝子群を明らかにし、その機構の種間の違いを解明する。

研究項目 A02 「in vitro で配偶子産生を再現する」

PGC の形成を再現する 林は、in vitro においてマウスの雄あるいは雌由来の多能性細胞から PGC 様細胞を作出することに成功した。この培養技術により、これまで胚あたり数十個しか存在しない発生初期の PGC を数十万個オーダーで容易に取得できるようになった。この革新的な技術を活かし、⑥ 小林らが明らかにする遺伝子の機能を生化学的あるいはゲノムワイドに解析する。一方で、PGC 様細胞は、移植された生体の精巣あるいは卵巣内で精子や卵に分化するが、体内の環境以外では PGC 様細胞を GSC（雄）や卵母細胞（雌）に分化させることは実現していない。そこで、⑦ 性差を生み出す生殖巣との共培養や、性差を有する PGC の形成を再現できる培養系の構築を目指す。

配偶子の産生を再現する 小川は、GSC のみを含むマウス幼若精巣の組織片を培養し、精子に分化させることに世界に先駆け成功した。しかし、この培養系では、GSC を維持できず長期にわたり精子産生を継続できない。そこで、小川は、精子産生を継続する液性因子の探索や、吉田の GSC 維持に関わる遺伝子やシグナル分子の情報を基に、⑧ GSC からの精子産生を長期間維持できる培養系を構築する。一方、尾畑は、未熟卵母細胞を含む胎仔卵巣を in vitro 培養することにより、低効率ながら成熟核を有する卵母細胞を得ることに成功した。この核を除核した成熟卵へ移植することで移植核由来の子を得ることができ。しかし、核移植や生体移植を介さずに in vitro で胎仔由来の卵母細胞から卵を得ることは誰も成し得ていない。そこで、尾畑は、卵母細胞の成熟に関わる遺伝子の探索や、林の成果を基盤に、⑨ 卵母細胞の成熟を効率よく進める培養系の開発を行う。

研究の展開 多能性細胞から精子や卵の産生までの全過程を in vitro で再現することは、生殖細胞を扱う多くの研究者の積年の課題であった。林が多能性細胞から GSC や卵母細胞を、小川が GSC から精子を、尾畑が卵母細胞から卵を作ることにより、**多能性細胞から精子や卵に至る全てのプロセスを in vitro で行う培養系の開発を目指す。**この in vitro 培養系は、A01 における配偶子産生制御機構の新たな研究の展開を押し進めるための革新的な技術基盤となるとともに、ヒトや有用動物を含む多くの脊椎動物において多能性細胞から配偶子を産生できる新規培養系に発展し、畜産、水産や生殖医療等の応用面で革新的な技術となる。

【当該領域の発展と学術水準の向上を牽引する】

本申請領域では、基礎と応用分野の研究者が分野横断的に連携し、配偶子産生システムの制御機構の解明および配偶子を産生する新規培養系の開発を共に実現する。このような研究集団は世界的にも希有であり、世界的な「生殖」研究のピークを作る役割を本申請領域が担う。本申請領域で展開する新たな研究の基盤となる重要なブレイクスルーが得られたこの機を逃さずに、先導的な研究を推進することは、当該分野におけるわが国の国際的な優位性を維持する上で必須かつ喫緊の課題である。

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。

本研究領域では、「研究領域の目的及び概要」に記した研究がほぼ達成されているが、当初予想した以上のスピードで成果が得られた研究課題がある。この特筆すべき研究成果の一つは、研究項目A02の計画研究7においてPGCから成熟卵を産生するための新規*in vitro*系を構築し、世界で初めてマウスを誕生させることに成功したことである（PNAS 2016; Nature Protocol 2017）（Cozzarelli Prize: Outstanding paper award in 2016を受賞）。この技術を基盤とし、計画研究7と計画研究5が連携して*in vitro*においてマウスの多能性幹細胞(ES細胞)からPGCを経て、卵子を産生し、それに由来する受精卵からES細胞を樹立することに成功した。これは、世界に先駆け雌の生殖系列サイクルをすべて*in vitro*で再構築出来たことを意味する（Nature 2016）（Science誌が選ぶ2016年10大ニュースに選定）。

第2に、研究項目A01とA02との密な連携により、生殖細胞の形成に必須なovo遺伝子の働きが、ショウジョウバエ（計画研究1）だけでなくマウス（計画研究5）においても明らかになったことである（Sci Rep 2017）（連携研究に関しては論文作成中）。これは、*in vitro*で配偶子産生を再現する系をA01の解析系として使うという本研究領域における新視点を実現したものであるとともに、動物種間で共通する生殖細胞形成機構の解明に向けた重要な一歩となった。

第3に、異分野間（生物学と物理学）の国際共同研究によって、マウスGSCの精巣内におけるダイナミクスを支配する原理が導かれたこと（計画研究3）は特筆に値する（Cell Stem Cell 2014; 投稿中）。さらに、GSC維持と分化のバランスを保つシグナル分子の存在やエピジェネティック制御も明らかにすることができた（Development 2013, 2015; Stem Cell Reports 2017）。

以下に、前項「研究領域の目的及び概要」中で番号を付した2重下線で示した主要研究に関して、得られた研究成果を記す。

【研究項目 A01: 配偶子産生システムの制御機構を知る】

《PGCの形成機構を知る》

① PGCの発生に関わるOvoやその他の転写制御因子により活性化される下流遺伝子ネットワークをショウジョウバエにおいて解明する。

成果①-1(小林 G) 生殖質に含まれる母性因子のうちOvoとNanosがPGCの発生に中心的な役割を果たすと判断し、以下の解析を行った。この2つの母性因子をコードする遺伝子は進化的に保存されている。Ovoの機能阻害を行ったPGCをセルソーターで単離し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を正常のPGCと比較する解析を行った。その結果、正常発生過程においてPGCで高発現する遺伝子の7割程度がOvoにより活性化されること、逆にPGCにおいて発現が低下している遺伝子（体細胞性遺伝子）のうち同じく7割程度がOvoにより発現抑制されていることが明らかとなった。このことは、OvoがPGCの運命決定における遺伝子発現制御に中心的な役割を果たすことを強く示唆している（Sci Rep 2017）。さらに、Ovo下流遺伝子の一部が生殖細胞の発生に関わることも確認している。

成果①-2(小林 G) PGCにおいて、Nanosは、転写因子の核移行に関わるImportin- α 2の産生を翻訳レベルで抑制し、RNAポリメラーゼII活性を低下させる母性因子Pgcと共同して、体細胞性遺伝子の転写抑制を行っていることを明らかにした【公募研究（中村）との共同研究：論文投稿中】。

成果①-3(小林 G) Nanosは、これまで知られていた翻訳の機能以外に、母性RNAの安定化に関わることを初めて明らかにした（DGD 2018）。また、このターゲットの一つが、母性ovo mRNAであることを明らかにした（論文未発表）。この成果は、母性因子間のネットワークの存在を示唆している。

成果①-4 (小林 G、向)Ovoと同様に生殖質中の母性因子として知られるMamoのZnフィンガードメインをもつ断片化タンパク質 [活性化Mamo (MamoAF)] が生殖系列特異的遺伝子であるvasa遺伝子座に直接結合し、ヒストンアセチル化酵素CBPと共同してエピジェネティックにvasa遺伝子座を活性化すること、さらにMamoAFが転写活性化因子Ovoと共同してvasa遺伝子の発現を活性化することが明らかとなった（論文作成中）。

成果①-5 (小林 G) 生殖細胞での遺伝子発現制御機構を解明するモデルとして、生殖系列遺伝子である

piwi や vasa を発現するカイコ卵巣由来の培養細胞 BmN4 を用いて遺伝子制御ネットワークモデリングを行った。ショウジョウバエの母性因子 Nanos、Ovo 等、様々なシグナル伝達経路に関わる制御因子に対する RNAi を行い、トランスクリプトームデータを取得し、RepEdLEGG (PLoS Pathog 2010) を用いて、遺伝子制御ネットワークモデルを得た。vasa、piwi 遺伝子と制御関係を持つ遺伝子についてネットワークモデルを分析したところ、最終的に、vasa の発現に対して aop と pnt が正の制御を、B-H1 が負の制御を行っていることが確認され、これらが vasa の上流因子であることが明らかになった。さらに、aop と pnt が相乗的に vasa 発現に関与していることを多重遺伝子ノックダウン実験で明らかにした。また、これら遺伝子が piwi 発現にも関与していることも明らかになった (論文作成中)。これらのネットワーク情報をショウジョウバエで今後検証する予定である。

② PGC と多能性幹細胞との違いを生み出す遺伝子ネットワークを、Max や Akt などの機能を中心にマウスにおいて解明する。

成果②-1(松居 G) Max が多能性幹細胞 (ES 細胞) で PGC 特異的遺伝子の発現を抑制するエピジェネティック機構を明らかにすることを目的として研究を行った。Max が DNA メチル化酵素およびヒストン H3K9 トリメチル化酵素 SETDB1 と相互作用して、遺伝子発現抑制を行うことを明らかにした (論文投稿中)。しかし、プラナリア、ニワトリ胚、ゼブラフィッシュ胚では、Max の PGC 特異的遺伝子の発現抑制への関与は小さいと考えられる結果が得られた。

成果②-2(松居 G) PGC で、RNA 結合タンパク質 DND1 がヒストン H3K27 トリメチル化酵素遺伝子 Ezh2 の発現を維持することにより、細胞周期を促進する CCND1 の発現が抑制され、PGC から多能性幹細胞への変化が抑制されることがわかった(Biol Open 2018)。

成果②-3(松居 G) PGC では多能性幹細胞と比較して解糖系の活性が低く、また酸化的リン酸化の活性が高く、こういったエネルギー代謝の特徴が、PGC の生存、および多能性幹細胞への変化の抑制に働いていることが明らかになった。(PNAS 2017)。

《GSC の自己複製と配偶子産生の制御機構を知る》

③ GSC の自己複製と分化を制御する細胞自律的な遺伝子ネットワークを明らかにする。

成果③-1(吉田 G) 精巣内の精子幹細胞 (GFR α 1+細胞) の挙動を、生体内ライブイメージングとパルス標識によって詳細に解析し、数理解析により分析したところ、幹細胞の「不完全分裂」と「断片化」の頻度、および、「組織が許容する幹細胞の数 (=密度)」というわずか3つのパラメータによって、幹細胞ダイナミクスが支配されていることを、海外 (英国) の物理学者との異分野間の国際共同研究により明らかにした (Cell Stem Cell 2014)。これは、明瞭なニッチのない環境 (開放型ニッチ) で幹細胞を維持する新規メカニズムの存在を示している。

