動物における配偶子産生システムの制御

領域番号 ： ３５０４

平成 25-29 年度
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
新学術領域研究（研究領域提案型）
研究成果報告書

令和元年 6 月

領域代表者　　小林　悟
筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授

はしがき

新学術領域研究「配偶子産生制御」は、「配偶子幹細胞制御機構」（領域代表：基礎生物学研究所・吉田松生 先生）における研究成果を発展させるとともに、新たな研究を取り込み、これまでにはなかった研究分野を創り出す意気込みで始まりました。本領域を立ち上げるための準備期間として約 1 年、領域の活動が終了して 1 年、そして５年間の領域活動を含め計 7 年間もの長きにわたり本領域に携わってきました。この期間、多くの研究者の方々と垣根なく真剣に議論し、研究を楽しみ、そして多くの研究成果を得ることができました。本領域に参加いただいた多くの研究者とその研究室のメンバー、領域運営や研究に関して叱咤激励いただいた評価委員の先生方、そして領域の円滑な運営にご尽力いただいた学術研究助成課および学術調査官の先生方に心より感謝致します。

本領域では、研究代表者や分担者が成果を発表する領域会議に加えて、実験に日々励んでいる学生や若手スタッフが発表する会議を毎年開催してきました。これら会議や懇親会の場では、それぞれの研究者を鼓舞する意見とともに、厳しい意見も飛び交いお互いに納得するまで議論を尽くしてきました。この議論から新たな研究の芽も生まれ、「型」にはまらない研究を実践出来たと思っています。議論に裏付けられた新しいチャレンジを始めることは、成果を常に求められている研究者にとって勇気がいることです。「できるかな？じゃあねえよ、やるんだよ」これが、本領域の研究のひとつの大きな柱になってきたと思います。その結果、本領域における新たな発見を基にして、次の新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」（領域代表：九州大学・林克彦 先生）が立ち上がったことは喜ばしいことです。配偶子は、生命を次の世代につなげる重要な役割を担っています。まさに、生殖細胞研究という生命を新しい世代の研究者に受け渡すことも、本領域の重要な使命であったと思います。何十年にもわたって我が国で培われてきたユニークな生殖細胞研究を絶やすことなく受け継ぎ、かつ独善的にならず海外も含め多くの研究者と議論し、ユニークさを核とした新たな研究を常にめざす姿勢こそが重要であると思います。

研究組織

【総括班】

領域代表・研究支援担当

小林　悟	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授

事務担当

小川毅彦	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

広報および研究支援担当

吉田松生	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授

広報担当

林　克彦	九州大学・医学研究院・教授

集会担当

松居靖久	東北大学・加齢医学研究所・教授
大保和之	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

若手サポート担当

吉崎悟朗	東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

女性・若手サポート担当

尾畑やよい	東京農業大学・生命科学部・教授

総括班評価者

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
今井　裕	京都大学・農学研究科・応用生物化学専攻・教授
岡野栄之	慶應義塾大学・医学部・教授
長濱嘉孝	基礎生物学研究所・名誉教授
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
山本正幸	基礎生物学研究所・所長

【計画研究】

研究項目 A01（配偶子産生システムの制御機構を知る）

代表者：小林　悟	（筑波大学・生存ダイナミクス研究センター）
分担者：向　正則	（甲南大学・理工学部）
代表者：松居靖久	（東北大学・加齢医学研究所）
分担者：酒井則良	（国立遺伝学研究所・小型魚類遺伝研究所）
代表者：吉田松生	（基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門）
分担者：大保和之	（横浜市立大学・大学院医学研究科）
原健士朗	（東北大学・農学研究科）
代表者：吉崎悟朗	（東京海洋大学・海洋科学技術研究科）

研究項目 A02（in vitro で配偶子産生を再現する）

代表者：林　克彦　（九州大学・医学研究院）
代表者：小川毅彦　（横浜市立大学・生命医科学研究科）
分担者：木村啓志　（東海大学・工学部）
代表者：尾畑やよい　（東京農業大学・生命科学部）
分担者：平尾雄二　（畜産草地研究所・畜産研究部門）

【公募研究】

２０１４～２０１５年度

研究項目 A01

小林一也　（弘前大学・農学生命科学部）
山元大輔　（東北大学・大学院生命科学研究科）
金井克晃　（東京大学・大学院農学生命科学研究科）
鈴木　敦　（横浜国立大学・工学研究院）
岩森督子　（九州大学・医学研究院）
中村　輝　（熊本大学・発生医学研究所）
加藤　譲　（国立遺伝学研究所・系統生物研究センター）
白江（倉林）麻貴　（名古屋大学・理学研究科）
鎌倉昌樹　（富山県立大学・工学部）

研究項目 A02

河村和宏　（聖マリアンナ医科大学・医学部）

２０１６～２０１７年度

研究項目 A01

小林一也　（弘前大学・農学生命科学部）
熊野　岳　（東北大学・生命科学研究科）
金井克晃　（東京大学・大学院農学生命科学研究科）
鈴木　敦　（横浜国立大学・工学研究院）
西島謙一　（名古屋大学・工学研究科）
林　利憲　（鳥取大学・医学部）
嶋　雄一　（川崎医科大学・解剖学教室）
石黒啓一郎　（熊本大学・発生医学研究所）
関　由行　（関西学院大学・理工学部）
加藤　譲　（国立遺伝学研究所・系統生物研究センター）
新美輝幸　（基礎生物学研究所・進化発生研究部門）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	関節経費	合計
平成 25 年度	257,500,000	77,250,000	334,750,000
平成 26 年度	224,300,000	67,290,000	291,590,000
平成 27 年度	230,100,000	69,030,000	299,130,000
平成 28 年度	235,900,000	70,770,000	306,670,000
平成 29 年度	235,800,000	70,740,000	306,540,000
平成 30 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
期間合計	1,186,600,000	355,980,000	1,542,580,000

研究発表

●計画研究１(小林班)

［原著論文（査読あり）］

S. Morita, R. Ota, and *S. Kobayashi: Downregulation of NHP2 promotes proper cyst formation in *Drosophila* ovary. ***Develop. Growth Differ***, 60, 5, 248-259 (2018)

Y. Ohhara, S. Kobayashi, K. Yamakawa-Kobayashi, and *N. Yamanaka: Adult-specific insulin-producing neurons in *Drosophila melanogaster*. ***Journal of Comparative Neurology***, 526, 8, 1351-1367 (2018)

S. Sugimori, Y. Kumata, and *S. Kobayashi: Maternal Nanos-dependent RNA stabilization in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***Dev Growth Differ,*** 60, 63-75. (2017)

*A. Gotoh, S. Shigenobu, K. Yamaguchi, S. Kobayashi, F. Ito and K. Tsuji: Transcriptome characterization of male accessory glands in ants to identify molecules involved in their reproductive success. ***Insect Molecular Biology***, 27, 212-220. (2017)

R. Ota, S. Morita, M. Sato, S. Shigenobu, M. Hayashi, and *S. Kobayashi: The transcripts immunoprecipitated with Sxl protein in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***Dev Growth Differ***, 59, 713-723. (2017)

*A. Gotoh, S. Shigenobu, K. Yamaguchi, S. Kobayashi, F. Ito and K. Tsuji: Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens. ***Sci Rep***, 7: 40056. (2017)

M. Tokue, K. Ikami, S. Mizuno, C. Takagi, A. Miyagi, R. Takada, C. Noda, Y. Kitadate, K. Hara, H. Mizuguchi, T. Sato, M. M. Taketo, F. Sugiyama, T. Ogawa, S. Kobayashi, N. Ueno, S. Takahashi, S. Takada and *S. Yoshida: SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/β-catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. ***Stem Cell Reports***, 8, 561-575. (2017)

Y. Ohhara, S. Kobayashi and *N. Yamanaka: Nutrient-Dependent Endocycling in Steroidogenic Tissue Dictates Timing of Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. ***PLOS Genetics***, 13-1, e1006583. (2017)

M. Hayashi, Y. Shinozuka, S. Shigenobu, M. Sato, M. Sugimoto, S. Ito, K. Abe and *S. Kobayashi: Conserved role of Ovo in germline development in mouse and *Drosophila*. ***Sci Rep***, 6, 40056. (2017)

QH. Chen, R. Takada, C. Noda, S. Kobayashi, *S. Takada: Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. ***Sci Rep***, 6, 35562. (2017)

T. Nishimura, T. Sato, Y. Yamamoto, I. Watakabe, Y. Ohkawa, M. Suyama, S. Kobayashi 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)

K. Ikami, M. Tokue, R. Sugimoto, C. Noda, S. Kobayashi, K. Hara and *S. Yoshida: Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. ***Development***, 142, 1582-1592. (2015)

Y. Ohhara, Y. Shimada-Niwa, R. Niwa, Y. Kayashima, Y. Hayashi, K. Akagi, H. Ueda, *K. Yamakawa-Kobayashi and *S. Kobayashi: Autocrine regulation of ecdysone synthesis by b3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 112, 1452-1457. (2015)

*M. Mukai, *S. Hira, K. Nakamura, S. Nakamura, H. Kimura, M. Sato and S. Kobayashi: H3K36 trimethylation-mediated epigenetic regulation is activated by Bam and promotes germ cell differentiation during early oogenesis in *Drosophila*. ***Biol Open***, 4, 119-124. (2014)

H. Chanut-Delalande, Y. Hashimoto, A. Pélissier-Monier, R. Spokony, A. Dib, T. Kondo, J. Bohère, K. Niimi, Y. Latapie, S. Inagaki, L. Dubois, P. Valenti, C. Polesello, S. Kobayashi, B. Moussian, K. White, S. Plaza, *Y. Kageyama and *F. Payre: Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. ***Nat Cell Biol***, 16, 1035-1044. (2014)

T. Nishimura, A. Herpin, T. Kimura, I. Hara, T. Kawasaki, S. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Saito, J. Yoshimura, S. Morishita, T. Tsukahara, S. Kobayashi, K. Naruse, S. Shigenobu, N. Sakai, M. Schartl and *M. Tanaka: Analysis of a novel gene, *Sdgc*, reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation, ***Development***, 141, 3363-3369. (2014)

M. Hayashi, M. Sato, Y. Iwasaki, T. Onozawa, N. Katayama, Y. Nagasaka, S. Sadaie, S. Kobayashi and *G. Yoshizaki: Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. ***Biol Reprod***, 91, 23. (2014)

R. SM Lim, A. Anand, C. Nishimiya-Fujisawa, S. Kobayashi and *T. Kai: Analysis of Hydra PIWI proteins

and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway. ***Dev Biol***, 386, 237-251 (2014)

S. Hira, T. Okamoto, M. Fujiwara, H. Kita, S. Kobayashi and *M. Mukai: Binding of *Drosophila* maternal Mamo protein to chromatin and specific DNA sequences. ***Biochem Biophys Res Commun***, 438, 156-160 (2013)

［学会発表］

S. Kobayashi: Germline formation by maternal factors in *Drosophila* embryos. ***47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists*** (Nagoya・Japan) (2014)

S. Morita and S. Kobayashi: Novel mechanism establishing transcriptional quiescence in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***Cold Spring Harbor Laboratory Meeting*** (New York・USA) (2016)

R. Ota and S. Kobayashi: The roles of *myc* and *Cyclin E* in quality control of the germline in *Drosophila*. ***Cold Spring Harbor Laboratory Meeting*** (New York・USA) (2016)

S. Kobayashi: Mechanisms underlying germline formation in *Drosophila* embryos. ***The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference*** (Osaka・Japan) (2017)

S. Kobayashi: Mechanisms of germline formation in *Drosophila* embryos. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

Y. Sakamaki, T. Fukumoto, D. Tanaka, M. Asaoka and S. Kobayashi: Cryopreservation of *Drosophila* primordial germ cells. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

Y. Hayashi, C. Noda, S. Kobayashi: The role of methionine metabolism during germline development in *Drosophila melanogaster*. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

S. Nakamura, S. Hira, T. Tuji, N. Miyagata, S. Kobayashi and M. Mukai: Combinatorial interplay between maternal epigenetic regulators and transcriptional activator OvoB activates *vasa* expression in primordial germ cells in *Drosophila*. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

S. Nakamura, N. Miyagata, S. Hira, S. Kobayashi and M. Mukai: Genetic interaction between the maternal chromatin regulator Mamo and material transcription factors enriched in primordial germ cells in *Drosophola*. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

R. Ota and S. Kobayashi: The roles of *myc* and *Cyclin E* in quality control of the germline in *Drosophila*. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

S. Morita, R. Ota and S. Kobayashi: Novel mechanism establishing transcriptional quiescence in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