成果③-2(吉田 G) 幹細胞活性を持つ未分化型精原細胞は、GFR α 1+と Ngn3+の2群に分けられ、前者に比べて後者は分化へ方向づけられているが、これは可逆的である。しかし、レチノイン酸 (RA) の作用によって Kit+の分化型精原細胞になると、不可逆的に精子へと分化する。分担者の大保らは、GFR α 1+細胞と Ngn3+細胞の間ではゲノム修飾は大きな差を認めないが、Kit+細胞では大きく異なることを発見し、可逆性の喪失に伴うこの変化を epigenetic checkpoint と名付けた(Development 2013)。以上の研究により、GSC 分化の不可逆点ではエピジェネティックな制御が重要な役割を果たす、という概念を提出した。

④ 上記の遺伝子ネットワークに対するニッチシグナル(FGF5 等)の制御を明らかにする。

成果④-1(吉田 G) FGF5 の下流で、新規に同定した Wnt シグナル阻害因子 Shisa6 が発現誘導され、一部の GSC で高発現することを見出した。この因子を欠損すると Wnt シグナルを強く受容するとともに幹細胞プールサイズが縮小することから、FGF5 は、Shisa6 の発現を誘導することによって分化シグナルに対する感受性を低下させ、未分化状態に保つことと考えられた (Stem Cell Reports 2017)。また、FGF5 は、分化シグナルである RA の受容体 Rarg の発現を抑制する。Rarg 発現が抑制された細胞に Rarg を強制発現すると RA に反応して分化したことから、RARG の発現を抑制することが、未分化プールを維持するために必要であることが示された (Development 2015)。

⑤ この細胞自律的な GSC 制御に関わる遺伝子群を明らかにし、その機構の種間の違いを解明する。

成果⑤-1(吉崎 G) サケ科魚類の中で、ニジマス (マス型) は生涯に複数回の繁殖を行うのに対して、ヒメマス (サケ型) では一回の繁殖活動を終えた後に斃死する。繁殖機構の違いを支える GSC の挙動を形態的、機能的、分子生物学的に明らかにすることに挑戦した。ニジマスは排卵、排精後も生殖腺内に

未分化生殖細胞を保持しており、移植実験によりこの細胞が幹細胞能を保持していることが明らかとなった (Biol Reprod 2017)。一方、ヒメマスでは同時期に GSC の残存は全く見られなかった。異種間の生殖細胞移植実験の結果、一回繁殖のヒメマスに移植されたニジマスの GSC は、排精後も宿主の精巢内に残存することが明らかとなった。一方、多回繁殖のニジマスはヒメマスの配偶子を複数年 (最長 4 年) にわたり継続的に生産した。以上より、配偶子幹細胞の挙動は細胞自律的な制御に加え、微小環境による制御の影響も大きいことが示唆された (論文作成中)。今後、この機構を司る遺伝子を明らかにする予定である。

【研究項目 A02: *in vitro* で配偶子産生を再現する】

《PGC の形成を再現する》

⑥ 小林らが明らかにする遺伝子の機能を生化学的あるいはゲノムワイドに解析する。

成果⑥ (林 G) ショウジョバエ ovo 遺伝子のマウスホモログである Ovol 遺伝子 (Ovol1, 2a, 2b, 2c, 3) の機能解析を、ES 細胞から PGC 様細胞を産生する *in vitro* 培養系を用いて行った。まず Ovol 遺伝子群のそれぞれをノックアウトした (KO) ES 細胞を用いて、分化培養系を用いて PGCLCs へ分化誘導した。その結果、Ovol2 KO 細胞および Ovol1, 2, 3 トリプル KO (TKO) 細胞で、PGC マーカー遺伝子である Blimp1 の発現が野生型 (WT) と比較して低下していた。Ovol2 には 3 つのアイソフォーム、Ovol2a、Ovol2b、Ovol2c が存在する。それぞれのアイソフォームの PGC 形成における機能を解析するため、TKO ES 細胞に各 Ovol2 アイソフォーム遺伝子を発現させたところ、Ovol2b を発現させた場合に PGC マーカー Blimp1 の発現が上昇していた。この結果から、Ovol2b が主に PGC 形成を促進する因子であり、おそらく遺伝子発現の活性化が重要であることが明らかとなった (論文作成中)。Ovol2 の下流遺伝子に関しても探索中である。

⑦ 性差を有する PGC の形成を再現できる培養系の構築を目指す。

成果⑦ (林 G) マウスの多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) を出発点として *in vitro* における配偶子産生系を確立することを目指し、ES 細胞から分化誘導した PGC を胎仔卵巣の体細胞との長期共培養を行った。その結果、生体への移植を行うことなく、*in vitro* で卵子を作製することに成功した。これらの卵子は生体由来の精子と体外受精でき、子宮に移植することで健康な産仔をえることが出来た。さらに、これらの受精卵から得られた胚盤胞から ES 細胞を樹立することに成功しており、雌の生殖系列サイクルをすべて *in vitro* で再構築することに成功した (尾畑 G との共同研究) (Nature 2016)。

《配偶子の産生を再現する》

⑧ GSC からの精子産生を長期間維持できる培養系を構築する。

成果⑧ (小川 G) マイクロ流体システムを導入し、培養液を常時流し続けることで物質供給を効率化することを図った。デバイスの素材である PDMS (Polydimethyl-siloxane) は酸素透過性に優れており、精巣組織へは十分な酸素供給が得られる。これを利用し、既成の器官培養法では達成できなかったマウス *in vitro* 精子形成の効率の向上と持続期間の延長 (6 か月に亘る精子形成の持続) に成功した (Sci Rep 2016)。培養液の抜本的改良も行い、血清代替物を用いずに化学組成の明らか培養液でマウス精子形成を円形精子細胞まで進めることに成功した (PLoS One 2018)。凍結精巣組織から精子産生できることにも成功したことから (Nat Commun 2014)、妊孕能温存の臨床応用へも発展できると期待される。

⑨ 卵母細胞の成熟を効率よく進める培養系の開発を行う。

成果⑨-1 (尾畑 G) 林 G との共同研究により、マウス PGC から成熟卵を産生する新規 *in vitro* 培養系の開発に成功した。*in vitro* において卵胞形成が阻害される主要因が、エストロゲンシグナルの過度な活性化であることを見いだした。エストロゲン受容体の阻害剤を培地に添加し、*in vitro* における卵胞形成不全を克服した。次に、培養卵巣から単離した二次卵胞を高分子化合物であるポリビニルピロリドン添加培地で培養すると、卵胞の発育は非添加区より大幅に改善され、多くの成熟卵が産生されることを示した。これらの卵は、受精・胚移植後、マウス産仔へと発生したことから、機能的な成熟卵であることが証明された (J Reprod Dev 2016; PNAS 2016; Ann Biomed Eng 2017; Nature Protoc, 2017)。

成果⑨-2 (尾畑 G) 研究分担者の平尾は、マウス PGC から成熟卵を産生する新規 *in vitro* 培養系の培地および培養基質等をさらに改良し、卵胞単離を行わない、より簡便で汎用性の高い培養系を樹立し、胎仔卵巣 1 個あたりから 50 個以上の成熟卵の産生を可能にした (論文作成中)。この改良は、*in vitro* 培養系を家畜へ応用する研究を加速する。

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。

研究推進時に問題は生じていない。また、組織変更も行っていない。

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>

本新学術領域研究の採択時の審査所見は、以下の通りである。

本研究領域は、動物の配偶子産生システム制御機構を、動物種を超えて細胞自律的に機能する共通メカニズムに注目し、*in vitro*系で配偶子産生過程を再現することによって解明を目指す提案である。動物の配偶子産生システムの解明は、生命の根幹をなす重要な課題であるだけでなく、生殖医療、水産、畜産の応用面への貢献も期待されるもので、社会的にも波及効果が大きく、新学術領域研究としてふさわしい。研究計画について、① 魚類やハエ、マウスなどを用いた*in vivo*解析系と*in vitro*解析系の連携によって、始原生殖細胞の形成や配偶子の産生システムに焦点を絞って検証していくという計画は成果が期待できる。一方で、② ネットワーク解析については通常のカスケード解析に留まる可能性もあるので、遺伝子間の相互作用の全体像を明らかにするために、数理生物学的解析を加える必要があると思われる。また、領域の目標達成のためには、③ エピジェネティックな視点からの研究についても公募研究などで強化すべきであるとの意見もあった。研究組織については、それぞれの研究計画は明確で、役割分担や研究者間の連携などよく計画されている。一方で、④ 研究支援体制を連携研究者に依存している点や、⑤ 若手研究者育成に関する具体的な計画に乏しい点については、今後、具体的な改善策を検討すべきである。また、⑥ 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。

上記所見中で番号を付した2重下線で示したポイントに関して対応状況等を下記に記す。

所見① *in vitro*系を解析系として用いて、動物種を超えた配偶子産生の共通メカニズムを明らかにすることが本領域の特徴の一つである。本計画研究では、ショウジョウバエでPGC形成に重要な役割を担うOvo（計画研究1）のマウスにおける機能解析に、計画研究5で開発した多能性細胞からPGC様細胞を*in vitro*で分化させる系を用いており、動物の生殖細胞形成機構に共通してOvoが関与することが明らかとなった（Sci Rep 2017; 論文作成中）。

所見② 遺伝子ネットワークを明らかにする上で、計画研究1の連携研究者の佐藤が開発した数理生物学的手法（PLoS Pathog 2010）を用いて遺伝子ネットワークを解析してきた。さらに、計画研究3では、幹細胞のダイナミクスとその制御機構の解明を目指して、細胞の挙動の数理統計解析について、当分野の世界的第一人者であるBenjamin Simons博士（英国ケンブリッジ大学・物理学）との共同研究を行い成果を得た（Cell Stem Cell 2014; 論文投稿中）。

所見③ 計画研究1では、ショウジョウバエPGC中での遺伝子発現に関わるMamoの機能解析からヒストン修飾を介したエピジェネティックな制御の重要性が明らかになっている。計画研究2では、多能性幹細胞とPGCの違いが、ヒストンのメチル化を介した細胞周期遺伝子の発現制御によっていることが明らかになった（Biol Open 2018）。計画研究3では、「幹細胞分化の可逆性、不可逆性」という細胞レベルでの重要な現象を、「エピジェネティックなクロマチン制御」により説明できるという重要な成果を得た（Development 2013）。さらに、国際支援班によって、研究者（計画研究3の分担者:大保G）を英国および独国内に派遣し、最新のエピジェネティック研究の手法を導入した。

所見④ 計画研究1の連携研究者である佐藤、および研究協力者の重信が、他の計画研究や公募研究との共同研究に対応できるような体制をとってきた。

所見⑤ 若手研究者集会開催の支援、海外派遣支援、次世代シーケンサーを用いた研究の支援などを行った。

所見⑥ 松居のCREST研究では、主にエピジェネティック制御が次世代に及ぼす影響に主眼を置いた研究を行っており、本研究と切り分けされている。また、林の所属していた研究室では霊長類に焦点を当てたERATO研究が進行していたが、本研究領域の開始時には新たに独立した研究室を主宰し、マウスを主体とした研究を行うという切り分けがなされた。

<中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

中間評価の総合所見

中間評価として、A（研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる）をいただいた。総合所見等は以下の通りである。

本研究領域は、世代を超えて遺伝子を受け継ぐ始原生殖細胞(PGC)・配偶子幹細胞(GSC)の成り立ちや性質を、さまざまな動物との比較や遺伝子解析、細胞挙動の解析から明らかにし、加えて*in vitro*で配偶子産生過程を再現することを目指すものである。これらの目的について、各計画研究は順調に成果を上げており、高く評価できる。また、領域代表者のリーダーシップによる共同研究体制や

支援体制などが上手く機能しており、評価できる。本研究領域の成果は臨床応用に直結するものもあり、その発展は強く期待される一方で、① 安全性に配慮した成果報告に努めることが望まれる。

(a) **研究の進展状況**：研究領域の設定目的に照らして、一部の計画研究は予想を遥かに超えて達成されているものもあり、全体としても着実に研究は進展している。特に、PGCを制御する新規転写因子であるOvo遺伝子とそのマウスホモログの解析や、GSCの制御因子FGF5に関する研究は新規性が高く、今後の展開が期待できる。遺伝子ネットワークの構築に関しては新たな展開が期待されるが、② 残された期間内での具体的な目標を明確にすることが望まれる。③ 今後、それぞれの計画研究が本研究領域において果たす役割、各公募研究の位置づけ、共同研究の方向性をより明確にすることで更なる発展が期待できる。

(b) **研究成果**：in vitroの配偶子産生に関する研究は、当初の予定よりいち早く目的が達成されており、高く評価できる。中でも、研究項目A02の最も未熟な卵母細胞から成熟卵をin vitroで作成し、さらにこれらの成熟卵が高い産子発生率を示した結果は、極めて画期的であり評価できる。また、研究項目A01のグループとケンブリッジ大学との共同研究によるGSCの精巢内におけるダイナミクスを支配する原理の提案は、ユニークな国際共同研究の成果であり、特筆に値する。今後さらに難易度の高い課題に向かって展開させると同時に、これらの成果を研究領域内で連携・活用し、相乗的な成果を上げることが期待される。

(c) **研究組織**：本研究領域は、公募研究代表者を含めても比較的少人数で構成されているが、本研究領域の活動により着実に人材が育成されており、評価できる。今後の飛躍的な展開には、この分野が専門でなくても④ 新しい意欲的な課題提案をする若手研究者を公募研究代表者として採用することが望まれる。また、⑤ 研究項目A01とA02の緊密な連携によってin vitro系を用いた研究が発展し、大きな研究成果に進展することが期待される。若手及び女性研究者の育成にも十分な取組みがなされている。

(d) **研究費の使用**：効率的な研究費の使用に努力しており、適切と判断される。

(e) **今後の研究領域の推進方策**：領域研究としては、基礎的な研究に軸足を置くことを重視して研究推進することが望まれる。領域代表者が掲げる今後の方針として、産業上の有用動物種からの試験管内配偶子産生を行う研究者を公募研究として取り入れる点は評価できる。本研究領域で上げられたいくつかの成果は、臨床応用に直結するものもあり、発展は強く期待される場所であるが、反面、臨床の現場における社会的影響力は大きいことを認識し、⑥ 安全性に配慮した成果報告に留意されたい。

(f) **各計画研究の継続に係る経費の適切性**：概ね適切である。

上記所見中で番号を付した2重下線で示したポイントに関して対応状況等を下記に記す。

所見①⑥ この点に関しては、特に慎重に成果発表を行ってきた。プレスリリースや学会発表等で成果発表する際には、ブレイクスルーの研究成果と併せて、現状の問題点として、in vitroで産生される成熟卵の受精能や発生能が生体内で産生される卵には及ばないこと、すなわちin vitro培養系における配偶子形成の脆弱さに言及し、臨床応用までの安全性の担保はされていないことを強調した。

所見② 研究を進める過程において、PGCで発現する遺伝子は膨大な数に及ぶことが明らかとなった（ショウジョウバエ胚のPGCでは、全遺伝子の6割程度に発現変動が見られる）。このことから、全ての遺伝子を含むネットワークを描く前に、PGC形成やGSCの挙動を制御する自律的機構に関わる重要なハブとなる遺伝子を同定し、それによる遺伝子発現制御を明らかにする研究を最重要項目として位置づけ研究を行った。

所見③⑤ 本研究領域で進める連携・共同研究のうち、特にA01とA02間の連携と、国際共同研究に注力した。A01とA02間の連携では、計画研究1（A01）においてショウジョウバエの生殖細胞形成に関わることが明らかとなったovoのマウスオーソログの機能解析を計画研究5（A02）で開発したin vitro培養系を用いて成果が得られている。また、計画研究3（A01）では、計画研究6（A02）で開発した精子形成を長期にわたりin vitroで再現する器官培養系を用いて、精子形成のダイナミクス（精細管周期：8.6日周期）を可視化することに成功している。今後はより詳細な細胞挙動を追跡する研究へと発展する。さらに、国際共同研究として、計画研究3、5、6と国内外の研究者との共同研究により、精子幹細胞（GSC）動態の数理的解析、卵子や精子を産生するin vitro培養系のライブイメージング、精子形成過程におけるエピジェネティック制御を明らかにする実験が進み、成果が得られている。

所見③④ 第2期の公募研究では、特にプラナリア、ニワトリ、イモリ、カイコ、ホヤ等のユニークな特徴を持つ動物を材料に研究を進める公募研究を採択し、本領域で進める生殖細胞形成機構の研究の裾野を広げる工夫を行った。

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: 配偶子産生システムの制御機構を知る】

研究項目 A01 では、①雌雄性を有する PGC の形成機構を知ること、②GSC の自己複製と配偶子産生の制御機構を知ること为目标としている。さらに、領域内の共同研究等により、③多様な動物種に解析の対象を広げ動物間での共通原理の理解を目指した。下記の成果の番号は上記の番号と対応し、得られた主な成果を記載する。

計画研究 1・成果①③（領域内共同研究）：生殖細胞の発生に必要な母性転写因子として Ovo を同定した。ショウジョウバエにおいて、Ovo は、生殖細胞の発生を進行させるのに必要であり、PGC 中において生殖系列遺伝子の発現を活性化し、体細胞遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。また、マウスにおける Ovo の機能解析を連携研究者および計画研究 5 と共同して行い、ショウジョウバエと同様に、生殖細胞の発生に必須であることを明らかにした（Sci Rep 2017）。

計画研究 1・成果①（領域内共同研究）：ショウジョウバエにおいて、母性転写因子 Mamo の機能解析を進めた結果、Ovo と共同して生殖系列遺伝子の活性化に関わることを明らかにした（論文作成中）。

計画研究 1・成果①（領域内共同研究）：PGC において、Nanos は、RNA ポリメラーゼ II 活性を低下させる Pgc とともに、体細胞性遺伝子の転写抑制を行っていることを明らかにした（論文投稿中）。

計画研究 1・成果①：PGC では、X（性）染色体の遺伝子量補償が欠如していること、それにより X 染色体数に依存した PGC の性決定が起こることを示唆する結果が得られた（論文未発表）。また、ゲノムに損傷のある生殖細胞の排除機構の存在を示唆する結果も得られた（論文未発表）。

計画研究 2・成果①③（領域内共同研究）：マウス ES 細胞における生殖細胞特異的遺伝子発現の抑制機構において、Max が DNA メチル化酵素およびヒストン H3K9 トリメチル化酵素 SETDB1 と相互作用して、遺伝子発現抑制を行うことを明らかにした（論文投稿中）。しかし、プラナリア、ニワトリ胚、ゼブラフィッシュ胚では、Max の生殖細胞遺伝子の発現抑制への関与は小さい。また PGC において、RNA 結合タンパク質 DND1 が細胞周期を促進する CCND1 の発現を抑制することで、多能性幹細胞への変化が阻害されることが明らかとなった（Biol Open 2018）。さらに、PGC におけるエネルギー代謝の特徴を明らかにし、これが、PGC の生存、および多能性幹細胞への変化の抑制に働いていることが明らかになった。（PNAS 2017）。

計画研究 3・成果②（領域内共同研究）：マウス精子幹細胞の自己複製と分化の制御機構に関して、以下の諸点が明らかになった。1)単核細胞と合胞体の状態をランダムに行き来して幹細胞プールが形成されるという新しいモデルを提唱した（Cell Stem Cell 2014）（国際共同研究）。2)幹細胞は、明瞭なニッチのない環境で分化シグナル Wnt やレチノイン酸に曝されるが、新規に同定した Wnt 抑制因子 Shisa6 やレチノイン酸受容体（RAR γ ）の不均一な発現のために、分化する細胞としない細胞が生じることを見出した

（Development 2015; Stem Cell Reports 2017）。3)開放型ニッチで幹細胞の密度を恒常的に維持する新規のメカニズムおよび、移植後の幹細胞が精子形成を再構築するダイナミクスを数理モデル解析に基づいて提唱した（国際共同研究）（論文投稿中）。

計画研究 3・成果②（領域内共同研究）：幹細胞プールから出て不可逆的に分化する段階ではエピジェネティック修飾が不連続に変化するエピジェネティックチェックポイントが存在することを発見した

（Development 2013）。このチェックポイントの存在を証明するために、チェックポイントで分化が途絶する Kmt2b 欠損マウスの解析を行い、幹細胞分化制御におけるエピゲノムの視点からの解析を行った（投稿準備中）。

計画研究 4・成果②：サケ科魚類の進化に伴う GSC の制御機構を明らかにする研究を行った。進化的に原始的なニジマス（多回繁殖）は排卵、排精後も生殖腺内に未分化生殖細胞を保持しており、移植実験から幹細胞能を保持していることが明らかとなった（Biol Reprod 2017）。一方、進化の進んだヒメマス（一回繁殖）は同時期に配偶子幹細胞の残存は全く見られなかった。生殖細胞移植実験の結果、一回繁殖のヒメマスに移植されたニジマスの配偶子幹細胞は排精後も、宿主の精巣内に残存することが明らかとなった。一方、多回繁殖のニジマスはヒメマスの配偶子を複数年（最長 4 年）にわたり継続的に生産可能であることも明らかになり、配偶子幹細胞の挙動は細胞自律的な制御に加え、その微細環境による制御の影響も大きいことが示唆された（論文未発表）。