M. Asaoka, K. Hanyu-Nakamura, A. Nakamura and S. Kobayashi: Nanos inhibits Importin-α2/Pendulin-dependent nuclear import to repress somatic gene expression in *Drosophila* germline. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

Y. Naito, G. Nagamatsu, N. Hamazaki, M. Hayashi, Y. Shinozuka, S. Kobayashi and K. Hayashi: The functional analysis of Ovol genes in lineage specification of mouse PGCs. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***（Fukuoka・Japan）(2017)

［分担著書］

浅岡美穂、小林悟: 丸善出版株式会社、動物の百科事典 (2018)、280-281

Y. Hayashi and S. Kobayashi: Springer, Reproductive and Developmental Strategies (2018), Regulatory mechanism of the germline stem cell niche in *Drosophila melanogaster*, 19-35

C. Nishimiya-Fujisawa and S. Kobayashi: Springer, Reproductive and Developmental Strategies (2018), Roles of germline stem cells and somatic multipotent stem cells in *Hydra* sexual reproduction, 123-155

●計画研究 2 (松居班)

［原著論文（査読あり）］

Y. An, T. Sekinaka, Y. Tando, D. Okamura, K. Tanaka, Y. Ito-Matsuoka, A. Takehara, N. Yaegashi, and *Y. Matsui: Derivation of pluripotent stem cells from nascent undifferentiated teratoma. ***Developmental Biology***, in press

K. Mochizuki, Y. Tando, T. Sekinaka, K. Otsuka, Y. Hayashi, H. Kobayashi, A. Kamio, Y. Ito-Matsuoka, A. Takehara, T. Kono, N. Osumi, and *Y. Matsui: SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling. ***Development***, 145, dev164160 (2018)

D. Tatsumi, Y. Hayashi, M. Endo, H. Kobayashi, T. Yoshioka, K. Kiso, S. Kanno, Y. Nakai, I. Maeda, K. Mochizuki, M. Tachibana, H. Koseki, A. Okuda, A. Yasui, K. Kono, and *Y. Matsui: DNMTs and SETDB1 function as co-repressors in MAX-mediated repression of germ cell–related genes in mouse embryonic stem cells. ***PLoS ONE***, 13, e0205969 (2018).

K. Otsuka, A. Takehara, N. Chiba, and *Y. Matsui: Identification of KLF9 and BCL3 as transcription factors that enhance reprogramming of primordial germ cells. ***PLoS ONE***, 13, e0205004 (2018).

K. Mochizuki, Y. Hayashi, T. Sekinaka, K. Otsuka, Y. Ito-Matsuoka, H. Kobayashi, S. Oki, A. Takehara, T. Kono, N. Osumi, and *Y. Matsui: Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination. ***Cell Reports***, 24, 2682–2693 (2018).

W. Gu, K. Mochizuki, K. Otsuka, R. Hamada, A. Takehara, and *Y. Matsui: Dnd1-mediated epigenetic control of teratoma formation in mouse. ***Biology Open***, 7, bio030106 (2018).

Y. Hayashi, K. Otsuka, M. Ebina, K. Igarashi, A. Takehara, M. Matsumoto, A. Kanai, K. Igarashi, T. Soga, and *Y. Matsui: 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).

N. Aoki, K. Mochizuki, and *Y. Matsui: DNA Methylation of the *Fthl17* 5'-Upstream Region Regulates Differential *Fthl17* Expression in Lung Cancer Cells and Germline Stem Cells. ***PLoS ONE***, 12, e0172219 (2017).

T. Sekinaka, Y. Hayashi, T. Noce, H. Niwa, and *Y. Matsui: Selective de-repression of germ cell-specific genes in mouse embryonic fibroblasts in a permissive epigenetic environment. ***Scientific Reports***, 6:32932 (2016).

*Y. Matsui, A. Takehara, Y. Tokitake, M. Ikeda, Y. Obara, Y. Morita-Fujimura, T. Kimura, and T. Nakano: The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. ***Development***, 141, 4457-4467 (2014).

*H.G. Leitch, D. Okamura, G. Durcova-Hills, C.L. Stewart, R.L. Gardner, Y. Matsui, and V.E. Papaioannou: On the fate of primordial germ cells injected into early mouse embryos. ***Developmental Biology***, 385, 155-159 (2013)

I.Maeda, D. Okamura, Y. Tokitake, M. Ikeda, H. Kawaguchi, N. Mise, K. Abe, T. Noce, A. Okuda, and *Y. Matsui: Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. ***Nature Communications***, 4, 1754 (2013).

T. Nishimura, K. Yamada, C. Fujimori, M. Kikuchi, T. Kawasaki, K. R. Siegfried, N. Sakai and *M. Tanaka: Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. ***PLoS Genetics*** 14, e1007259 (2018).

T. Kawasaki, A. Maeno, T. Shiroishi and *N. Sakai: Development and growth of organs in living whole embryo and larval grafts in zebrafish. ***Scientific Reports*** 7, 16508 (2017).

S. Higaki, M. Shimada, K. Kawamoto, T. Todo, T. Kawasaki, I. Tooyama, Y. Fujioka, N. Sakai and *T. Takada: In vitro differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). ***Scientific Reports*** 7, 42852 (2017).

T. Kawasaki and *N. Sakai: Allogeneic transplantation of testicular hyperplasia in *rag1* mutant zebrafish. ***Bio-protocol*** 6(21): e1992 (2016).

T. Kawasaki, K. R. Siegfried and *N. Sakai: Differentiation of zebrafish spermatogonial stem cells to functional sperm in culture. ***Development*** 143, 566-574 (2016).

T. Nishimura, A. Herpin, T. Kimura, I. Hara, T. Kawasaki, S. Nakamura, Y. Yamamoto, T. L. Saito, J. Yoshimura, S. Morishita, T. Tsukahara, S. Kobayashi, K. Naruse, S. Shigenobu, N. Sakai, M. Schartl and *M. Tanaka: Analysis of a novel gene, *Sdgc,* reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation. ***Development*** 141, 3363-3369 (2014).

K. Saito, C. Sakai, T. Kawasaki and *N. Sakai: Telomere distribution pattern and synapsis initiation during spermatogenesis in zebrafish. ***Developmental Dynamics*** 243, 1448-1456 (2014).

S. Higaki, Y. Koyama, M. Shimada, I. Toyoyama, Y. Fujioka, N. Sakai, T. Ikeuchi and *T. Takada: Hormone response of Sertoli cell line endogenously expressing nuclear receptors in endemic cyprinid *Gnathopogon caerulescens*. **General Comparative Endocrinology** 191, 65-73 (2013).

M. Shinya, K. Kobayashi, A. Masuda, M. Tokumoto, Y. Ozaki, K. Saito, T. Kawasaki, Y. Sado and *N. Sakai: Properties of gene knockdown system by vector-based siRNA in zebrafish. ***Development Growth and Differentiation*** 55, 755-765 (2013).

［総説］

林　陽平：始原生殖細胞の代謝特性変換は分化、再プログラム化を制御する、*実験医学* 35, 3248-3250 (2017)

松居靖久：始原生殖細胞の分化と多能性幹細胞への再プログラム化のメカニズム、*生化学* 86, 726-734 (2014).

Y. Hayashi, and Y. Matsui. Metabolomic and Proteomic Analyses of Mouse Primordial Germ Cells. ***Methods in Molecular Biology***, Humana Press (2018). doi: 10.1007/7651_2018_164.

Y. Matsui, and K. Mochizuki. A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. ***Molecular Reproduction and Development***, 81, 160-170 (2014).

［学会発表］

Y. An, and Y. Matsui: Establishing pluripotential stem cell lines from undifferentiated cells in the newborn *Dnd1* mutant testis. ***51th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (Joint Annual Meeting of JSDB and JSCB)*** (Tokyo・Japan)(2018)

N. Aoki, K. Mochizuki, and Y. Matsui: *Fthl17* gene expression level is regulated by DNA methylation state of its 5'-upstream region in cancer cells and germline stem cells. 1***8th International Congress of Developmental Biology*** (Singapore) (2017)

K. Otsuka, A. Takehara, and Y. Matsui: Identification of genes regulating PGC reprogramming into pluripotent stem cells. ***50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.*** (Tokyo・Japan)(2017)

K. Mochizuki, H. Yokoyama, and Y. Matsui: An RNAi screen for histone modifier genes involved in development of primordial germ cells in mice. ***KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, 'Chromatin and Epigenetics*** (British Columbia, Canada)(2016)

林陽平、蝦名真行、五十嵐香織、大塚　慧、竹原雅子花、松本光代、五十嵐和彦、金井昭夫、曽我朋義、松居靖久：マルチオミックス解析を通したマウス始原生殖細胞の代謝特性の解析、第３９回日本分子生物学会年会（横浜市 神奈川県）(2016)

N. Sakai: Regulation of the ribosome by the germ granule component Moto for initiation of the meiotic program. ***50th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction*** (Washington DC, USA) (2017)

N. Sakai: Collection of Transgenic lines expressing Gal4 in a testis from transposon-mediated gene trap zebrafish. ***49th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction*** (San Diego, USA) (2016)

N. Sakai, T. Kawasaki: Differentiation of zebrafish spermatogonial stem cells to functional sperm in culture. ***48th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction*** (San Juan, Puerto Rico) (2015)

N. Sakai, T. Kawasaki: In vitro differentiation of spermatogonial stem cells to functional sperm in zebrafish. ***World Congress of Reproductive Biology 2014*** (Edinburgh, UK) (2014)

N. Sakai: Culture of male germ cells: toward a germ cell-mediated gene transfer system in zebrafish. ***MIT Nancy Hopkins Reunion Symposium*** (Cambridge, USA) (2013)

［図書・分担著書］

酒井則良:　悠書館、遺伝子が語る生命 38 億年の謎（国立遺伝学研究所編）第 19 章　生殖系幹細胞の謎　(2014)　206-218

●計画研究 3 (吉田班)

［原著論文（査読あり)］

T. Shinozuka, R. Takada, S. Yoshida, S. Yonemura, and *S. Takada: Wnt produced by stretched roof-plate cells is required for promotion of cell proliferation around the central canal of the spinal cord. ***Development,*** (2018) in press

Y. Kitadate, D. J. Jorg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, *B. D. Simons, and *S. Yoshida: Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. ***Cell***

Stem Cell, 24, 79-92 (2018)
S. Sakamoto, D. Thumkeo, H. Ohta, Z. Zhang, S. R. Huang, P. Kanchenawong, T. Fuu, S. Watanabe, K. Shimada, Y. Fujihara, S. Yoshida, M. Ikawa, N. Watanabe, M. Saitou, and S. Narumiya: mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. ***Plos Biology***, 16, e2004874 (2018)
H. H. Shawki, H. Oishi, T. Usui, Y. Kitadate, W. A. Basha, A. M. Abdellatif, K. Hasegawa, R. Okada, K. Mochida, H. A. El-Shemy, M. Muratani, A. Ogura, S. Yoshida, and S. Takahashi: MAFB is dispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice. ***Plos One***, 13, e0190800 (2018)
M. Tokue, K. Ikami, S. Mizuno, C. Takagi, A. Miyagi, R. Takada, C. Noda, Y. Kitadate, K. Hara, H. Mizuguchi, T. Sato, M. M. Taketo, F. Sugiyama, T. Ogawa, S. Kobayashi, N. Ueno, S. Takahashi, S. Takada, and *S. Yoshida: SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/beta-Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. ***Stem Cell Reports***, 8, 561-575 (2017)
K. Ikami, M. Tokue, R. Sugimoto, C. Noda, S. Kobayashi, K. Hara, and *S. Yoshida: Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. ***Development***, 142, 1582-1592 (2015)
K. Ikegami, Y. Atsumi, E. Yorinaga, H. Ono, I. Murayama, Y. Nakane, W. Ota, N. Arai, A. Tega, M. Iigo, V. M. Darras, K. Tsutsui, Y. Hayashi, S. Yoshida, and T. Yoshimura: Low temperature-induced circulating triiodothyronine accelerates seasonal testicular regression. ***Endocrinology***, 156, 647-659 (2015)
K. Hara, T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, *B. D. Simons, and *S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. ***Cell Stem Cell***, 14, 658-672 (2014)
T. Shirakawa, R. Yaman-Deveci, S. Tomizawa, Y. Kamizato, K. Nakajima, H. Sone, Y. Sato, J. Sharif, A. Yamashita, Y. Takada-Horisawa, S. Yoshida, K. Ura, M. Muto, H. Koseki, T. Suda, and *K. Ohbo: An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. ***Development***, 140, 3565-3576 (2013)
*SI. Tomizawa, Y. Kobayashi, T. Shirakawa, K. Watanabe, K. Mizoguchi, I. Hoshi, K. Nakajima, J. Nakabayashi, S. Singh, A. Dahl, D. Alexopoulou, M. Seki, Y. Suzuki, H. Royo, AHFM. Peters, K. Anastassiadis, AF. Stewart and *K. Ohbo: Kmt2 conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in mouse spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters. ***Development***, 145, pii: dev169102 (2018)
A. Kurita-Suzuki, Y. Kamo, C. Uchida, K. Tanemura, K. Hara, and *T. Uchida: Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. ***Biochem Biophys Res Commun***, 497, 388-393 (2018)
K. Umezu, Y. Hiradate, T. Numabe, K. Hara, and *K. Tanemura: Effects on glycocalyx structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation. ***Journal of Reprodution and Development***, 63, 473-480 (2017)
N. Kobayashi, H. Okae, H. Hiura, H. Chiba, Y. Shirakata, K. Hara, K. Tanemura, and *T. Arima: Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. ***PLoS One***, 11, e0167127 (2016)
K. Umezu, Y. Hiradate, T. Oikawa, H. Ishiguro, T. Numabe, K. Hara, and *K. Tanemura: Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. ***Journal of Reproduction and Development***, 62, 409-14 (2016)

［総説］
S. Yoshida: Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells. ***Development, Growth and Differentiation***, (2018) in press
S. Yoshida: Chapter 12: Regulatory mechanism of spermatogenic stem cells in mice: their dynamic and context-dependent behavior. Chapter 4 in Reproductive and Developmental Strategies, ed. K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, and M. Kondo, ***Springer Japan KK***, part of Springer Nature 47-67 (2018)
S. Yoshida: From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis ***WIREs Developmental Biology***, 5, 119-131 (2016)
吉田松生：精子幹細胞と精巣の開放型ニッチ　*特集「幹細胞の恒常性維持とその破綻」月刊細胞* 6 月号, 15-18, Vol.50 No.7 (2018)
吉田松生：生殖細胞：それは次の世代に命をつなげるバトン　*特集「発生－卵から始まる生き*

物の形づくり」国立科学博物館 milsil 56 号, 13-14, 3 月 1 日発行 (2017)

吉田松生：マウス精子幹細胞の動態からニッチの本質を考える *「幹細胞ニッチが見えてきた！ Stem Cell を守り、育てる微小環境」実験医学* vol.32 No.16, 2567-2573 (2014)

S. Tomizawa, T. Shirakawa and *K. Ohbo: Stem cell epigenetics: Insights from studies on embryonic, induced pluripotent, and germline stem cells. ***Curr Pathobiol Rep***, 2, 1-9 (2014)

*K. Ohbo, and S. Tomizawa: Epigenetic regulation in stem cell development, cell fate conversion, and reprogramming. ***Biomolecular Concepts***, 6, 1-9 (2015)

［学会発表］

S. Yoshida: Population dynamics of motile spermatogenic stem cells in vivo. ***2019 Keystone Symposia on Single Cell Biology*** (Breckenridge・USA) (2019) 招待講演

S. Yoshida: Towards a Better Understanding of Spermatogenic Stem Cells. ***The Society for the Study of Reproduction 51st Annual Conference in New Orleans*** (New Orleans・USA) (2018) 招待講演

S. Yoshida: Sperm stem cells: their context-dependent behavior. ***ISSCR 2018－The International Society of Stem Cell Research Annual Meeting*** (Melbourne・Australia) (2018) 招待講演

S. Yoshida: For a better understanding of spermatogenic stem cell dynamics over time. ***11th NYRA Meeting, preceding the 20th European Testis Workshop (European Workshop on the Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis)*** (Lisboa・Portugal) (2018) 招待講演

S. Yoshida: Dynamical regulation of spermatogenic stem cells in homeostasis and after transplantation. ***CDB Symposium 2018 "Dynamic Homeostasis From Development to Aging"*** (Kobe・Japan) (2018) 招待講演/オーガナイザー

S. Yoshida: Dynamics of Spermatogenic Stem Cells in the Open Niche Environment. ***"Germinal Stem Cell Biology" Gordon Research Conference*** (Hong Kong・China) (2017) 招待講演

S. Yoshida: Density regulation of spermatogenic stem cells by FGFs in the mouse seminiferous tubules. ***Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*** (New York・USA) (2016) 招待講演

S. Yoshida: Density regulation of spermatogenic stem cells in the mouse testis. ***The Stem Cell Niche - Development and Disease*** (Copenhagen・Denmark) (2016)招待講演

S. Yoshida: Single-cell resolution analysis of mouse spermatogenic stem cell dynamics, ***Wellcome Trust Advanced Courses and Scientific Conferences "Single Cell Biology"*** (Hinxton・UK) (2016)

S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells: their in vivo identity and dynamics. ***EMBL Conference on Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine 2014*** (Heidelberg・Germany) (2014) 招待講演

S. Tomizawa, Y. Kobayashi, T. Shirakawa, I. Hoshi, K. Nakajima, H. Royo, A. HFM. Peters, K. Anastassiadis, AF. Stewart and K. Ohbo: Kmt2b is required for spermatogenesis through both bivalent and monovalent priming of the spermatogonial stem cell epigenome. ***EMBO Conference, Nuclear structure and dynamics*** (L'Isle sur la Sorgue・France) (2017)

S. Tomizawa, Y. Kobayashi, T. Shirakawa, A. HFM. Peters, K. Anastassiadis, AF. Stewart and K. Ohbo: Kmt2b regulates spermatogonial stem cell differentiation and marks primed genes for developmental potential. ***EMBO Conference, From Functional Genomics to Systems Biology*** (Heidelberg・Germany) (2016)

S. Tomizawa, T. Shirakawa, A. Dahl, D. Alexopoulou, K. Anastassiadis, AF. Stewart and K. Ohbo: Role of histone methyltransferase Mll2 for male germ cell development. ***Keystone Symposia, Transcriptional and Epigenetic Influences on Stem Cell State.*** (Steamboat Springs・USA) (2015)

K Hara: Spermatogonial motion dynamics in mouse testis. ***The International Research symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Hakata･Japan) (2017)

K. Hara: Diffusive motion dynamics of sperm stem cells in mouse testis. ***Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017*** (Ginowan･Japan) (2017)

K. Hara: Diffusive motion dynamics of spermatogenic stem cells in mouse testis. ***Cold Spring Harbor Laboratory meeting "Germ Cells"*** (New York・USA) (2018)

［図書・分担著書］

原健士朗：羊土社、実験医学 2 月号 (2016)、444-445

●計画研究 4 (吉崎班)

［原著論文（査読あり）］

M. Hayashi, D. Sakuma, and *G. Yoshizaki: Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. ***Molecular Reproduction and Development***, 85, 155-162 (2018)

*G. Yoshizaki, and S. Lee: Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. ***Stem Cell Research***, 29, 103-110 (2018)

M. Sato, M. Hayashi, and *G. Yoshizaki: Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout. ***Biology of Reproduction***, 96, 1303-1316 (2017)

Q. Li, W. Fujii, K. Naito, and *G. Yoshizaki: Application of dead end-knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation. ***Molecular Reproduction and Development***, 84, 1100-1111 (2017)

B. Falahatkar, S. Poursaeid, R. Kitada, and *G. Yoshizaki: Hypothermic storage of isolated spermatogonia and oogonia from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). ***Cryobiology***, 76, 125-128 (2017)

S. Lee, N. Katayama, and *G. Yoshizaki: Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 478, 1478-1483 (2016)

*G. Yoshizaki, K. Takashiba, S. Shimamori, K. Fujinuma, S. Shikina, T. Okutsu, S. Kume, and M. Hayashi: Production of germ cell - deficient salmonids by dead end gene knockdown, and their use as recipients for germ cell transplantation. ***Molecular Reproduction and Development***, 83, 298-311 (2016)

*S. Lee, and G. Yoshizaki: Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (Brachymystax lenok). ***Cryobiology***, 72, 165-168 (2016)

N. Katayama, S. Kume, S. Hattori-Ihara, S. Sadaie, M. Hayashi, and *G. Yoshizaki: Germ Cell-Specific Excision of loxP-flanked Transgenes in Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss. ***Biology of Reproduction***, 94, 79 (2016)

S. Lee, Y. Iwasaki, and *G. Yoshizaki: Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. ***Cryobiology,*** 73, 286-290 (2016)

T. Okutsu, S. Shikina, T. Sakamoto, M. Mochizuki, and *G. Yoshizaki: Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. ***Aquaculture***, 446, 298-302 (2015)

S. Lee, S. Seki, N. Katayama, and *G. Yoshizaki: Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. ***Scientific Reports***, 5, 16045 (2015)

S. Nakajima, M. Hayashi T. Kouguchi, K. Yamaguchi , M. Miwa , and *G. Yoshizaki: Expression patterns of gdnf and gfrα1 in rainbow trout testis. ***Gene Expression Patterns***, 14, 111-120 (2014)

M. Sato, T. Morita, N. Katayama, and *G. Yoshizaki: Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation. ***Aquaculture***, 422-423, 218-224 (2014)

M. Hayashi, M. Sato, Y. Nagasaka, S. Sadaie, S. Kobayashi, and *G. Yoshizaki: Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost. ***Biology of Reproduction***, 91, 23 (2014)

S. Kume, N. Katayama, K. Ichida, S. Hattori-Ihara, K. Nagasawa, and *G. Yoshizaki: Transgene manipulation in rainbow trout using Cre recombinase. ***Fisheries Science***, 80, 767-773 (2014)

R. Farlora, S. Hattori-Ihara, Y. Takeuchi, M. Hayashi, A. Octavera, Alimuddin, and *G. Yoshizaki: Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia Oreochromis niloticus. ***Marine Biotechnology***, 16, 309-320 (2014)

W. Makkapan, G. Yoshizaki, M. Tashiro, and *W. Chotigeat: Expression profile of ribosomal protein L10a throughout gonadal development in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). ***Fish Physiology and Biochemistry***, 40, 1069-1081 (2014)

S. M. S. N. Lacerda, G. M. J. Costa, P. H. A. Campos-Junior, T. M. Segatelli, R. Yazawa, Y. Takeuchi, T. Morita , G. Yoshizaki, and *L. R. França: Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. ***Fish Physiology and Biochemistry*** , 39 , 3-11 (2013)

S. Shikina, K. Nagasawa, M. Hayashi, M. Furuya, Y. Iwasaki, and *G. Yoshizaki: Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). ***Molecular Reproduction and Development***, 80, 763-773 (2013)

K. Nagasawa, JM. Fernandes, G. Yoshizaki, M. Miwa, and I. Babiak: Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, Salmo salar: characterization of vasa, dead end, and lymphocyte antigen 75 genes. ***Molecular Reproduction and Development***, 80, 118-131 (2013)

［学会発表］

G. Yoshizaki: Development of germ cell manipulation technology in fish. ***11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (ISRPF)*** (Manaus・Brazil) (2018)

G. Yoshizaki: Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. ***The 50th anniversary meeting of Society for the Study of Reproduction (SSR)*** (Washington DC・USA) (2017)

G. Yoshizaki: Transplantation of salmon germ cells into rainbow trout recipients:can iteroparous trout repeatedly produce gametes derived from semelparous salmon? ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・JAPAN) (2017)
G. Yoshizaki: Production of viable trout offspring derived from germ cells cultured in vitro. ***The 11th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC)2017*** (Hawaii・USA) (2017)
G. Yoshizaki: Germ cell manipulation in fish. ***19th European Testis Workshop*** (Saint-Malo・France) (2016)
G. Yoshizaki: Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. ***The 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes*** (Ancona・Italy) (2015)
G. Yoshizaki: Transplantation of salmon germ cells intro rainbow trout recipients: can iteroparous trout repeatedly produce gametes derived from semelparous salmon? ***10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*** (Olhão・Portuguese Republic) (2014)

［図書・分担著書］
大久保範聡、吉崎悟朗、越田澄人：恒星社厚生閣、魚類発生学の基礎「第 1 章　序論」(2018)、1-4
吉崎悟朗、矢澤良輔、竹内裕：恒星社厚生閣、魚類発生学の基礎「第 15 章　発生工学」(2018)、179-189
G. Yoshizaki: Elsevier, Encyclopedia of Reproduction「Germ cell transplantation in fish」 (2018), 764 - 768
片山 直人、壁谷 尚樹、竹内 裕、矢澤 良輔、吉崎 悟朗：東北大学出版会、水産遺伝育種学「第 12 章　遺伝子・細胞操作と水産育種における応用」(2017)、215-227
林 誠、市田 健介、吉崎 悟朗：羊土社、ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A「Q95 魚類（サケ・マス類,マグロ類,ゼブラフィッシュやメダカなど）から調製した細胞のフローサイトメトリー解析やソーティングは可能でしょうか？」(2017)、288-290
吉崎 悟朗：岩波書店、サバからマグロが産まれる!? (2014)、126