公募（鈴木）・成果①（領域内共同研究）：マウス PGC の雄性分化に必須な RNA 結合タンパク質である Deadend1 (DND1) は、RNA 結合タンパク質 NANOS2 と共同して減数分裂関連遺伝子の mRNA の発現を抑制することを明らかにした (EMBO Rep 2016)。また、DND1 を欠損した PGC は多能性細胞へと転換しやすいことが明らかになった (投稿準備中)。

公募（加藤）・成果①（領域内共同研究）：マウス生殖細胞の発生・分化において必須の役割を果たす RNA 結合タンパク質 DAZL の卵胞形成過程における機能解析を行い、この過程において DAZL が 3'UTR 依存的に発現抑制されることが受精後の発生に必要であることを明らかにした (鈴木公募班との共同研究) (PLoS Genet 2018)。また、マウス生殖細胞の雄性分化において必須の役割を果たす RNA 結合タンパク質 NANOS2 の標的 RNA として Dazl を同定した。また、NANOS2 は生殖細胞の雌性分化に働く DAZL に対する拮抗因子として働くことを明らかにした (Nature Commun 2016)。

公募（関）・成果①③：転写因子 PRDM14 が能動的脱メチル化反応を介して、エピプラストから ES 細胞への脱分化を誘導することを明らかにした (Stem Cell Reports 2016)。また、哺乳類において PRDM14 は生殖系列特異的に発現するが、無羊膜類では運動ニューロンにおける発現が進化的に保存されていることを見出した。

公募（中村）・成果①：ショウジョウバエ初期 PGC ではグローバルな転写が抑制されているが、その転写抑制が解除された生殖細胞は、アポトーシスによって失われること、その際に多数のマイクロ RNA が異所的に発現し、生殖質に集積して生殖細胞に取り込まれる母性 mRNA を分解することを明らかにした (論文投稿中)。

公募（熊野）・成果①③：PGC における転写抑制は生殖質を持つ新口動物マボヤにおいても観察される。マボヤ PGC で働く新たな制御因子 2 つを同定し、母性因子 Pem、Popk-1、Zf-1 による転写抑制制御機構を明らかにした (PLoS One 2018)。

公募（白江-倉林）・成果①③：カタユウレイボヤにおいて、後成的に形成される PGC で発現する遺伝子を同定した (Dev Biol 2017)。また、生殖顆粒因子 TDRD7 がマウスと同様精子形成に必要であることを明らかにした。

公募（西島）・成果①③：ニワトリ PGC の分化メカニズムに関する知見はほとんどない。マウス PGC 形成のマスター調節因子である Blimp1 および Prdm14 に着目し、ニワトリでも PGC 形成に重要な働きをしているが、作用機序は異なることを明らかとした (論文準備中)。

公募（林）・成果①③：新規実験動物であるイベリアトゲイモリの遺伝子データベースを構築した (投稿準備中)。また、CRISPR/Cas9 を介したイモリのゲノム編集法を確立した (論文投稿中)。さらに、イモリの配偶子形成における VASA と DAZL 遺伝子の機能を示すことに成功した。

公募（金井）・成果②（領域内共同研究）：ほ乳類の曲精細管の基部に存在する弁様構造 (セルトリバルブ) に精原幹細胞ニッチ (セルトリバルブ・ニッチ) の存在を見出した (Stem Cells 2015)。また、マウス・セルトリバルブは、複数の異なったシグナル活性化状態の特殊なセルトリ細胞が段階的に配置され構築されていることを明らかにした (Mol Reprod, Dev, 2018)。さらに、特定のシグナル因子を吸着したビーズを成体精巣間質内に移植し、ビーズ近傍の精原幹細胞の動態を時空間的に解析できる新規の in vivo アッセイ法を開発した (BBRC 2016)。

公募（岩森）・成果②（領域内共同研究）：精子形成に必須である生殖細胞間架橋 (ICB) の役割を明らかにすることを目的として、ICB のプロテオミクス解析、ICB タンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降・プロテオミクス、RNA シークエンスを行った。ICB タンパク質をコードする新規遺伝子 KIAA1210 は、ICB タンパク質と関連のある Ectoplasmic Specialization 関連遺伝子であることを発見した (Biol Reprod 2017)。また、ノックアウトマウス作製に成功した。

公募（嶋）・成果②（領域内共同研究）：哺乳類の精巣では、胎仔期と思春期以降に性質の異なるライディッヒ細胞が出現し、それぞれ胎仔ライディッヒ細胞、成獣ライディッヒ細胞と呼ばれる。これまで胎仔ライディッヒ細胞が脱分化を経て、精細管周囲筋様細胞や血管周皮細胞へ変化し、成獣ライディッヒ細胞へ再度分化することを明らかにした (論文投稿中)。また、胎仔ライディッヒ細胞に由来する間質細胞の遺伝子発現解析を行い、精子幹細胞の維持や精子形成に関与するシグナルの同定を計画研究 3 と共同して試みている。

公募（新美）・成果②③：ショウジョウバエにおける性決定のマスター遺伝子 Sex-lethal (Sxl) のカイコ相同遺伝子 (Bm-Sxl) の機能を証明するため、TALEN を用いて作出した変異体を解析した。その結果、変異系統のホモ接合体のオスにおいてのみ不妊となり、その原因が無核精子の異常にあることを明らかにした (論文作成中)。

公募（山元）・成果②：GSC を喪失するショウジョウバエ Sex-lethal 変異体において、昆虫細胞内共生菌である Wolbachia が、TomO と命名した新規タンパク質を介して nanos mRNA に結合し、その翻訳を増大させることで GSC 喪失を回復させることを明らかにした (Curr Biol 2016)。

公募（石黒）・成果②：雌雄の減数分裂開始時に一過的に発現する新規の因子として、StIP1 を同定した。

StIP1 は、Stra8 と複合体を形成し、StIP1 の欠損マウスでは減数分裂への進行が見られなくなることを明らかにした。以上より、マウスにおいて StIP1-Stra8 複合体は減数分裂の誘導に決定的な役割を果たしていることが示唆された (投稿準備中)。

公募 (小林^也)・成果②③ : プラナリアの有性化現象では、分化多能性幹細胞から生殖細胞が分化してくる。本研究では、この有性化を引き起こすいくつかの化学物質を同定した (Sci Rep 2017; Zool Lett in press)。

公募 (鎌倉)・成果②③ : ミツバチでは、ショウジョウバエの幹細胞ニッチ (cap cell) に相当する部位ではなく、germarium の表面全体に幹細胞と判断できる pSMAD 陽性細胞が見られたことから、ミツバチの卵形性様式はショウジョウバエとは異なる可能性が示唆された。

【研究項目 A02: in vitro で配偶子産生を再現する】

研究項目 A02 では、①PGC の形成さらに PGC から卵子形成を in vitro で進行させること、②精子幹細胞から長期にわたり精子形成を継続可能な in vitro 系を構築することを目標としていた。さらに、これら in vitro 系を用いて、③生殖医療の基盤となる基礎研究を展開するとともに、④A01 の研究の in vitro 解析系として用いる。下記の成果の番号は上記の番号と対応し、得られた主な成果を記載する。

計画研究 5・成果① : マウスの多能性幹細胞 (ES 細胞および iPS 細胞) を用いて、卵母細胞の分化過程を in vitro 培養系で再現した。その過程での遺伝子発現の変動は生体内の卵母細胞の分化をよく踏襲していた。また最終的に得られた卵子の一部は、受精後に個体にまで発生した (Nature 2016)。

計画研究 5・成果①④ (領域内共同研究) : ショウジョウバエ ovo 遺伝子のマウスホモログ Ovol (Ovol1, 2a, 2b, 2c, 3) の機能解析を in vitro 培養系を用いて行った結果、Ovol2b が主に PGC 形成を促進する因子であり、おそらく遺伝子発現の活性化が重要であることが明らかとなった (論文作成中)。このことから、ovo が種間で保存されているメカニズムに関わることが示唆された。

計画研究 6・成果② (領域内共同研究) : マイクロ流体システムを in vitro 培養系に導入した。これにより、これまでの器官培養法では達成できなかった生体内環境の近似を計った。その結果、マウス in vitro 精子形成の効率の向上と持続期間の延長 (6 か月に亘る精子形成の持続) に成功した (Sci Rep 2016)。また、マイクロ流体デバイスの改良にも取り組み、より簡便かつシンプルなデバイスの作製もおこなった (Sci Rep 2017; BBRC 2018)。

計画研究 6・成果② : in vitro での精子形成に必要な因子として、レチノイン酸を同定した。さらに、これまで知られているホルモン (LH、FSH、Testosterone、Triiodothyronine) が有効であること、また、脂質が重要であることを明らかにした。それらを含む合成培地により、マウス精子形成を円形精子細胞まで進めることに成功した (PLoS One 2018)。

計画研究 6・成果②③ : In vitro 精子形成の臨床応用の一つとして、小児がん患者の精巣組織の凍結保存と解凍後の精子産生がある。その可能性をマウス精巣を用いて検証した。実際に仔マウス精巣組織片を凍結保存し、解凍後に器官培養することで、精子産生し、顕微授精で産仔に成功した (Nat Commun 2014)。

計画研究 7・成果① (領域内共同研究) : マウス PGC から成熟卵を産生する新規 in vitro 系の開発に成功した。これら成熟卵は、受精・胚移植後、マウス産仔へと発生したことから、機能的な成熟卵であることが証明された (特許出願 PCT/JP2016/077574) (J Reprod Dev 2016; PNAS 2016; Ann Biomed Eng 2017; Nature Protoc 2017)。

計画研究 7・成果① (領域内共同研究) : 上記 in vitro 培養系をさらに改良し、簡便で汎用性の高い培養系を樹立し、胎仔卵巣 1 個あたりから 50 個以上の成熟卵の産生を可能にした (投稿準備中)。

公募 (河村)・成果①③ : 重度の卵巣機能不全である早発卵巣不全では、約半数の患者で原始卵胞を含めた卵胞が完全に喪失していることが明らかとなった (Hum Reprod 2015; Curr Opin Obstet Gynecol 2016)。この卵胞が完全に喪失した患者においても、卵巣髄質の組織分散後に PRDM1 陽性細胞が出現することを見出した。さらに、3 段階のサイトカインとアゴニストを含む分化誘導培地を開発し、減数分裂マーカーである SYCP3 遺伝子の発現誘導と核移行に成功した (特許出願中)。

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。

【主な論文（抜粋）】

【計画研究】

- ▲ Sugimori S, Kumata Y, and *Kobayashi S: Maternal Nanos-dependent RNA stabilization in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. **Development, Growth and Differentiation**, 60, 63-75. (2017)
- ▲ Hayashi M, Shinozuka Y, Shigenobu S, Sato M, Sugimoto M, Ito S, Abe K, and *Kobayashi S: Conserved role of Ovo in germline development in mouse and *Drosophila*. **Scientific Reports**, 6, 40056. (2017)
- ▲ Hayashi Y, Otsuka K, Ebin, M, Igarashi K, Takehara A, Matsumoto M, Kanai A, Igarashi K, Soga T, and *Matsui Y: Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, 114, 8286-8294. (2017)
- ▲ Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y (計画研究 3), Hara K (計画研究 3), Mizuguchi H, Sato T (計画研究 6), Taketo M M, Sugiyama F, Ogawa T (計画研究 6), Kobayashi S (計画研究 1), Ueno N, Takahashi S, Takada S, and *Yoshida S (計画研究 3): SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/beta-Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. **Stem Cell Reports**, 8, 561-575. (2017)(領域内共同研究)
- ▲ Sato M, Hayashi M, *Yoshizaki G: Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout. **Biology of Reproduction**, 96, 1303-1316. (2017).
- ◎ ▲ *Hayashi K (計画研究 5), Hikabe O, Obata Y (計画研究 7), and Hirao Y (計画研究 7): Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, 12, 1733-1744. (2017) (領域内共同研究)
- ▲ Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Yao M, and *Ogawa T: *In vitro* mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. **PLoS One**, 13, e0192884. (2018)
- ▲ Morohaku K, Hirao Y, and *Obata Y: Development of fertile mouse oocytes from mitotic germ cells in vitro. **Nature Protocols**, 12, 1817-1829. (2017)
- ▲ Katayama N, Kume S, Hattori-Ihara S, Sadaie S, Hayashi M, *Yoshizaki G: Germ Cell-Specific Excision of loxP-flanked Transgenes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Biology of Reproduction**, 94, 79. (2016).
- ▲ Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y (計画研究 7), Hirao Y (計画研究 7), Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, and *Hayashi K (計画研究 5): Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. **Nature**. 539, 299-303. (2016) (領域内共同研究)
- ◎ ▲ Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, *Ogawa T: Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. **Scientific Reports**, 6, 21472. (2016)
- ◎ ▲ Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K (計画研究 5), *Hirao Y (計画研究 7), and *Obata Y (計画研究 7): Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, 113, 9021-9026. (2016) (領域内共同研究)
- Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, Watakabe I, Ohkawa Y, Suyama M, Kobayashi S, and *M. Tanaka: Sex determination. *foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. **Science**, 349, 328-331. (2015)

- Ohhara Y, Shimada-Niwa Y, Niwa R, Kayashima Y, Hayashi Y, Akagi K, Ueda H, *Yamakawa-Kobayashi K, and *Kobayashi S: Autocrine regulation of ecdysone synthesis by β 3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, 112, 1452-1457. (2015)
- ▲ Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, Noda C, Kobayashi S (計画研究 1), Hara K (計画研究 3), and *Yoshida S (計画研究 3): Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. **Development**, 142, 1582-92. (2015) (領域内共同研究)
- *Matsui Y, Takehara A, Tokitake Y, Ikeda M, Obara Y, Morita-Fujimura, Kimura T, and Nakano T: The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. **Development**, 141, 4457-4467. (2014)
- ▣ Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, *Simons B D, and *Yoshida S: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. **Cell Stem Cell**, 14, 658-72. (2014)
- ▲ Hayashi M, Sato M, Nagasaka Y, Sadaie S, Kobayashi S (計画研究 1), *Yoshizaki G (計画研究 4): Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost. **Biology of Reproduction**, 91, 1-8. (2014) (領域内共同研究)
- ▲ Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, and *Ogawa T: Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. **Nature Communications**, 5: 4320. (2014)
- *Hirao Y, Somfai T, and Naruse K: Production of fertile offspring from oocytes grown in vitro by nuclear transfer in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, 60, 68-72. (2014)
- Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, and *Matsui Y: Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. **Nature Communications**, 4, 1754. (2013)
- Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, and *Saitou M: Induction of the mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. **Nature**, 501, 222-226. (2013)
- 【公募研究】
- ▲ Nakagawa H, Sekii K, Maezawa T, Kitamura M, Miyashita S, Abukawa M, Matsumoto M, and *Kobayashi K: A comprehensive comparison of sex-inducing activity in asexual worms of the planarian *Dugesia ryukyensis*: The crucial sex-inducing substance appears to be present in yolk glands in Tricladida. **Zoological Letters**, in press (2018)
- *Kobayashi K, Maezawa T, Tanaka H, Onuki H, Horiguchi Y, Hirota H, Ishida T, Horiike K, Agata Y, Aoki M, Hoshi M, and Matsumoto M: The identification of D-tryptophan as a bioactive substance for postembryonic ovarian development in the planarian *Dugesia ryukyensis*. **Scientific Reports**, 7, 45175. (2017)
- ▲ Ishiguro K, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, Kimura H, Akiyama T, Oda M, Ko SBH, and *Ko MSH.: 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. (2017)
- ▲ Ishiguro K, Monti M, Akiyama T, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sakota ., Sato S, Redi CA, Ko SBH, and *Ko MSH.: Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, 53, 167-178. (2017)
- ▲ *Shirae-Kurabayashi M (公募研究) and Nakamura A (公募研究): Germ-Cell Formation in Solitary Ascidians: Coexistence of Preformation and Epigenesis. **Reproductive and Developmental Strategies: Springer**, in press. (領域内共同研究)
- Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, and *Sasakura Y.: Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. **Developmental Biology**, 15, 423, 111-125. (2017)

- ▲*Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, and Matzuk MM: Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. **Biology of Reproduction**, 96, 469-477. (2017)
- ▲*Kawashima I, and *Kawamura K: Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. **Reproduction**, 153, R205-R213. (2017)
- ▲*Miyaoku K, Nakamoto, Nishida H, and Kumano G: Control of Pem protein level by localized maternal factors for transcriptional regulation in the germline of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **PLoS One**, 13, e0196500. (2018)
- ▲Okuzaki Y, *Kaneoka H, Nishijima K, Murakami S, Ozawa Y, and Iijima S: Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 490, 753-759. (2017)
- ◎ ▲Hirako A, Takeoka Y, Hayashi T, Takeuchi T, Furukawa S, and *Sugiyama A, Effects of cadmium exposure on Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*) testes. **Journal of Toxicologic Pathology**, 30, 345-350. (2017)
- ▲*Shima Y, and Morohashi K: Leydig Progenitor Cells in Fetal Testis, **Molecular and Cellular Endocrinology**, 445, 55-64. (2017)
- ▲Ote M, Ueyama M, and *Yamamoto D: Wolbachia protein TomO targets nanos mRNA and restores germ stem cells in *Drosophila Sex-lethal* mutants. **Current Biology**, 26, 2223-2232. (2016).
- ◎ ▲Uchida A, Kishi K, Aiyama Y, Miura K, Takase HM, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Iwamori T (公募研究), Kurohmaru M, Tsunekawa N, and *Kanai Y (公募研究): In vivo dynamics of GFR α 1-positive spermatogonia stimulated by GDNF signals using a bead transplantation assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 476, 546-552. (2016) (領域内共同研究)
- ▲*Suzuki A, Niimi Y, Shinmyozu K, Zhou Z, Kiso M, and *Saga Y: Dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development. **EMBO Reports**, 17, 37-46. (2016) (査読有)
- *Niwa H, Nakamura A (公募研究), Urata M, Shirae-Kurabayashi M (公募研究), Kuraku S, Russell S, and Ohtsuka S: The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells. **BMC Evolutionary Biology**, 16, 173. (2016) (領域内共同研究)
- ▲Fukuda K, Masuda A, Naka T, Suzuki A, *Kato Y, and *Saga Y: Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of Dazl in oocytes for pre-implantation mouse development **PLoS Genetics** (in press) (領域内共同研究)
- Kato Y, Katsuki T, Kokubo H, Masuda A, and *Saga U: Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. **Nature Communications**, 7, 11272. (2016)
- ▲Hamada-Kawaguchi N, Nishida Y, and *Yamamoto D: Btk29A-mediated tyrosine phosphorylation of Armadillo/ β -catenin promotes ring canal growth in *Drosophila* oogenesis. **PLoS ONE**, 10, e0121484. (2015)
- Aiyama Y, Tsunekawa N, Kishi K, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, and *Kanai Y: A Niche for GFR α 1-Positive Spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes. **Stem Cells**, 33, 2811-24. (2015)
- *Sano H, Nakamura A, Texada M, Truman J W, Ishimoto H, Kamikouchi A, Nibu Y, Kume K, Ida T, and Kojima M: The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genetics**, 28, 11:e1005209. (2015)

【書籍】

- 浅岡美穂、小林悟 「動物学の百科事典」(丸善出版株式会社) (2018)
- Yoshida S. Regulatory mechanism of spermatogenic stem cells in mice: their dynamic and context-dependent behavior. In “Reproductive & Developmental Strategies”, K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, and M. Kondo, eds. (Springer), Chapter 4, Stem Cell, (2018).
- Ogawa T: *In vitro* differentiation of Spermatogonia, In “The Biology of Mammalian Spermatogonia”, J. Oatley, M. Griswold, eds. Chapter 13 (Springer) (2017)
- 小林一也、関井清乃「シリーズ・生命の神秘と不思議 プラナリアたちの巧みな生殖戦略」(裳華房) (2017)

尾畑やよい: 「発生学とエピジェネティクス」 『哺乳動物の発生工学』 佐藤英明、河野友宏、内藤邦彦、小倉淳郎編 朝倉書店 pp 13-26 (2014)
吉崎悟朗: サバからマグロが産まれる!? 岩波書店 (2014)