●計画研究 5 (林班)
［原著論文（査読あり）］
H. Miyauchi, H. Ohta, S. Nagaoka, F. Nakaki, K. Sasaki, K. Hayashi, Y. Yabuta, T. Nakamura, T. Yamamoto, and *M. Saitou: Bone morphogenetic protein and retinoic acid synergistically specify female germ-cell fate in mice. ***EMBO Journal***, 36, 3100-3119 (2017)
*K. Hayashi, O. Hikabe, Y. Obata, and Y. Hirao: Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. ***Nature Protocols***, 12, 1733-1744 (2017)
N. Hamazaki, K. Nakashima, K. Hayashi, and *T. Imamura: Detection of Bidirectional Promoter-Derived lncRNAs from Small-Scale Samples Using Pre-Amplification-Free Directional RNA-seq Method. ***Methods in Molecular Biology***, 1605, 83-103 (2017)
M. Endoh, T. A. Endo, J. Shinga, K. Hayashi, A. Farcas, K. W. Ma, S. Ito, J. Sharif, T. Endoh, N. Onaga, M. Nakayama, T. Ishikura, O. Masui, B. M. Kessler, T. Suda, O. Ohara, A. Okuda, R. Klose, and *H. Koseki: PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. ***Elife***, 6 (2017)
H. Toh, K. Shirane, F. Miura, N. Kubo, K. Ichiyanagi, K. Hayashi, M. Saitou, M. Suyama, T. Ito, and *H. Sasaki: Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. ***BMC Genomics***, 18, 31 (2017)
Y. Ishikura, Y. Yabuta, H. Ohta, K. Hayashi, T. Nakamura, I. Okamoto, T. Yamamoto, K. Kurimoto, K. Shirane, H. Sasaki, and *M. Saitou: In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. ***Cell Reports***, 17, 2789-2804 (2016)
O. Hikabe, N. Hamazaki, G. Nagamatsu, Y. Obata, Y. Hirao, N. Hamada, S. Shimamoto, T. Imamura, K. Nakashima, M. Saitou, and *K. Hayashi: Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. ***Nature,*** 539, 299-303 (2016)
K. Shirane, K. Kurimoto, Y. Yabuta, M. Yamaji, J. Satoh, S. Ito , A. Watanabe, K. Hayashi, *M. Saitou, and *H. Sasaki: Global Landscape and Regulatory Principles of DNA Methylation Reprogramming for Germ Cell Specification by Mouse Pluripotent Stem Cells. ***Developmental Cell***, 39, 87-103 (2016)
K. Morohaku, R. Tanimoto, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K. Hayashi, *Y. Hirao, and *Y. Obata: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 113, 9021-9026 (2016)
J. Saragusty, S. Diecke, M. Drukker, B. Durrant, I. Friedrich Ben-Nun, C. Galli, F. Göritz, K. Hayashi, R. Hermes, S. Holtze, S. Johnson, G. Lazzari, P. Loi, J. F. Loring, K. Okita, M. B. Renfree, S. Seet, T. Voracek, J. Stejskal, *O. A. Ryder, and *T. B. Hildebrandt: Rewinding the process of mammalian

extinction. ***Zoo Biology***, 35, 280-292 (2016)

K. Kurimoto, Y. Yabuta, K. Hayashi, H. Ohta, H. Kiyonari, T. Mitani, Y. Moritoki, K. Kohri, H. Kimura, T. Yamamoto, Y. Katou, K. Shirahige, and *M. Saitou: Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. ***Cell Stem Cell***, **16, 517-532** (2015)

*T. Kimura, Y. Kaga, H. Ohta, M. Odamoto, Y. Sekita, K. Li, N. Yamano, K. Fujikawa, A. Isotani, N. Sasaki, M. Toyoda, K. Hayashi, M. Okabe, T. Shinohara, M. Saitou, and T. Nakano: Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition. ***Stem Cells***, 32, 2668-2678 (2014)

S. Aramaki, K. Hayashi, K. Kurimoto, H. Ohta, Y. Yabuta, H. Iwanari, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Kato, K. Shirahige, and *M. Saitou: A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. ***Developmental Cell***, 27, 516-529 (2013)

*R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, and *D. Kitamura: DNase γ is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. ***PLoS One***, 8, e80223 (2013)

B. Payer, M. Rosenberg, M. Yamaji, Y. Yabuta, M. Koyanagi-Aoi, K. Hayashi, S. Yamanaka, M. Saitou, and *J. T. Lee: Tsix RNA and the germline factor, PRDM14, link X reactivation and stem cell reprogramming. ***Molecular Cell,*** 52, 805-818 (2013)

*K. Hayashi and *M. Saitou: Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. ***Methods in Molecular Biology,*** 1074, 175-183 (2013)

F. Nakaki, K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, Y. Yabuta, and *M. Saitou: Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. ***Nature***, 501, 222-226 (2013)

*K. Hayashi and *M. Saitou: Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. ***Nature Protocols***, 8, 1513-15124 (2013)

［総説］

*G. Nagamatsu and *K. Hayashi: Stem cells, in vitro gametogenesis and male fertility. ***Reproduction***, 154, F79-F91 (2017)

F. Esfandiari, O. Mashinchian, M. K. Ashtiani, M. H. Ghanian, K. Hayashi, A. A. Saei, M. Mahmoudi, and *H. Baharvand: Possibilities in Germ Cell Research: An Engineering Insight. ***Trends in Biotechnology***, 33, 735-746 (2015)

*K. Hayashi and M. Saitou: Perspectives of germ cell development in vitro in mammals. ***Animal Science Journal***, 85, 617-626 (2014)

［学会発表］

林克彦：生殖細胞系列の体外培養による再構築　第 25 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム（大津市 滋賀県）（2013）

K. Hayashi: Functional eggs created in a dish from mouse pluripotent stem cells. ***ISSCR*** (Boston・USA) (2017)

K. Hayashi: Understanding of PGC-oocyte differentiation using in vitro reconstitution system. ***World Congress of Reproductive Biology*** (Okinawa・Japan) (2017)

K. Hayashi: Derivation of Gem Cells from Stem Cells. ***The International Federation Fertility Societies 22nd World Congress*** (Delhi・India) (2016)

K. Hayashi: Artificial Gametes Derived from Pluripotent Stem Cells. ***The 17th AAAP ANIMAL Science Congress*** (Fukuoka・Japan) (2016)

林克彦：Reconstitution of mouse oogenesis in vitro 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸市　兵庫県）(2015)

K. Hayashi: Derivation of Germ Cells from Stem Cells. ***International Society for In Vitro Fertilization*** (Copenhagen・Denmark) (2015)

K. Hayashi: Reconstitution of female germ line in a dish. ***Gordon Research Conference (Fertilization & Activation of Development)*** (Holderness・USA) (2015)

K. Hayashi: Generation of Eggs from Mouse Embryonic Stem Cells. ***Society of Reproduction and Fertility*** (Edingborough・UK) (2015)

K. Hayashi: Understanding of germ cell development by in vitro reconstitution. ***The Whitehead Meeting on Genetic Studies of Reproductive Disorders*** (Boston・USA)　(2013)

［図書・分担著書］

K. Hayashi: Academic Press, Encyclopedia of Reproduction 2nd Edition (2018), 225-231

●計画研究 6 (小川班)

［原著論文（査読あり）］

K. Kojima, H. Nakamura, M. Komeya, H. Yamanaka, Y. Makino, Y. Okada, H. Akiyama, N. Torikai, T. Sato, T. Fujii, H. Kimura, *T. Ogawa: Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ-spreading. ***Biotechnol Bioeng***, 115, 3030-3041 (2018)

H. Kimura, M. Nishikawa, N. Yanagawa, H. Nakamura, S. Miyamoto, M. Hamon, P. Hauser, L. Zhao, O. D. Jo, M. Komeya, T. Ogawa, N. Yanagawa: Effect of fluid shear stress on in vitro cultured ureteric bud cells. ***Biomicrofluidics***, 12, 044107 (2018)

H. Yamanaka, M. Komeya, H. Nakamura, H. Sanjo, T. Sato, M. Yao, *H. Kimura, * T. Fujii, *T. Ogawa: A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. ***Biochem Biophys Res Commun***, 500: 885-891 (2018)

H. Fukunaga, K. Kaminaga, T. Sato, N. Usami, R. Watanabe, K.T. Butterworth, T. Ogawa, A. Yokoya, *K.M. Prise: Application of an Ex Vivo Tissue Model to Investigate Radiobiological Effects on Spermatogenesis. ***Radiat Res***, 189, 661-667 (2018)

H. Sanjo, M. Komeya, T. Sato, T. Abe, K. Katagiri, H. Yamanaka, Y. Ino, N. Arakawa, H. Hirano, T. Yao, Y. Asayama, A. Matsuhisa, M. Yao, *T. Ogawa: *In vitro* mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. ***PLoS One***, 13, e0192884 (2018)

M. Komeya, K. Hayashi, H. Nakamura, H. Yamanaka, H. Sanjo, K. Kojima, T. Sato, M. Yao, H. Kimura, T. Fujii, *T. Ogawa: Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. ***Sci Rep***, 7: 15459 (2017)

R. Nakajima, T. Sato, T. Ogawa, H. Okano, *T. Noce: A noncoding RNA containing a SINE-B1 motif associates with meiotic metaphase chromatin and has an indispensable function during spermatogenesis. ***PLoS One***, 12, e0179585 (2017)

N. Nakamura, G.E. Merry, A.L. Inselman, D.T. Sloper, P.L. Del Valle, T.Sato, T. Ogawa, *D.K. Hansen: Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. ***Birth Defects Res***, 109, 465-474 (2017)

M. Tokue, K. Ikami, S. Mizuno, C. Takagi, A. Miyagi, R. Takada, C. Noda, Y. Kitadate, K. Hara, H. Mizuguchi, T. Sato, M.M. Taketo, F. Sugiyama, T. Ogawa, S. Kobayashi, N. Ueno, S. Takahashi, S. Takada, *S. Yoshida: SHISA6 Confers Resistance to Differentiation- Promoting Wnt/β-Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. ***Stem Cell Reports***, 8, 561-575 (2017)

K. Kojima, T. Sato, Y. Naruse, *T. Ogawa: Spermatogenesis in Explanted Fetal Mouse Testis Tissues. ***Biol Reprod***, 95, 63 (2016)

M. Komeya, H. Kimura, H. Nakamura, T. Yokonishi, T. Sato, K. Kojima, K. Hayashi, K. Katagiri, H. Yamanaka, H. Sanjo, M. Yao, S. Kamimura, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Fujii, *T. Ogawa: Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. ***Sci Rep***, 6, 21472 (2016)

T. Sato, K. Katagiri, K. Kojima, M. Komeya, M. Yao, *T. Ogawa: *In Vitro* Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. ***PLoS One***, 10, e0130171 (2015)

* T. Sato, T. Sakuma, T. Yokonishi, K. Katagiri, S. Kamimura, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Yamamoto, *T. Ogawa: Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. ***Stem Cell Reports***, 5, 75-82 (2015)

T. Yokonishi, T. Sato, M. Komeya, K, Katagiri, Y. Kubota, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, *T. Ogawa.: Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. ***Nat Commun***, 5, 4320 (2014)

T. Sato, K. Katagiri, Y. Kubota, *T. Ogawa: *In vitro* sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. ***Nat Protoc***, 8, 2098-2104 (2013)

T. Yokonishi, T. Sato, K. Katagiri, M. Komeya, Y. Kubota, *T. Ogawa: *In Vitro* Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. ***Biol Reprod***, 89: 15, 1-6 (2013)

［総説］

M. Komeya, T. Sato, *T. Ogawa.: In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. ***Reprod Med Biol***, 17, 407-420 (2018)

H. Fukunaga, K.T. Butterworth, A. Yokoya, T. Ogawa, *Prise KM: Low-dose radiation-induced risk in spermatogenesis. ***Int J Radiat Biol***, 93, 1291-1298 (2017)

T. Yokonishi, *T. Ogawa: Cryopreservation of testis tissue and in vitro spermatogenesis. ***Reprod Med Biol***, 15, 21-28 (2016)