【ホームページ】

領域ホームページ: <http://www.nibb.ac.jp/adventures-in-germline-wonderland/index.html>

【主催シンポジウム等】

- 公募研究・小林_也: シンポジウム The International Research Symposium on “Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with the Fly and Mouse System” 2018年3月(弘前)
- 計画研究・小川: 学術集会「生殖医療の未来を垣間見る」第13回日本生殖発生医学会・学術集会、2018年3月(東京)
- 公募研究・中村: KEY FORUM 2018: The 3rd International Symposium on “Stem Cell Traits and Developmental Systems”、2018年1月(熊本)
- 公募研究・河村: 研究集会「ライフサイエンス 新技術説明会 ～医療系大学～」、JST 新技術説明会、2017年12月(東京)
- 公募研究・林_{利憲}: 第2回イベリアトゲイモリ研究会、2017年12月(鳥取)
- 計画研究・林: 国際シンポジウム“Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro” 本領域の国際シンポジウム、2017年7月(福岡)
- 計画研究・小林: シンポジウム“Germ Cell” 50th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists、2017年5月(東京)
- 計画研究・林: シンポジウム“Regeneration & Metamorphosis” 50th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists、2017年5月(東京)
- 公募研究・金井: シンポジウム「配偶子形成・受精・着床の最先端研究」 第57回日本組織細胞化学会、2016年9月(東京)
- 計画研究・吉田: 研究会“Cellular Dynamics in Tissues” 基礎生物学研究所、2016年1月(岡崎)
- 計画研究・吉崎・平尾: シンポジウム「in vitro における生殖細胞形成研究の最新トピックス」第108回日本繁殖生物学会、2015年9月(宮崎)

【アウトリーチ活動】(主なものについて記載)

- 公募研究・小林_也: 招待講演 「プラナリアの生殖様式転換機構の解明を目指して」第6回生殖若手の会、2018年3月1日(下田)
- 公募研究・中村: 教育講演 「ショウジョウバエの紹介・基礎生命科学研究でショウジョウバエが使われる理由」熊本県立宇土高校(SSH指定校)分子生物学講座講師、2017年10月13日
- 公募研究・石黒: 出前授業 東京都立日比谷高校(SSH指定校)、2017年7月21日(東京)
- 計画研究・松居: 出前授業 岩手県立釜石高等学校(スーパーサイエンスハイスクール講演会・学問を学ぶ)2017年7月6日(岩手)
- 公募研究・嶋: 教育講演 「哺乳類における胎仔型ライディッチ細胞と成獣型ライディッチ細胞の分化のメカニズム」日本アンドロロジー学会 第36回学術大会、2017年6月30日(倉敷)
- 計画研究・小林・吉崎: 講演「いのちをつなげる生殖細胞(生殖細胞を知る・使う)」国立科学博物館企画展「卵から始まる形づくり～発生生物学への誘い～」「発生学おもしろ Duo トーク」、2017年4月23日(東京)
- 計画研究・小林・吉田: 実行委員 国立科学博物館企画展「卵からはじまる形づくり」、2017年4～6月(東京)
- 計画研究・小林: 主催 公開シンポジウム『生殖細胞に秘められたパワーを解く』日本動物学会関東支部 第69回大会、2017年3月20日、(東京)
- 計画研究・尾畑: 出張講義 「卵子と精子のはなし」東京都立小石川中等教育学校(SSH指定校)、2016年12月19日(東京)

- 計画研究・林：教育講演 「未知への挑戦～IPS 細胞の研究に携わって～」浦和西高等学校 80 周年記念式典、
2014 年 11 月 8 日、(埼玉)
- 公募研究・鎌倉：講演 「ミツバチのカースト分化誘導機構の解析—生物学研究のケーススタディ」GE ヘルス
ケア・ジャパンはじめてのライフサイエンス基礎講座、2014 年 7 月 25 日 (富山)
- 公募研究・鎌倉：模擬講義 「ミツバチの生態と生物の進化について」、富山県立氷見高校大学見学模擬講義
2014 年 7 月 10 日 (富山)
- 公募研究・中村：模擬授業 「ショウジョウバエ研究からわかってくる私たちの体ができあがるしくみ」熊本
県立八代中学、2014 年 6 月 13 日

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。

本領域では領域会議を年2回開催してきた。5年間における9回の領域会議と3回の「Germ Cellの会」（若手主体の研究会）では、自由闊達な情報交換・意見交換が行われ、それが研究の新たな発想やモチベーションを生み、領域全体の活性化に貢献したと感じている。これらの会議では、得られた研究成果（良い結果やデータ）のみならず、研究を進める上で困難な点や生データも発表しあい、領域メンバーが共有することができた。それらに対し、様々なアイデアや示唆が多くの参加者から得られることが多く、その後の共同研究にも発展する例もあった。研究が停滞している場合も、取り繕うことなく、ありのままを発表することで研究の進展が得られることは若い研究者にとって得難い機会になったと思われる。

領域内における各研究組織の研究における連携状況を下表にまとめた。

計画研究/公募研究 代表者			情報/技術等の提供元																						
			計画研究						公募研究																
			項目A01			項目A02			項目A01															A02	
			小林 悟	松居 吉田	吉崎	林	小川 尾畑	小林 一也	山元	金井	鈴木	岩森	中村	加藤	倉林	鎌倉	林 利憲	西島	熊野	新美	関	嶋	石黒	河村	
計画研究	項目 A01	小林 ^悟			情報																				
		松居	技術			技術		技術																	
		吉田	技術			技術	技術			技術	技術												情報	検体	
		吉崎	技術	情報																					
項目 A02	林	情報			技術	技術																			
	小川					情報																			
	尾畑				情報	技術																			
	小林 ^{一也}	技術	情報																						
情報/ 技術等の 提供先	項目 A01	山元																							
		金井																							
		鈴木																							
		岩森																							
		中村	情報																						
		加藤	技術																						
		倉林																							
		鎌倉	情報																						
		林 ^{利憲}																							
		西島																							
		熊野																							
		新美																							
		関																							
		嶋																							
		石黒																							
		A02	河村				技術	技術																	

技術：数理的解析等の技術の供与、セルソーターを用いて細胞を分取するなどの技術供与
 情報：未発表の研究成果などの供与
 検体：解析に用いる細胞や生物の系統等の検体の供与

本学術領域の特徴の一つとして、メカニズム探究型の基礎研究（主として【A01】）と応用志向型の研究（主として【A02】）の研究者間に有機的な共同研究が成立し、成果を挙げることができた。また、計画班と公募班に垣根なく連携が行われており、有益な研究成果につながったと言える。一方で、同じ目的を持つ研究者の連携として、林 G（計画研究 5）と尾畑 G（計画研究 7）の連携研究は特筆すべきである。尾畑は分担者である平尾とともにマウスを用いた *in vitro* での卵形成という難題に挑戦したが、平尾のこれまでのノウハウを尾畑は取り入れて、核移植で培ってきた繊細な技術を支えに培養実験を続けた。その結果、エストロゲン作用を抑えることで卵形成の進展が得られることを見出し、PGC から成熟受精卵産生までの全過程を *in vitro* で再現することに世界で初めて成功した（PNAS 2016）。その成果は領域内でいち早く共有された。特に、ES/iPS 細胞からの生殖細胞の *in vitro* 誘導を手掛けてきた林は、尾畑・平尾から培養技術の伝授を受け、ES/iPS 細胞から PGC、そして卵原細胞への分化、さらに成熟卵までの *in vitro* 誘導に成功した（Nature 2016）。この成果は、領域内の有機的な共同研究体制の推進により初めて達成されたものと考えている。

小林 G（計画研究 1）では、分担者である向と生殖細胞の形成に必要な Mamo の機能解析および生殖幹細胞におけるエピジェネティック状態の解析を共同研究で行い重要な成果を得た（BBRC 2013, Biol Open 2015）。また小林は林との共同研究で、PGC 形成におけるマウス *Ovol* 遺伝子ノックアウト PGCs とショウジョウバエ *OVO* ノックダウン PGCs の遺伝子発現解析を比較検討し種間の違いと共通性を解析した。

小川 G は、精巣器官培養にマイクロ流体デバイスを導入して新しい培養法を開発したが、総括班からの資金面でのサポートを受け、領域内の他のメンバーにデバイスとノウハウの提供を行った。吉田らは精巣のライブイメージングに応用できる可能性を模索し、デバイスの新たな設計も含め木村（小川 G 分担者）と共同研究を開始し、システムの最適化を行った。また、マイクロ流体デバイスは、卵形成にも応用できると考えられ、林 G、平尾（尾畑 G）にデバイスならびにノウハウを提供した。鈴木（公募班）にもミニデバイスを提供し、胎仔精巣培養に用いて良好な結果を得ている。

研究用検体（遺伝子改変マウス、遺伝子改変ショウジョウバエ、プラスミド、抗体、フィーダー細胞、等）の提供・分与も領域内研究者間で数多く行われ、研究の推進に貢献した。これらも領域会議等での情報交換によるところが大きかった。また、上表には現れていないが、総括班から、計画研究や公募研究における RNA シーケンシング等に対して解析費用のサポートを行った。

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。）。

設備などの活用状況

共有設備の購入および利用:本研究領域では、配偶子産生過程における遺伝子ネットワークを解明することを目的としている。そのために、ショウジョウバエやマウス等の胚や個体さらに*in vitro* 培養系から、PGC やGSC 等の配偶子産生に関わる細胞を分取することが必須である。そのために、高速かつ高純度で細胞を分取できる微量高速セルソーターを購入した。さらに、分取した微量サンプルからRNA を抽出し、cDNA合成、色素ラベル等を行うための、プロセッサーや定量PCR装置も必須である。これらの装置は、小林Gの経費で購入し、大学共同利用機関法人自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンターに設置し、小林が、これら装置の管理を行うとともに、各計画研究間で共用の機器として使用するための技術的サポートを行ってきた。これらの備品は、領域代表者である小林の異動に伴い、筑波大学・生存ダイナミクス研究センターに移管し稼働している。この設備を使用し、マウス精子幹細胞画分を純化、それを用いてマイクロアレイデータを取得した。この成果は領域内の共同利用に供している。このような機器をそれぞれの研究経費により複数台購入するのではなく、共有することで経費削減を行うことができた。

研究費の効果的な使用

各計画研究及び公募研究において、試薬など消耗品の単価の比較や、研究に必要な薬品を厳選するなど、限られた研究費を効果的に使用してきた。その他、下記のように解析経費／技術支援経費を総括班に置き、効果的な使用を行ってきた。

次世代シーケンサーを用いた解析に関して、基礎生物学研究所・生物機能解析センターの次世代シーケンサー、あるいは外部委託（ミネソタ大学の解析センター等を利用することでコストを抑えることができる）により大規模データを取得し、小林Gの重信および佐藤等が解析をサポートする体制をとってきた。このような支援体制だと、研究者が所属機関の次世代シーケンサーを使わずに一箇所に集中してデータ取得を行うことにより、技術的に安定し、失敗が無く、かつ少ないマンパワーで対費用効果が高い良質な研究結果を出すことができる。また、基礎生物学研究所・生物機能解析センターや外部委託の次世代シーケンサー解析の費用を総括班からサポートした。計画・公募研究代表者・分担者の所属機関にも共用の次世代シーケンサーがあるが旧式でありコストが高い場合があり、より多くのリード数が必要な場合はコストが実験の限界となる場合もあった。以上のように、一本化して解析支援を行う方式は、研究費の使用において、効率的と言える。このような費用を総括班の非常に限られた予算から捻出するために、人件費などを大幅にカットし、解析支援のために物品費に回した。