M. Komeya, *T. Ogawa.: Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. ***Asian J Androl***, 17, 771-775 (2015)

［学会発表］

T Ogawa; "Production of Gamete in Testis Organ Culture" ***Germinal Stem Cell Biology Gordon Research Conference.*** (Hong Kong・China) (2017)

T Ogawa: "*In vitro* Spermatogenesis with Refined Organ Culture Methods" ***49th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (SSR), Focus Session 4. Gametogenesis In Vivo and In Vitro.*** (San Diego・USA) (2016)

T Ogawa: "*In vitro* spermatogenesis with organ culture methods" ***72nd American Society for Reproductive Medicine 2016 Scientific Congress*** (Salt Lake City・USA) (2016)

T Ogawa: "*In Vitro* Spermatogenesis with Refined Organ Culture Methods" ***2016 NICHD-ASRM workshop*** (Salt Lake City・USA) (2016)

T Ogawa: Keynote Lecture "*In Vitro* Spermatogenesis using Organ Culture Systems" ***IFFS/JSRM*** (Yokohama・Japan) (2015)

［図書・分担著書］

T. Ogawa: *In vitro* differentiation of Spermatogonia, Chapter 13 in "The Biology of Mammalian Spermatogonia", edited by Jon Oatley & Mike Griswold. Springer (2017), 301-312

T. Ogawa: In vitro production of functional sperm from neonatal mouse testes, Chapter 4 in "Stem Cells in Reproductive Medicine, 3rd edition" edited by Carlos Simon, Antonio Pellicer, & Renee Reijo Pera. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS (2013), 46-51

●計画研究 7 (尾畑班)

［原著論文（査読あり）］

S. Mizumachi, T. Aritomi, K. Sasaki, K. Matsubara, and *Y. Hirao: Macromolecular crowded conditions strengthen contacts between mouse oocytes and companion granulosa cells during growth in vitro. ***J Reprod Dev***, 64, 153-160 (2018)

K. Morohaku, Y. Hirao, and *Y. Obata: Development of fertile mouse oocytes from mitotic germ cells in vitro. ***Nat Protoc***, 12, 1817-1829 (2017)

*K. Hayashi, O. Hikabe, Y. Obata, and Y. Hirao: Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. ***Nat Protoc***, 12, 1733-1744 (2017)

*Y. Hirao: Recent advances in understanding the regulation of oogenesis and its recapitulation in vitro: mouse and bovine models. ***J Mamm Ova Res***, 34, 23-29 (2017)

K. Morohaku, Y. Hirao, and *Y. Obata: Differentiation of Mouse Primordial Germ Cells into Functional Oocytes In Vitro. ***Ann Biomed Eng***, 45, 1608-1619 (2017)

T. Somfai, and *Y. Hirao: Synchronization of In Vitro Maturation in Porcine Oocytes. ***Methods Mol Biol***, 1524, 255-264 (2017)

O. Hikabe, N. Hamazaki, G. Nagamatsu, Y. Obata, Y. Hirao, N. Hamada, S. Shimamoto, T. Imamura, K. Nakashima, M. Saitou, and *K. Hayashi: Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. ***Nature***, 539, 299-303 (2016)

K. Morohaku, R. Tanimoto, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K. Hayashi, *Y. Hirao, and *Y. Obata: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 113, 9021-9026 (2016)

K. Morohaku, Y. Hirao, and *Y. Obata: Developmental competence of oocytes grown in vitro: Has it peaked already? ***J Reprod Dev***, 62, 1-5 (2016)

*Y. Obata: Epigenetic modification in mouse oocytes. ***J Mamm Ova Res***, 31, 62-69 (2014)

S. Hara, T. Takano, M. Ogata, R. Yamakami, Y. Sato, T. Kono, and *Y. Obata: Establishment of a conditional transgenic system using the 2A peptide in the female mouse germline. ***J Reprod Dev***, 60, 250-255 (2014)

S. Hara, T. Takano, T. Fujikawa, M. Yamada, T. Wakai, T. Kono, and *Y. Obata: Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but

not functional genomic imprinting. ***Hum Mol Genet***, 23, 3853-3864 (2014)

*Y. Hirao, T. Somfai, and K. Naruse: In vitro growth and maturation of vitrified-warmed bovine oocytes collected from early antral follicles. ***J Reprod Dev***, 60, 68-72 (2014)

*Y. Obata, T. Wakai, S. Hara, and T. Kono: Long exposure to mature ooplasm can alter DNA methylation at imprinted loci in non-growing oocytes but not in prospermatogonia. ***Reproduction***, 147, H1-6 (2014)

*Y. Hirao, K. Naruse, M. Kaneda, T. Somfai, K. Iga, M. Shimizu, S. Akagi, F. Cao, T. Kono, T. Nagai, and N. Takenouchi: Production of fertile offspring from oocytes grown in vitro by nuclear transfer in cattle. ***Biol Reprod***, 89, 1-11 (2013)

［学会発表］

R. Tanimoto, K. Morohaku, T. Kono, Y. Hirao, and Y. Obata: Control of oocyte cyst breakdown and granulosa cell differentiation via inhibition of the estrogen pathway is required for normal follicle assembly. ***4th World Congress of Reproductive Biology*** (Ginowan・Japan) (2017)

Y. Obata: Maturing Embryonic Ovarian PGCs into Functional Oocytes in Culture. ***Gordon Research Conference 2017, Germinal Stem Cell Biology.*** (Shatin・Hong Kong) (2017)

尾畑やよい、平尾雄二：マウス始原生殖細胞から卵子を産生する新規 in vitro 系の開発、第３９回日本分子生物学会年会ワークショップ（横浜市・神奈川県）（2016）

Y. Hirao, and Y. Obata: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. ***2016 ART World Congress*** (New York・USA) (2016)

R. Tanimoto, K. Morohaku, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K, Hayashi, Y. Hirao, and Y. Obata: Abnormal Follicle Assembly In Vitro Correlates with Ectopic Expression of Amh in Mice. ***49th Annual Meeting of The Society for the Study of Reproduction*** (San Diego・USA) (2016)

尾畑やよい、平尾雄二： in vitro において産生されたマウス卵の発生能、第１０８回日本繁殖生物学会シンポジウム（宮崎市・宮崎県）（2015）

K. Morohaku, T. Kono, Y Hirao, and Y. Obata: In vitro growth of primordial follicles derived from neonatal mouse ovaries. ***Gordon Research Conference 2015, Fertilization & Activation of Development*** (Holderness・USA) (2015)

K. Sasaki, S. Hara, R. Yamakami, S. Takeuchi, S. Hasegawa, M. Ogata, T. Kono, and Y. Obata: Ectopic expression of DNMT3A2 and DNMT3L during embryogenesis leads to abnormal methylations at certain gene promoters but not at the imprinted loci. ***Gordon Research Conference 2015, Fertilization & Activation of Development*** (Holderness・USA) (2015)

尾畑やよい：卵子形成過程におけるエピジェネティクス、第３１回日本受精・着床学会シンポジウム（別府市・大分県）（2013）

S. Hara, T. Kono, and Y. Obata: Mechanisms for oocyte-specific methylation imprints. ***46th Annual Meeting of The Society for the Study of Reproduction (***Montreal・Canada) (2013)

［図書・分担著書］

尾畑やよい：朝倉書店、哺乳動物の発生工学（2014）、13−26
平尾雄二：朝倉書店、哺乳動物の発生工学（2014）、27-40
尾畑やよい：インターズー、繁殖生物学（2013）、122−147

●小林一也 (公募研究)

［原著論文（査読あり）］

T. Maezawa, H. Tanaka, H. Nakagawa, M. Ono, M. Aoki, M. Matsumoto, T. Ishida, K. Horiike, and *K. Kobayashi: Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. ***Mech Dev***, 132, 69-78 (2014)

*D. Okano, S. Ishida, S. Ishiguro, and K. Kobayashi: Light and electron microscopic studies of intestinal epithelium in *Notoplana humilis* (Plathlminthes, Polycladida): The contribution of mesodermal/gastrodermal neoblasts to intestinal regeneration. ***Cell Tissue Res,*** 362, 529-540 (2015)

*K. Kobayashi, T. Maezawa, H. Tanaka, H. Onuki, Y. Horiguchi, H. Hirota, T. Ishida, K. Horiike, Y. Agata, M. Aoki, M. Hoshi, and M. Matsumoto: The identification of D-tryptophan as a bioactive substance for postembryonic ovarian development in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. ***Sci Rep,*** 7: 45175 (2017)

H. Nakagawa, K. Sekii, T. Maezawa, M. Kitamura, S. Miyashita, M. Abukawa, M. Matsumoto, and *K. Kobayashi: A comprehensive comparison of sex-inducing activity in asexual worms of the planarian *Dugesia ryukyuensis*: the crucial sex-inducing substance appears to be present in yolk glands in Tricladida. ***Zool Lett*,** 4: 14 (2018)

［総説］

T. Maezawa, K. Sekii, M. Ishikawa, H. Okamoto, and K. Kobayashi: Reproductive strategies in planarians: Insights gained from the bioassay system for sexual induction in asexual *Dugesia ryukyuensis* worms. ***Reproductive & Developmental Strategies***, Springer Japan, 175-201 (2018)

K. Sekii, and K. Kobayashi: Sex-inducing substances break down dormancy in planarian postembryonic reproductive development. ***Invertebrate Endocrinology,*** Apple Academic Press, in press.

［学会発表］

M. Ishikawa, T. Maezawa, and K. Kobayashi: Tryptophan enhances the reproductive organs-specific expression level of an amino acid transporter homolog, *Dr-slc38A9* in the sexual worms of *Dugesia ryukyuensis*. ***The 1st Asian PlanNet Meeting*** (Hong Kong・China) (2014)

K. Kobayashi: Yolk glands containing a large amount of tryptophan have a set of sex-inducing substances to fully sexualize asexual worms of *Dugesia ryukyuensis*. ***International Symposium of Flatworm Biology*** (Oxford・UK) (2015)

T. Maezawa, M. Ishikawa, G. Nagamatsu, and K. Kobayashi: Tryptophan enhances the reproductive organs-specific expression level of an amino acid transporter homolog, *Dr-SLC38A9* to promote sexual induction of the *Dugesia ryukyuensis*. ***International Symposium of Flatworm Biology*** (Oxford・UK) (2015)

N. Nagao, T. Maezawa, and K. Kobayashi: 5-Hydroxytryptophan induces ovaries, and knockdown of tryptophan hydroxylase homolog inhibits sexual induction in the asexual worms of *Dugesia ryukyuensis*. ***International Symposium of Flatworm Biology*** (Oxford・UK) (2015)

K. Kobayashi: Reproductive switching in freshwater planarians: Asexual *Dugesia ryukyuensis* worms are experimentally sexualized by administration of substances contained in yolk glands. ***International Symposia III, The 22th International Congress of Zoology*** (Okinawa・Japan) (2016)

K. Kobayashi: Switching from an asexual to a sexual state in freshwater planarians: Identification of sex-inducing substances. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

K. Sekii, S. Miyashita, M. Narita, M. Sasaki, M. Seki, and K. Kobayashi: Sex-inducing substances are widely conserved among Platyhelminthes, including parasitic flatworms. ***The International Research Symposium on Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with the Fly and Mouse Systems*** (Hirosaki・Japan) (2018)

［図書・分担著書］

小林一也・関井清乃：裳華房、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 (2017)

K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, M. Kondo: Springer Japan, Reproductive and Developmental Strategies: The Continuity of Life (2018)

●山元大輔(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

N. Ojima, Y. Hara, H. Ito, and *D. Yamamoto. Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in *Drosophila melanogaster* females. ***PLoS Genetics***, 14(6): e1007434 (2018)

M. Ote, and *D. Yamamoto. The *Wolbachia* protein TomO interacts with a host RNA to induce polarization defects in *Drosophila* oocytes. ***Archives of Insect Biochemistry Physiology***, 2018;e21475 (2018)

M. Ote, and *D. Yamamoto. Enhancing Nanos expression via the bacterial TomO protein is a conserved strategy used by the symbiont *Wolbachia* to fuel germ stem cell maintenance in infected *Drosophila* females. ***Archives of Insect Biochemistry Physiology***, 2018;e21471 (2018)

N. Hamada-Kawaguchi, and *D. Yamamoto. Ovarian polarity and cell shape determination by Btk29A in *Drosophila*. ***Genesis,*** 55, doi: 10.1002/dvg.23042 (2017)

M. Ote, M. Ueyama, and * D. Yamamoto: *Wolbachia* protein TomO targets *nanos* mRNA and restores germ stem cells in *Drosophila Sex-lethal* mutants.***Current Biology***, 26, 2223-2232 (2016)

N. Hamada-Kawaguchi, Y. Nishida, and *D. Yamamoto: Btk29A-mediated tyrosine phosphorylation of Armadillo/β-catenin promotes ring canal growth in *Drosophila* oogenesis. ***PLoS ONE***, 10, e0121484 (2015)

N. Hamada-Kawaguchi, B. F. Nore, Y. Kuwada, C. I. E. Smith, and *D. Yamamoto: Btk29A promotes Wnt4 signaling in the niche to terminate germ cell proliferation in *Drosophila*. ***Science***, 343, 294-297

(2014)

［総説］

D. Yamamoto, and S. Kohatsu: What does the fruitless gene tell us about nature vs. nurture in the sex life of *Drosophila*? ***Fly (Austin).*** 11(2):139-147. doi: 10.1080/19336934.2016.1263778 (2017)

［学会発表］

D. Yamamoto: An attempt to visualize and activate the courtship circuitry in a non-model *Drosophila* species. ***Gordon Research Conference-Modulation of Neural Circuits and Behavior*** (Grand Summit Hotel at Sunday River・USA) (2017) *Invited*

D. Yamamoto: Nature versus nurture in *D. melanogaster* male courtship. ***The 4th Asia Pacific Drosophila Research Conference*** (Osaka・Japan) (2017) *Keynote*

D. Yamamoto: The circuit mechanism for courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. ***8th Congress of Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology*** (Seoul・Korea) (2017) *Plenary*

D. Yamamoto: Brain insulin-producing cells integrate light and temperature information for diapause control in *Drosophila*. ***2016 Invertebrate Neuropeptide Conference*** (Auro Preto・Brazil) (2016) *Invited*

D. Yamamoto: Nature vs. nurture in *Drosophila* courtship. ***EMBO-Kavli Workshop on Neural Circuits and Behaviour of Drosophila*** (Crete・Greece) (2015) *Invited*

［図書・分担著書］

D. Yamamoto: Ed. Academic Press, London, ***Epigenetic Shaping of Sociosexual Interactions: From Plants to Humans.*** (2014) , 314pp

●金井克晃(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

Y. Kawai, A. Oda, Y. Kanai, and *R. Goitsuka: Germ cell-intrinsic requirement for the homeodomain transcription factor PKnox1/Prep1 in adult spermatogenesis. ***PLoS ONE***, 13, e0190702 (2018)

K. Nagasawa, K. Imura-Kishi, A. Uchida, R. Hiramatsu, M. Kurohmaru, and *Y. Kanai: Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in the seminiferous epithelia of mouse testes. ***Molecular Reproduction and Development***, 85, 262-270 (2018)

K. Imaimatsu, W. Fujii, R. Hiramatsu, K. Miura, M. Kurohmaru, and *Y. Kanai: CRISPR/Cas9-mediated knock-in of the murine Y chromosomal *Sry* gene. ***Journal of Reproduction and Development***, 64, 283-287 (2018) s

H. Igarashi, M. Uemura, R. Hiramatsu, R. Hiramatsu, S. Segami, M. Pattarapanawan, Y. Hirate, Y. Yoshimura, H. Hashimoto, H. Higashiyama, H. Sumitomo, M. Kurohmaru, Y. Saijoh, H. Suemizu, M. Kanai-Azuma, and *Y. Kanai: *Sox17* is essential for proper formation of the marginal zone of extraembryonic endoderm adjacent to a developing mouse placental disk. ***Biology of Reproduction***, 99, 578-589 (2018)

Y. Kitadate, D.J. Jörg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, B.D. Simons, and *S. Yoshida: Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. ***Cell Stem Cell***, in press (2019)

［総説］

M.H. Takase, M. Kanai-Azuma, *Y. Kanai: Differentiation of ovaries. ***Reference Module in Biomedical Sciences*** (2018)

［学会発表］

Y. Kanai: High-FGF9 / low-retinoic acid signaling states in Sertoli valve niche for spermatogenic stem/progenitor cells. ***The 8th International Symposium on Vertebrate Sex Determination*** (Hawaii・USA) (2018)

平松竜司、村田千晴、三浦健人、平手良和、金井正美、金井克晃： *Amh* 欠損雄マウスを用いたミューラー管遺残症における遺残子宮の比較病態解析、第 41 回日本分子生物学会年会 （パシフィコ横浜、神奈川）（2018）

［図書・分担著書］

K. Miura, A. Tomita, and Y. Kanai: Springer, Tokyo, Reproductive and Developmental Strategies, Diversity and Commonality in Animals, (2018) 407-433

金井克晃、平松竜司：一色出版 遺伝子から解き明かす性の不思議な世界, (2019), 261-300

●鈴木敦(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

Y. Niimi, A. Imai, H. Nishimura, K. Yui, A. Kikuchi, H. Koike, Y. Saga, and *A. Suzuki: Essential role of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonia. ***Developmental Biology***, 445, 103-112 (2019)

K. Fukuda, A. Masuda, T. Naka, A. Suzuki, *Y. Kato, and *Y. Saga: Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in oocytes for pre-implantation mouse development. ***PLoS Genetics***,14, e1007436 (2018)

Z. Zhou, H. Kawabe, A. Suzuki, K. Shinmyozu, and *Y. Saga: NEDD4 controls spermatogonial stem cell homeostasis and stress response by regulating messenger ribonucleoprotein complexes. ***Nature Communications***, 8, 15662 (2017)

*A. Suzuki, Y. Niimi, K. Shinmyozu, Z. Zhou, M. Kiso, and *Y. Saga: 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)

*A. Suzuki, Y. Niimi, and *Y. Saga: Interaction of NANOS2 and NANOS3 with different components of the CNOT complex may contribute to the functional differences in mouse male germ cells. ***Biology Open***, 3, 1207-1216 (2014)

［学会発表］

Y. Niimi , and A. Suzuki : Mouse Dead end1 represses the acquisition of pluripotency in male PGCs. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

H. Nishimura, A. Imai, Y. Niimi, and A. Suzuki: Testicular teratoma in organ culture system. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

Y. Niimi Y, and A. Suzuki: Mouse Dead end1 represses the acquisition of pluripotency in male PGCs. ***The Cold Spring Harbor meeting on GERM CELLS*** (New York・USA) (2016)

Y. Niimi, A. Kikuchi, Y. Tazu, and A. Suzuki: Functional analysis of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonial cells. ***The Cold Spring Harbor meeting on GERM CELLS*** (New York・USA) (2016)

A. Suzuki, Y. Niimi, K. Shinmyozu, M. Kiso, and Y. Saga: Mouse DND1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell. ***The Cold Spring Harbor meeting on GERM CELLS*** (New York・USA) (2014)

●岩森督子(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

*T Iwamori, N Iwamori, M Matsumoto, E Ono, MM Matzuk:　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 (2), 469-477 (2017)

［学会発表］

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、今井啓之、小野悦郎：生殖細胞間架橋ICB関連タンパク質の網羅的同定と精子形成過程におけるタンパク質相互作用.日本分子生物学会第41回年会（神奈川・横浜市）（2018）

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk：精巣特異的細胞間結合ICB, ES,BTBの連携作用に機能するタンパク質.生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会大会)（兵庫・神戸市）（2017）

Tokuko Iwamori, Yuzuru Kato, Naoki Iwamori, Masaki Matsumoto, Yumiko Saga, Etsuro Ono and Martin M. Matzuk: A novel X-chromosome-linked protein, KIAA1210, localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. ***4th World Congress of Reproductive Biology*** （第 110 回日本繁殖生物学会大会）(Okazaki・ Japan)（2017）

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk：精巣特異的アクチン関連細胞間結合Ectoplasmic specializationとアクロソームに局在する新規タンパク質の同定.九州実験動物研究

会第39回年会（福岡・北九州市）(2016)

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk : Identification and functional analysis of novel protein on testis specific actin related cell-cell junction, ES (Ectoplasminc Specialization).日本分子生物学会第38回大会（兵庫・神戸市）(2015)

岩森督子、岩森巨樹、小野悦郎、Martin M. Matzuk：精巣特異的アクチン関連細胞間結合 ES に局在する新規タンパク質の同定、日本繁殖生物学会第 107 回大会（北海道・帯広市）(2014)

●中村輝(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

*K. Kikuchi, A. Nakamura, M. Arata, D. Shi, M. Nakagawa, T. Tanaka, T. Uemura, T. Fujimori, A. Kikuchi, A. Uezu, Y. Sakamoto and *H. Nakanishi: Map7/7D1 and Dvl form a feedback loop that facilitates microtubule remodeling and Wnt5a signaling. ***EMBO Rep*** e45471 (2018).

M. Yamane, S. Ohtsuka, K. Matsuura, A. Nakamura, M. Okano, and *H. Niwa: Overlapping functions of Krüppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain naïve pluripotency of mouse embryonic stem cells. ***Development*** 145, dev162404 (2018).

*H. Niwa, A. Nakamura, M. Urata, M. Shirae-Kurabayashi, S. Kuraku and S. Ohtsuka: The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells. ***BMC Evol Biol*** 16, 173 (2016).

G. Liu, P. Sanghavi, K. E. Bollinger, L. Perry, B. Marshall, P. Roon, T. Tanaka, A. Nakamura and *G. B. Gonsalvez: Efficient endocytic uptake and maturation in *Drosophila* oocytes requires Dynamitin/p50. ***Genetics*** 201, 631-649 (2015).

*H. Sano, A. Nakamura, M. Texada, J. W. Truman, H. Ishimoto, A. Kamikouchi, Y. Nibu, K. Kume, T. Ida, and M. Kojima: The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. ***PLOS Genet*** 11, e1005209 (2015).

G. Kim, C. -I. Pai, K. Sato, M. D. Person, A. Nakamura and *P. M. Macdonald: Region-specific activation of *oskar* mRNA translation by inhibition of Bruno-mediated repression. ***PLOS Genet*** 11, e1004992 (2015).

［学会発表］

H. Kina, T. Yoshitani, T. Tanaka, K. Hanyu-Nakamura and A. Nakamura: *Drosophila tiny pole plasm* encodes a small protein that facilitates posterior localization of Aubergine during germ plasm assembly in the oocyte. ***The 13th Japanese Drosophila Research Conference*** (Kyoto・Japan) (2018).

T. Yoshitani, H. KIna, T. Tanaka, K. Hanyu-Nakamura and A. Nakamura: Identification of a new maternal factor involved in germ cell formation in the *Drosophila* embryos. ***Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th*** (Tokyo・Japan) (2018).

K. Aimi, K. Hanyu-Nakamura and A. Nakamura: Isolation and characterization of novel maternal-effect genes regulating germ cell development in the *Drosophila* embryo. ***The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*** (Tokyo・Japan) (2018).

T. Tanaka, S. Otsu, N. Tani and A. Nakamura: The endocytic regulation of the yolk protein receptor Yolkless is required for the polarity establishment and germ plasm assembly in the *Drosophila* oocyte. ***The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*** (Tokyo・Japan) (2018)

A. Nakamura: Germ cell formation in Drosophila. ***The 26th Hot Spring Harbor International Symposium on "Trans-omics: New Approaches in Biology and Medicine 2016"*** (Fukuoka・Japan) (2016).

A. Nakamura and T. Yoshitani: A novel genetic strategy to investigate embryonic roles of maternal factors with essential functions in oogenesis. **The *12th Japanese Drosophila Research Conference*** (Tokyo・Japan) (2016).

K. Aimi, K. Hanyu-Nakamura and A. Nakamura: An oogeneic stage-specific RNAi screening for novel maternal-effect genes regulating germ cell development in the *Drosophila* embryo. **The *12th Japanese Drosophila Research Conference*** (Tokyo・Japan) (2016).

T. Tanaka, S. Otsu, N. Tani and A. Nakamura: Oocyte polarity establishment and germ plasm assembly require the endocytic regulation of the yolk protein receptor Yolkless. **The *12th Japanese Drosophila Research Conference*** (Tokyo・Japan) (2016).

K. Kikuchi, T. Tanaka, M. Arata, D. Shi, A. Nakamura, T. Uemura, T. Fujimori and H. Nakanishi: Identification of novel microtubule-associated proteins that contribute to the epithelial morphogenesis through the Wnt-PCP signaling pathway. **The *12th Japanese Drosophila Research Conference*** (Tokyo・Japan) (2016).

［図書・分担著書］

M.Shirae-Kurabayashi and A. Nakamura: Germ-cell formation in solitary ascidians: Coexistance of preformation and epigenesist. In: The Continuity of Life: Reproductive and Developmental Strategies (Kobayashi, K. et al eds) Springer-Nature, in press.