・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	微量高速セルソーター	バックマンコールター社 MOFLOXDP	1	32,025,000	32,025,000	自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設) (H27年度筑波大学へ移管)
	共焦点レーザー顕微鏡	ライカマイクロシステムズ社 TCS SP8	1	26,008,500	26,008,500	基礎生物学研究所
	ライブセル顕微鏡	オリンパス IX83-D SU	1	14,028,000	14,028,000	横浜市立大学
	定量的遺伝子発現解析装置	ロッシュダイアグノステイクス社 LightCycler	1	7,675,836	7,675,836	自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設) (H27年度筑波大学へ移管)
	倒立顕微鏡システム	オリンパス OM-B-80125	1	5,649,000	5,649,000	横浜市立大学
26	高感度共焦点レーザー顕微鏡	ライカマイクロシステムズ(株) TCS SP8 D-SET	1	15,498,000	15,498,000	自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設) (H27年度筑波大学へ移管)
	セルソーター	BioRad 488 レーザー2 蛍光検出システム	1	5,394,600	5,394,600	東北大学
27	IX83 倒立型リサーチ顕微鏡	オリンパス(株) IX83PIZF	1	4,636,440	4,636,440	基礎生物学研究所
	S3 セルソーター561nm レーザーアップグレード	BioRad 145-1072	1	4,205,520	4,205,520	東北大学
	バイオアナライザ電気泳動システムリミット	アジレント・テクノロジー(株) Agilent2100	1	2,889,000	2,889,000	横浜市立大学
	フィードバック式加湿チャンバ	(株)東海ヒット STG-IX3WX-SET	1	2,223,936	2,223,936	基礎生物学研究所
	顕微鏡用培養システム	INUBG2TF-WSKM-D15V	1	2,052,000	2,052,000	九州大学
28	Thermal Cycler Dice 一式	タカラバイオ(株) Real Time System II	1	2,316,600	2,316,600	東北大学
	回転式胎仔培養装置	IKEMOTO 社 (10-0311)	1	1,782,324	1,782,324	横浜市立大学
29	横型ディープリージャー	CLN-35C	1	966,600	966,600	横浜市立大学

(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	
海外開催学会出席等旅費	1,499,036円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
国内研究打ち合わせ旅費	614,237円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
領域班会議出席旅費	474,957円 (領域内の研究の進展状況の確認のため)
実験試料採集・実験等旅費	229,150円 (実験試料採集・実験等のため)
シンポジウム・セミナー出席旅費	165,650円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
・人件費・謝金	
研究員・技術補佐員人件費	25,115,914円 (研究および領域運営の迅速な推進のため)
講演等謝金	56,640円 (講演に対する謝金)
・その他	
試料測定・解析料	5,060,752円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器保守契約費用	3,443,338円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器修理・点検等費用	2,190,238円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
研究施設使用料	486,130円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
学会参加費	223,525円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
【平成26年度】	
・旅費	
海外開催学会出席等旅費	2,214,489円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
領域班会議出席旅費	1,785,056円 (領域内の研究の進展状況の確認のため)
国内学会出席・招聘研究者旅費	1,036,070円 (国内学会出席・研究者招聘のため)
国内開催学会出席旅費	603,324円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
シンポジウム・セミナー出席旅費	359,596円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
国内研究打ち合わせ旅費	603,324円 (研究打ち合わせのため)
海外での招待講演旅費	42,761円 (海外開催学会での招待講演のため)
・人件費・謝金	
研究員・技術補佐員人件費	57,459,546円 (研究および領域運営の迅速な推進のため)
・その他	
機器修理・点検等費用	3,844,701円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器保守契約費用	3,363,750円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
論文校正・投稿・掲載料	904,163円 (研究成果公表のため)
試料測定・解析料	638,754円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
研究施設使用料	571,069円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
学会参加費	334,843円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
機器使用料	267,749円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
【平成27年度】	
・旅費	
海外開催学会出席等旅費	1,381,731円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
領域班会議出席旅費	1,117,910円 (領域内の研究の進展状況の確認のため)
国内開催学会出席旅費	437,228円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
招聘研究者旅費	144,920円 (研究者を招聘のため)
国内研究打ち合わせ旅費	110,800円 (研究打ち合わせのため)
シンポジウム、セミナー出席旅費	7,480円 (最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
・人件費・謝金	
研究員・技術補佐員人件費	48,542,260円 (研究および領域運営の迅速な推進のため)
講演等謝金	100,000円 (講演に対する謝金)
・その他	
研究施設使用料	3,000,987円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器保守契約費用	2,478,600円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器使用料	865,361円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
実験機器移設作業費用	825,120円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器修理・点検等費用	748,859円 (研究の迅速かつ正確な推進のため)

試料測定・解析料	567,140 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
論文校正・投稿・掲載料	482,778 円	(研究成果公表のため)
学会参加費	317,369 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
【平成28年度】		
・旅費		
海外開催学会出席等旅費	3,922,247 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
領域班会議出席旅費	1,176,188 円	(領域内の研究の進展状況の確認のため)
海外での研究打ち合わせ旅費	847,155 円	(海外での研究打ち合わせのため)
国内開催学会出席旅費	846,240 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
シンポジウム、セミナー出席旅費	201,360 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
国内研究打ち合わせ旅費	99,730 円	(研究打ち合わせのため)
招聘研究者旅費	65,520 円	(研究者を招聘のため)
実験試料採集旅費	15,998 円	(実験試料採集のため)
・人件費・謝金		
研究員・技術補佐員人件費	53,478,428 円	(研究および領域運営の迅速な推進のため)
講演等謝金	111,560 円	(講演等に対する謝金)
・その他		
研究施設使用料	2,847,238 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器保守契約費用	2,100,600 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
試料測定・解析料	2,086,259 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器修理・点検等費用	1,785,132 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
論文校正・投稿・掲載料	1,357,233 円	(研究成果公表のため)
機器使用料	1,029,495 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
学会参加費	777,615 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
【平成29年度】		
・旅費		
海外開催学会出席旅費	2,608,959 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
国内開催学会出席旅費	861,550 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
領域班会議出席旅費	838,126 円	(領域内の研究の進展状況の確認のため)
国内研究打ち合わせ	190,410 円	(研究打ち合わせのため)
実験試料採集・実験等旅費	95,300 円	(実験試料採集のため)
シンポジウム、セミナー出席旅費	57,040 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)
・人件費・謝金		
研究員・技術補佐員人件費	42,515,296 円	(研究および領域運営の迅速な推進のため)
・その他		
研究施設使用料	3,712,856 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
試料測定・解析料	3,542,029 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器修理・点検等費用	1,732,405 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器保守契約費用	1,614,600 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
機器使用料	852,124 円	(研究の迅速かつ正確な推進のため)
論文校正・投稿・掲載料	732,508 円	(研究成果公表のため)
学会参加費	215,875 円	(最新研究の動向・情報収集と意見交換のため)

(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。

計画研究1では、平成29年度の研究費の一部の繰越しを行った。これは、PGCを分取するための2重突然変異系統の作出が、生存率の予期せぬ低下などで困難になったため、この原因を解析し、再度突然変異系統を作出し、ソートしたPGCをRNA-seq解析に供する必要が生じたため繰越しを行った。繰越しを行っても、領域の研究成果取りまとめにおいて支障は生じない。

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。

本研究領域は、「配偶子産生システムの制御機構」に関して、基礎と応用指向の研究間の相互連携を促進し、様々な動物を用いている研究者を公募研究として取り込むことにより基礎生物学や医学、畜産学、水産学等の広い分野にまたがる新たな学術領域を創成することを狙いとして領域活動を行ってきた。特に、本研究領域の裾野を広げ、関連分野への貢献を果たすために、以下のように、国内関連学会においてシンポジウムなどを開催し、本研究領域で得られた結果を積極的に発信してきた。

計画研究代表者の松居と領域代表者の小林が、第47回日本発生生物学会において、シンポジウム"A Contact Point Between Pluripotency and Germness"（2014年5月30日）を、計画研究代表者の小川と領域代表者の小林が、第60回日本生殖医学会学術講演会「生殖細胞の産生制御機構」（2015年4月27日）を、計画研究代表者の吉崎が、第17回マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム「魚類における生殖細胞移植の現状と将来」（2015年5月31日）を、計画研究代表者と分担者の吉崎と平尾が、第108回日本繁殖生物学会「in vitro における生殖細胞形成研究の最新トピックス」（2015年9月19日）を、計画研究林らが、第38回日本分子生物学会年会シンポジウム「生殖細胞の発生・分化・エピゲノム制御とその試験管内再構成」（2015年12月3日）を、領域代表者の小林と計画研究代表者の林と吉崎が、第69回日本動物学会関東支部大会 シンポジウム「生殖細胞に秘められたパワーを解く」（2017年3月20日）を、領域代表者の小林と計画研究代表者の林が、第50回日本発生生物学会 シンポジウム「Germ Cell」（2017年5月12日）を、計画研究代表者の小川が、第13回日本生殖発生医学会・学術集会「生殖医療の未来を垣間見る」（2018年3月18日）を、計画研究代表者の吉田が、CDB Symposium 2018 「Dynamic Homeostasis From Development to Aging」（2018年3月26-28日）を開催した。さらに、計画研究代表者の林は、本新学術領域研究の成果を国内外に広く発信し議論する場として、国際シンポジウム「The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro」（2017年7月26-28日）を開催し、本領域の成果が国内外の研究にインパクトを有していることを確認できた。

プレスリリースも積極的に行い、新聞やテレビなどで研究成果が報道された（国内89件、海外12件）。特に、計画研究代表者の林の研究成果は、新聞(国内16件、国外3件)、テレビ報道等で3件が、計画研究代表者の吉崎の研究成果は、新聞(国内28件)、雑誌（国内9件）、テレビ報道等で9件(国内7件、国外2件)紹介された。また、小林_也（公募研究）が編集に携わった書籍「Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life」Springer Japan社（2018）に、藤澤/小林（計画研究）、林良樹/小林（計画研究）、吉田（計画研究）、小林_也（公募研究）、倉林(白江)（公募研究）、金井（公募研究）、熊野（公募研究）が執筆した。これにより、本領域の研究成果を国内外に発信することができた。