中村　輝、中村-羽生賀津子：生殖細胞と体細胞，丸善出版株式会社、動物学の百科事典（2018）刷り上がり 2 ページ

中村　輝：第 6 章　ショウジョウバエ体軸形成の遺伝学、メディカル・サイエンス・インターナショナル、ギルバート発生生物学 (Scott F. Gilbert: Developmental Biology の翻訳)（阿形清和，高橋淑子 監訳）pp183-220.

●加藤譲(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

K. Fukuda, A. Masuda, T. Naka, A. Suzuki, *Y. Kato, and *Y. Saga: Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in oocytes for pre-implantation mouse development. ***PLOS Genetics***, 14(6): e1007436. (2018)

Q. Wu, K. Fukuda, Y. Kato, Z. Zhou, CX. Deng, and *Y. Saga: Sexual fate change of XX germ cells caused by the deletion of SMAD4 and STRA8 independent of somatic sex reprogramming. ***PLOS Biology***, 8;14(9):e1002553. (2016)

Y. Kato, T. Katsuki, H. Kokubo, A. Masuda, and *Y. Saga: Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. ***Nature Communications***, 13;7:11272. (2016)

［学会発表］

Y. Kato: The expression network between RNA-binding proteins ELAVL2 and DDX6 is required for primordial follicle formation. ***Cold Spring Harbor Meeting, Germ Cell*** (NY・USA) (2018)

加藤譲：マウス原始卵胞形成における RNA 制御機構、第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム（三島市・静岡県）(2017)

Y. Kato: Primordial follicles: insights from a study of RNA-binding proteins for its development and activation. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

Y. Kato: Primordial follicle formation: insight from a study of an RNA-binding protein. ***Gordon Research Conference, Germline Stem Cell Biology*** (HK・China) (2017)

加藤譲：RNA 結合タンパク質が介する生殖細胞内因的な原始卵胞活性化の調節機構、日本発生生物学会秋季シンポジウム（三島市・静岡県）(2016)

●倉林（白江）麻貴(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

K. Yoshida, A. Hozumi, N. Treen, T. Sakuma, T. Yamamoto, M. Shirae- Kurabayashi, and *Y. Sasakura: Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian Ciona intestinalis reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. ***Developmental Biology,*** 423, 111-125 (2017)

*H. Niwa, A. Nakamura, M. Urata, M. Shirae-Kurabayashi, S. Kuraku, S. Russell, and S. Ohtsuka: The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells. ***BMC Evolutional Biology***, 16, 173 (2016)

［総説］

*M. Shirae-Kurabayashi, A. Nakamura: Germ-Cell Formation in Solitary Ascidians: Coexistence of Preformation and Epigenesis, ***Reproductive and Developmental Strategies***, 3-18 (2018)

［学会発表］

白江-倉林麻貴：カタユウレイボヤにおける生殖細胞形成の分子機構研究.***ホヤ研究会***（京都市・京都府）(2016)

白江-倉林麻貴：尾索動物カタユウレイボヤにおける有性生殖関連因子のノックアウト解析.***第一回ゲノム編集学会***（東広島市・広島県）(2016)

白江-倉林麻貴：腸性目の単体ホヤと群体ホヤにおける生殖細胞形成の比較解析.***第 86 回日本動物学会***（新潟市・新潟県）(2015)

M. Shirae-Kurabayashi: Dual Mechanism for Germ Cell Formation in the Solitary Ascidian, Ciona intestinalis. ***The 8th international tunicate meeting***　(Aomori・Japan)　(2015)

白江-倉林麻貴： カタユウレイボヤの生殖細胞形成における分子機構解析」***日本動物学会第 85 回仙台大会ホヤの談話会***（仙台市・宮城県）(2014)

M. Shirae-Kurabayashi: Molecular analyses of the dual mechanism for germ cell specification in the ascidian, Ciona intestinalis. ***X Meeting Spanish Society for Developmental Biology*** (Madrid・Spain) (2014)

●鎌倉昌樹(公募研究)

［学会発表］

M. Kamakura：Royalactin induces queen differentiation in honeybees. ***International congress of international union for the study for social insects*** (Cairns・Australia)(2014)

鎌倉昌樹：ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析．第 130 回大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会（FBS コロキウム）（吹田市・大阪府）（2016）

鎌倉昌樹：女王蜂における寿命制御機構の解明．数学協働プログラムの研究集会（黒部市・富山県）（2016）

●河村和弘(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

J. Zhai, G. Yao, F. Dong, Z. Bu, Y. Cheng, Y. Sato, L. Hu, Y. Zhang, J. Wang, S. Dai, J. Li, J. Sun, A.J. Hsueh, K. Kawamura, and *Y. Sun: In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. ***J Clin Endocrinol Metab***, 101, 4405-4412 (2016)

［総説］

I. Kawashima, and *K. Kawamura: Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. ***Reproduction***, 153, R205-R213 (2017)

*K. Kawamura, N. Kawamura, and A.J. Hsueh: Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? ***Curr Opin Obstet Gynecol***, 28, 217-22, (2016)

N. Suzuki, N. Yoshioka, S. Takae, Y. Sugishita, M. Tamura, S. Hashimoto, Y. Morimoto, and *K. Kawamura: Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. ***Hum Reprod***, 30, 608-615, (2015)

*K. Kawamura, Y. Cheng, Y.P. Sun, J. Zhai, C. Diaz-Garcia, C. Simon, A. Pellicer, and A.J. Hsueh: Ovary transplantation: to activate or not to activate. ***Hum Reprod***, 30, 2457-60 (2015)

*A.J. Hsueh, K. Kawamura, Y. Cheng, B.C. and Fauser: Intraovarian control of early folliculogenesis. ***Endocr Rev***, 36, 1-24, (2015)

［学会発表］

K. Kawamura: Achieving deliveries in primary ovarian insufficiency. ***26th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI)*** (London・ UK) (2018)

K. Kawamura: Improving ovarian response through ovarian tissue activation. ***FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics the Global Voice for Women's health*** (Rio De Janeiro・Brazil) (2018)

K. Kawamura: Drug-free IVA as an infertility treatment for aging poor responders. ***OVARIAN CLUB XI*** (Paris・France) (2018)

K. Kawamura: Update of In Vitro Activation treatment for patients with primary ovarian insufficiency. ***European Society of Human Reproduction and Embryology*** (Geneva・Switzerland) (2017)

K. Kawamura: IVA as infertility therapy for patients with primary ovarian insufficiency: in vitro drug treatment and two-step surgery. ***7th International IVI Congress*** (Bilbao・Spain) (2017)

K. Kawamura: IVA (in vitro activation) As a new Hope for Infertility Treatment in POI Patients. ***Innovations in the World of IVF Treatments*** (Tel Aviv・Isurael) (2017)

K. Kawamura: Clinical management of POI and the role of in vitro activation. ***3rd Jakarta Infertility Update 2017*** (Jakarta・Indonesia) (2017)

［図書・分担著書］

河村和弘：中外医学社、実践　臨床生殖免疫学 早発卵巣不全（2018）、163-166

河村和弘：金原出版株式会社、実践　産婦人科の実際　ガイドラインの隙間を埋める！臨床医マエストロの技 GQ25　POI の治療，薬物療法と IVA は？（2018）、229-235

河村和弘：先端医療技術研究所、先端医療シリーズ 48　臨床医のための最新産科婦人科 3.がん治療後の卵巣機能不全の不妊治療（2018）、139-142

河村和弘：診断と治療社、女性内分泌クリニカルクエスチョン 90 Q38POI に対する排卵誘発法を成功させるには？（2018）、93

河村和弘：近代出版、生殖補助医療（ART）胚培養の理論と実際 ヒト卵子の成熟と排卵のメカニズム （2018）、76-80

K. Kawamura : Springer, Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation IVA and Ovarian Tissue Cryopreservation（2018）, 149-160

●熊野岳(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

*K. Miyaoku, A. Nakamoto, H. Nishida, and G. Kumano: 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)

［学会発表］

G. Kumano, K. Miyaoku, T. Zheng, A. Nakamoto, and A. Nishino: Regulation of germline gene expression in simple chordate embryos. ***International Research Symposium of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

T. Zheng, A. Nakamoto, A. Nishino, and G. Kumano: Evolutionary and developmental analysis of germline formation in simple chordate embryos. ***International Research Symposium of Germ Cell Development in vivo and in vitro*** (Fukuoka・Japan) (2017)

T. Zheng, A. Nakamoto, A. Nishino, and G. Kumano: Evolutionary and developmental analysis of germline formation in simple chordate embryos. The 9th International Tunicate Meeting (New York・USA) (2017)

宮奥香理、中本章貴、西田宏記、熊野岳：マボヤ胚生殖細胞系列における転写制御機構の解析、日本動物学会平成 28 年度東北支部大会（福島）（2016）

●西島謙一(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

Y. Okuzaki, *H. Kaneoka, K. Nishijima, S. Murakami, Y. Ozawa, and S. Iijima: Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 490,753-759 (2017)

［学会発表］

奥寄雄也、村上晴太郎、鈴木孝幸、黒岩厚、金岡英徳、西島謙一、飯島信司：ニワトリ Prdm14 は始原生殖細胞の発生を制御する、第 39 回日本分子生物学会年会（横浜）　(2016)

萩原遥太、奥寄雄也、金岡英徳、飯島信司、西島謙一：培養始原生殖細胞の樹立と CRISPR/Cas9 による eGFP ノックインニワトリの作製、日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）（2018）（大会トピックス賞）

Y. Okuzaki, H. Kaneoka, K. Nishijima, and S. Iijima: Chicken PRDM14 regulates development of primordial germ cells. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro***　（Hakata・Japan）（2017）

Y. Okuzaki, Y. Hagihara, H. Kaneoka, Y. Nakayama, M. Kato, S. Iijima, and K. Nishijima:　Establishment of eGFP knock-in chicken by manipulating primordial germ cell line using CRISPR/Cas9. ***31st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology*** (Tukuba・Japan) (2018)

●林利憲(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

M. Suzuki, *T. Hayashi, T. Inoue, K. Agata, M. Hirayama, M. Suzuki, S. Shigenobu, T. Takeuchi, T. Yamamoto, and *KT. Suzuki: Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in *Pleurodeles waltl* development and regeneration. ***Dev Biol***, 443: 127-136. (2018)

A. Hirako, Y. Takeoka, T. Hayashi, T. Takeuchi, S. Furukawa, and *A. Sugiyama: Effects of cadmium exposure on Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*) testes. ***J. Toxicol. Pathol.*** 30: 345–350. (2017)

［総説］

*林利憲、竹内隆: イモリをマウスと結ぶための新しい実験モデル、*生体の科学*、67, 264-269.(2016)

［学会発表］

T. Hayashi, M. Nakajima, M. Kyakuno, I. Manabe, K. Doi, and T. Takeuchi: Establishment of Newt model using Iberian Ribbed Newt (*Pleurodeles waltl*) for Regeneration Research and more. ***International Symposium at Hiroshima University*** (Higashihiroshima・Japan) (2018)

林利憲、客野瑞月、中島美英、竹内隆: 次世代シークエンスとゲノム編集技術によるイモリの配偶子形成機構の研究.第88回日本動物学会シンポジウム(富山市・富山県)

T. Hayashi, M. Kyakuno, and T. Takeuchi: New approach toward elucidation of the mechanisms for PGC determination in amphibian newts. ***The International Research Symposium on Regulation of Germ cell development in vivo and in vitro*** (Fukuoka, Japan) (2017)

T. Hayashi, A. Myouga, E. Tsuchiya, S. Azuma Y. Sato and T. Takeuchi: Study of cardiac regeneration using new model newt *Pleurodeles waltl*. ***Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*** (Tokyo, Japan) (2017)

林利憲、茗荷あゆみ、東翔平、土屋絵莉、竹内隆：新規実験モデル動物のイベリアトゲイモリが可能にする新しい再生研究.再生医療学会総会（仙台市・宮城県）(2017)

T. Hayashi, A. Myouga, E. Tsuchiya, S. Azuma, Y. Sato and T Takeuchi: Cardiac regeneration in newts achieved based on the compensatory manner. ***ICZ/ZSJ Joint Meeting*** (Naha, Japan) (2016)

●嶋雄一(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

K. Miyabayashi, Y. Shima, M. Inoue, T. Sato, T. Baba, Y. Ohkawa, M. Suyama, and *K. Morohashi: Alterations in fetal Leydig cell gene expression during fetal and adult development. ***Sexual Development***, 11, 53-637 (2017)