本研究領域の研究成果については、2.研究領域の設定目的の達成度、5.主な研究成果に記載するが、特に、多能性幹細胞から卵子をin vitro で作製した計画研究代表者の林の研究成果は Sciences 誌が選ぶ2016年のサイエンス10大ニュースに選定された。当該年において日本の学術研究から選定されたのは2件のみであった。この研究成果はヒトを含めた様々な動物への応用が議論され、広い波及効果があった。また、多回繁殖型のニジマスに一回繁殖型の魚種の配偶子を生産させる手法は（計画研究代表者の吉崎）、貴重な一回繁殖型種の配偶子を繰り返し、効率的に生産する手法として魚類生産分野において有用な方法として利用されることが期待される。そのほかにも、多くの研究成果が得られ、基礎生物学や医学、畜産学、水産学等の関連分野に波及効果を生み出した。

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。

若手研究者による発表・若手研究会の支援

本研究領域では、毎年2回行う領域会議のうち1回は Informal 形式とし、実験等に携わっている若手研究者（ポスドク、大学院生、等）による発表を推奨し実行してきた。

若手研究者自身が、研究会やワークショップを企画・開催する活動も積極的に応援した。吉田 G の原は、2017 年の第 16 回日本畜産学会において若手企画シンポジウム「ランチョンセミナー ネイティブが日本人に伝える英語プレゼンテーションの極意」を主催した。また同じく吉田 G の中村は、日本畜産学会での若手企画交流会等を 2015 年から毎年世話人代表として担当している。2015 年にはベトナムで開催されて第 12 回 International Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society でのワークショップでは講師として講演も行った。

若手研究者の昇進

助教への昇進が 10 名、准教授への昇進が 3 名、教授への昇任が 4 名あった。特に、林^{克彦}は、九州大学の教授に、尾畑は東京農業大学において准教授から教授に昇進したことは、本研究領域での研究成果に寄るところが大きい。公募班の河村は、国際医療福祉大学医学部産婦人科の教授、金井公募班の恒川助教は日本大学生物資源科学部の教授に就任した。吉田 G の連携研究者だった原助教は、東北大学の准教授に就任した。嶋（公募班）は川崎医科大学の准教授に、石黒（公募班）は熊本大学発生医学研究所の独立准教授に就任した。

若手研究者の受賞

諸白（尾畑 G）が、2018 年度日本繁殖生物学会奨励賞を、原（吉田 G）が、2015 年度第 4 回自然科学研究機構 若手研究者賞を受賞した。海外での国際学会においてポスター賞を 3 名が、Travel Fund Award を 1 名が受賞した。

若手研究者の海外での活躍

所属研究室を卒業し、海外研究員として活躍しているのは、米国ミシガン大学に 1 名、米国デューク大学に 1 名であり、いずれも生殖細胞研究のトップラボで研究に勤しんでいる。

国内の学会での奨励賞の受賞

日本分子生物学会、日本繁殖生物学会、日本生殖内分泌学会、日本遺伝学会大会、日本泌尿器科学会総会、日本アンドロロジー学会、日本生殖再生医学会等において学術奨励賞の受賞が計 9 名（11 回）である。

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。

本研究領域では、領域会議や総括班会議において評価委員の評価やアドバイスを基に、本研究領域における研究の進め方や、研究支援／技術支援等の総括班の活動指針を策定し、本研究領域の発展に努めてきた。以下に研究領域に対する評価委員からのコメントを記す。

阿形清和（学習院大学・理学部生命科学科 大学院自然科学研究科生命科学専攻・教授）

日本の生殖細胞系列関連の研究は世界でダントツの研究者層の厚さと研究成果を創出している。今回も、本研究班の基礎研究の蓄積の上に、マウスのES細胞およびiPS細胞から、*in vitro*培養系で卵母細胞の作出に成功し、最終的には*in vitro*で得られた卵子から受精して個体にまで発生させることに成功している。皮膚の細胞から卵子を作って個体にまですることができる時代がこんなに早く来るとはだれが想像したことだろう。これがピラミッド構造を形成している日本の生殖細胞分野研究の強さと言えよう。逆に言えば、このような研究者層の厚い学問分野を作ることが、日本が世界で勝ち抜くための研究モデルになることを示唆している（一点集中型政策とは違う強さがあることを強調したい）。似たような成果として、一回繁殖のヒメマスのPGCを多回繁殖のニジマスに移植したところ、ヒメマスPGCが複数年にわたり精子を生産するようになったことも特筆ものの成果である。本班のようないろいろな経歴をもった基礎研究者の研究の蓄積によって、絶滅危惧種の皮膚から精子や卵子を作って、異種動物の繁殖システムに乗せるという新たな時代が切り拓かれることを期待したい。

今井 裕（京都大学・農学研究科 応用生物化学専攻・教授）

本研究領域は、様々な動物の配偶子生産システムに共通する制御機構のメカニズムを解明するとともに、体外での配偶子生産を可能にするシステムの開発を目指したものである。全体的に、オリジナリティーの高い研究成果があがっており、その一部は質の高い学術誌にも掲載されている。また、未公表であるが萌芽的な研究成果も多くあり、国際的なレベルで見ても研究成果のあがった研究領域であったと評価できる。特に、ショウジョウバエの配偶子生産システムの一部が、哺乳動物でも共通するものがあることの発見、マウスにおける生殖幹細胞ニッチが従来考えられていたような、閉鎖系ではなくもっとダイナミックな維持機構があることの発見。雌の卵母細胞を完全に体外で成熟させ、個体生産に成功するとともに、この成果を多能性幹細胞からの卵形成と個体生産に結び付けたことは特記に値する。しかし、その成功率は依然として低いことを考慮すると、配偶子生産システムの制御機構を解明と利用において、真にモデルとなっているかについては、今後の問題点として残されている。

長濱嘉孝（自然科学研究機構 基礎生物学研究所・名誉教授）

本研究領域では、動物の配偶子産生システムの制御機構について、1) 動物種を超えて共通なメカニズムを明らかにすること、2) 配偶子を産生する新規培養系を開発することを目指し、研究代表者の強力な指導力の下、多くの優れた研究成果が得られた。なかでも、1) については、*ovo* 遺伝子（生殖細胞形成に必須）の働きを介した生殖細胞形成の動物種間共通機構、さらには、GSC（配偶子生産の持続性に必須）の細胞自律的な機構、特にGSCの精巣内ダイナミクスを支配する3要素の同定など、動物の配偶子産生システムの成立に不可欠な基本機構を世界に先駆け解明した。一方、2) については、マウスの多能性幹細胞（ES細胞）からPGCを経て、卵子を生産し、それに由来する受精卵からES細胞を樹立することに世界で初めて成功した。

これらの極めて高水準の研究成果は、当該分野の国内最高レベルの研究者が結集したことに加え、研究領域内外（国際）共同研究が緊密かつ有機的に遂行されたことにより達成された判断される。特に、雌マウスの生殖系列サイクルをすべて*in vitro*で再構築することに成功した研究については、領域内での研究成果が直ちに共有されたことで、さらなる研究進展に繋がり、生殖細胞研究者の積年の課題を解決するに至

ったことは特筆される。当該分野・関連学術分野への大きな波及効果も期待できる。また、遺伝子ネットワークの解明等に不可欠な大型機器等については一括して岡崎統合バイオサイエンスセンター（筑波大学に移管）に設置・管理され、共用の機器として研究領域内で効率的活用が促進され研究進展に大きく寄与した。将来を担う若手研究者の育成についても積極的な育成方策が講ぜられ、若手研究者の昇進、キャリアアップに貢献した。このように、本領域研究では、研究代表者の強力なリーダーシップの下、基礎（生物学）と応用（医学、畜産学、水産学等）の広い分野が融合した新たな生殖細胞学術領域が創成され、この基礎・応用研究集団による世界を先導する研究成果の創出が今後ますます期待される。まさに、新学術領域研究の模範例となるような期待以上の成果が本研究領域研究により得られたと高く評価できる。

諸橋憲一郎（九州大学 大学院医学研究院 分子生命系部門性差生物学講座・教授）

本領域は動物における配偶子産生システムを理解することを目的に立ち上げられた。具体的な目標としては、① 配偶子産生システムの制御機構の理解と、② *in vitro* における配偶子産生の再現が挙げられていた。この5年間の研究では、林らならびに尾畑らの研究成果は秀逸で、卵子の *in vitro* 産生を可能とした。小林領域に先行した吉田領域では *in vitro* で精子を産生しており、この二つの領域で雌雄の配偶子を *in vitro* で産生するという快挙とも言える成果をあげたことは特筆すべきであろう。これらの成果は世界的にも極めて高い評価を受けるものであり、我が国の生殖生物学は他の追随を許さないレベルに到達している。従って、本領域が掲げた具体的な目標のうち、②の目標は十分に達成されたと考えられる。一方、①の配偶子産生システムの制御機構についても、*Ovo* 遺伝子の機能や生殖幹細胞の維持と分化のバランスの制御など、興味深い研究成果が得られている。これらの成果から、配偶子産生システムの基本メカニズムを理解するまでにはさらに時間を要すると思われた。また、これらの成果が *in vitro* の配偶子産生の効率や正常性の維持へ貢献することが期待されるが、この点は今後の重要な課題として残されている。総括班活動については、国際会議の開催、若手研究者の育成など、領域代表を中心に組織的な取り組みが行われており、十分な成果があがっている。

山本正幸（自然科学研究機構 基礎生物学研究所・所長）

新学術領域研究「配偶子産生制御」の5カ年に渡る活動は、以下の観点から、当該領域の活性化に大きな寄与をしたと評価することができる。まず、本事後評価報告書に特記されているように、マウス ES 細胞から誘導した始原生殖細胞を試験管内で受精可能な卵子へと分化させることに成功し、さらに体外受精させたこの卵子の胚盤胞から ES 細胞を樹立することに成功している。すなわち雌の生殖系列サイクルを試験管内だけで再構築したこの研究成果は文字通りのブレイクスルーであり、極めて高く評価される。また、マウス精巣内における配偶子幹細胞の挙動に数理解析を導入して分析した結果、開放型ニッチで幹細胞が維持されているというモデルが成立すると示したことや、遺伝子解析の進んだショウジョウバエを下敷きに他の動物の解析に当たったこと、配偶子の試験管内形成に係わる培養技術の改良に真剣に取り組み成果を上げたことなども高い評価に値する。組織運営においては、審査・評価で指摘された事項の解決に向けて真摯に対応したことが見て取れる。あえて今後に向けて指摘するならば、計画研究を中心とする上記の優れた活動と、公募研究とがより強く有機的に連携できることが望ましかった。これからの展開が大いに期待できる公募研究もあり、原則2年の公募研究期間が制度的な縛りを掛けていないか、今後検討の余地があると思われる。