*Y. Shima, K. Miyabayashi, T. Sato, M. Suyama, Y. Ohkawa, M. Doi, H. Okamura, and K. Suzuki: Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. ***Development***, 145, e2306 (2018)

［総説］

*嶋雄一、諸橋憲一郎 ： 精巣におけるテストステロン産生と性分化、 *アンチエイジング医学*、12、22-27（2016）

*Y. Shima, and K. Morohashi: Leydig progenitor cells in fetal testis. ***Molecular and Cellular Endocrinology*,** 55-64, e2306 (2017)

［学会発表］

嶋雄一：ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換による精巣間質の組織構築機構、***第 184 回横浜市立大学医学会講演会　第 33 回新学術領域「配偶子産生制御」セミナー***（横浜市・神奈川県）(2016)

嶋雄一：Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現制御を介したライディッヒ細胞の分化制御機構、***第 8 回転写 Club セミナー***（徳島市・徳島県）(2017)

嶋雄一：哺乳類における胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞の分化メカニズム、***日本アンドロロジー学会　第 36 回学術大会***（教育講演）（倉敷市・岡山県）(2017)

嶋雄一：精巣間質細胞の運命決定と遺伝子発現制御、***第 35 回内分泌代謝学サマーセミナー YEC シンポジウム***（水上温泉水上館・群馬県）(2017)

嶋雄一：精巣間質細胞の幹細胞システム、***第 22 回日本生殖内分泌学会学術集会***（那覇市・沖縄県）(2017)

嶋雄一：精巣ライディッヒ細胞の分化メカニズムの解明、***第 11 回日本性差医学・医療学会学術集会　共催シンポジウム***（福岡市・福岡県）(2018)

Y. Shima, K. Miyabayashi and M. Inoue: Lineage transition from fetal to adult Leydig cell. ***Eighth international symposium on vertebrate sex determination*** (Kona・USA) (2018)

●石黒啓一郎(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

K. Ishiguro, Y. Nakatake, N. Chikazawa-Nohtomi, H. Kimura, T. Akiyama, M. Oda, SBH. Ko, and *MSH. Ko : 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)

K. Ishiguro, M. Monti, T. Akiyama, H. Kimura, N. Chikazawa-Nohtomi, M. Sakota, SatoS., CA. Redi, SBH. Ko, and *MSH. Ko: Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis : ***In Vitro Cell Dev Biol -Anim***, 53, 167-178 (2017)

［総説］

*K. Ishiguro: The cohesin complex in mammalian meiosis, ***Genes Cells***, 27, AOP doi: 10.1111/gtc.12652. (2018)

K. Ishiguro, and *Y. Watanabe: The cohesin REC8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex: ***EMBO reports***, 17, 783-784 (2016)

［学会発表］

K. Ishiguro: A novel germ cell-specific factor, MEIOSIN, recruits STRA8 to direct initiation of meiosis in mammals. ***CSHL Meeting-Germ Cells*** (Cold Spring Harbor・USA) (2018)

K. Ishiguro: A novel transcription factor, MEIOSIN, recruits STRA8 to direct initiation of meiosis in mammals. ***Gordon Research conference MEIOSIS*** (New Hampshire・USA)(2018)

K. Ishiguro : Identification of a novel nuclear factor for initiation of meiosis 8th International Symposium on the 2018. ***Biology of Vertebrate Sex Determination*** (Hawaii・USA)(2018)

K. Ishiguro: A novel STRA8 interacting factor, MEIOSIN1, directs initiation of meiosis in mammals. ***Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB*** (Tokyo・Japan)(2018)

K. Ishiguro: A novel nuclear factor plays a crucial role in initiation of meiosis. ***CDB Symposium 2018 Dynamic Homeostasis: from Development to Aging*** (Kobe・Japan)(2018)

石黒啓一郎 :マウスにおける減数分裂の開始機構、 第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ (横浜市・神奈川県) (2018)

石黒啓一郎 ： マウスにおける減数分裂の開始機構、 モロシヌス研究会 2018 (札幌市・北海道) (2018)

K. Ishiguro: REC8 and RAD21L plays distinct roles in chromosome dynamics in mouse meiosis I. ***SMC proteins Meeting,*** (Yamagata・Japan) (2017)

石黒啓一郎 ： 新規の減数分裂開始因子の同定, 第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会合 (蒲郡市・愛知県) (2017)

石黒啓一郎 ： 新規の減数分裂誘導因子の同定、 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(神戸市・兵庫県) (2017)

●関由行(公募研究)

［原著論文（査読あり）］

*Y. Shibata, Y. Seki, and K. Nishiwaki: Maintenance of Cell Fates and Regulation of the Histone Variant H3.3 by TLK kinase in *Caenorhabditis elegans*. ***Biology Open***, 印刷中

M. Masanori, K. Sugiyama, K. Matsubara, CY. Lin, S. Kuraku, S. Hashimoto, Y. Suwa, LW. Yong, K Takino, S Higashida, D Kawamura, JK. Yu, and *Y. Seki: Co-option of the PRDM14–CBFA2T complex from motor neurons to pluripotent cells during vertebrate evolution. ***Development***, 印刷中

N. Okashita, Y. Suwa, O. Nishimura, N. Sakashita, M. Kadota, G. Nagamatsu, M. Kawaguchi, H. Kashida, A. Nakajima, M. Tachibana, and *Y. Seki: PRDM14 drives OCT3/4 recruitment via active demethylation in the transition from primed to naïve pluripotency. ***Stem Cell Reports***, 7(6), 1072-1086 (2016)

［総説］

*Y. Seki: PRDM14 is a unique epigenetic regulator stabilizing transcriptional networks for pluripotency, ***Frontiers in Cell and Developmental Biology, 6(12)*** (2018)

［学会発表］

Y. Seki: CtBP1/2 is a gatekeeper for ground state pluripotency and totipotency. ***EMBO Workshop: From Epigenome towards Epitranscriptome in Cell Fate Choice*** (Capri・Italy) (2018)

関　由行：多能性ネットワークの進化的起源と変容、日本遺伝学会第 91 回大会（生駒市・奈良県）（2018）

関　由行：後口動物における多能性ネットワークの起源と変容、第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会（札幌市・北海道）(2018)

Y. Seki: An evolutionarily conserved function of PRDM14 for the maintenance of pluripotency in

deuterostome, ***Gordon Research Conference, Germinal Stem Cell Biology*** (Hong Kong・China) (2017)
関　由行：始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング機構の解明とその人為的制御、第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会（千代田区・東京都）(2017)

●新美輝幸(公募研究)

［学会発表］

酒井弘貴、新美輝幸：TALEN を用いた *Bm-Sxl* 遺伝子の機能解析、第 3 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会(柏市・千葉県) (2017)

酒井弘貴、大島宏之、由利昂大、後藤寛貴、大門高明、柳沼利信、佐原 健、新美輝幸：カイコ *Sex-lethal* ホモログは異型精子の一種である無核精子の形成に必須である、 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会（神戸市・兵庫県）(2017)

酒井弘貴、大島宏之、由利昂大、後藤寛貴、大門高明、柳沼利信、佐原 健、新美輝幸：カイコ *Sxl* 遺伝子は無核精子形成に必須である、平成 30 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 −日本蚕糸学会第 88 回大会− (名古屋市・愛知県) (2018)

T. Niimi: *Sex-lethal* homologues in the silkworm *Bombyx mori*: insight into a novel function in a unique sperm dimorphism. ***Symposium "Germ Cell", 50th Annual Meeting of JSDB*** (Tokyo・Japan) (2017)

T. Niimi: *Sex-lethal*, the female-determining gene in *Drosophila*, is involved in apyrene sperm formation. ***The international Research Symposium on "Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro"***, (Fukuoka・Japan) (2017)

［図書・分担著書］

新美輝幸：一色出版、昆虫たちの不思議な性の世界 (2018)、308 (27-79)

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

産業財産権の名称　　組織片の機能を発現・維持する方法
発明者名　　藤井輝夫、木村啓志、小川毅彦、古目谷暢
権利者名　　生産技術研究奨励会、東海大学、横浜市立大学
産業財産権の種類　　特許権
番号　　特許第 6439115 号
出願年月日　　2014 年 6 月 10 日

産業財産権の名称　　始原生殖細胞を機能的に成熟した卵母細胞へと分化させる培養方法
発明者名　　尾畑やよい、平尾雄二、林克彦
権利者名　　東京農業大学、農研機構、九州大学
産業財産権の種類　　PCT
番号　　PCT/JP2016/077574
出願年月日　　2016 年 9 月 16 日

産業財産権の名称　　卵巣由来幹細胞の減数分裂誘導法
発明者名　　河村和弘、川島一公
権利者名　　聖マリアンナ医科大学
産業財産権の種類　　特許出願
番号　　特願 2017-217115
出願年月日　　2017 年 11 月 10 日

研究成果

計画研究１

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析

Genetic network regulating PGC formation in *Drosophila*

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００２）

研究代表者　　小林　悟（筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授）
研究分担者　　向　正則（甲南大学・理工学部・教授）
連携研究者　　阿部訓也（理化学研究所・動物変異動態解析技術開発チーム・チームリーダー）
連携研究者　　林　良樹（筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教）
連携研究者　　佐藤昌直（北海道大学・農学研究院・助教）
連携研究者　　太田龍馬（筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・研究員）

【研究の目的】

始原生殖細胞（PGC）は、配偶子に分化し、次代の生命を生み出すことができる発生運命を持つ。また、PGC は、性差を有し、卵あるいは精子といった異なる形態および機能を持つ配偶子に分化するようにプログラムされる。本研究は、このような発生運命および性差の特徴を獲得した PGC が形成される機構を解明することを目的とする。さらに、他の計画研究と連携することで、PGC 形成に関わる遺伝子の機能の普遍性についても明らかにする。

【研究の成果】

(1) PGC 形成における母性因子 Ovo の機能

ショウジョウバエ卵の後極には生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が観察され、PGC 中に取り込まれる。生殖質中には、生殖細胞にまで分化する能力を持つ PGC の形成に必要十分な母性因子が含まれている。これまでの研究代表者らの研究により、PGC の運命決定に中心的な役割を果たすと考えられる母性因子として、Zn フィンガードメインを有する Ovo が同定されている。本研究では以下の諸点を明らかにした。第１に、母性 *ovo* mRNA は生殖質に分布し PGC に取り込まれるが、その mRNA にコードされる母性 Ovo タンパク質は、PGC の核に enrich することが明らかとなった。第２に、母性 Ovo の機能を阻害した PGC における遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析した結果、母性 Ovo は PGC で高発現する遺伝子群を活性化し、逆に体細胞で高発現する遺伝子群を抑制することが明らかとなった。このことは、母性 Ovo が PGC と体細胞の遺伝子発現の違いを生み出す重要な因子であることを強く示唆する。第 3 に、母性 Ovo の機能阻害を行なったところ、PGC から配偶子への発生過程において、生殖系列細胞数が激減することが明らかとなった。このことは、母性 Ovo が PGC の発生過程に必須であることを示している。最後に、ショウジョウバエと同様に、マウスにおいても、*ovo* ホモログ（*ovol2*）が、PGC 特異的な遺伝子発現の活性化に関わり（詳細は計画研究５を参照）、PGC の発生過程に重要な働きを持つことが明らかとなった。

(2) 母性因子 Mamo の機能解析

PGC における生殖系列マーカー遺伝子（*vasa*）の発現を活性化する母性因子として Mamo を同定していた。母性 Mamo は BTB/POZ ドメインと C2H2 型 Zn フィンガードメインをもつ新規の転写因子様タンパク

質である。このタンパク質の機能に関して以下の諸点を明らかにした。第 1 に、Mamo の N 末端の BTB/POZ ドメインを欠いた断片化タンパク質（MamoAF）が、*vasa* 遺伝子の発現を PGC 中で強く誘導すること、さらに、MamoAF の強制発現が体細胞中で Vasa の発現を誘導できることを明らかにした。第 2 に、*vasa* 遺伝子には、Mamo の結合配列が含まれ、この配列を欠失させると、*vasa* 遺伝子の発現が低下すること、Mamo の Zn フィンガードメインが直接この塩基配列に結合することが明らかになった。最後に、MamoAF が、ヒストンのアセチル化酵素活性を有する CBP、および 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。

(3) 母性因子 Nanos の機能解析

PGC の分化に必須な母性因子として Nanos を同定していた。本研究では、母性 Nanos が、体細胞分化に関わる遺伝子の発現を PGC 中において抑制することを明らかにした。さらに、母性 Nanos が、PGC 中で母性 *ovo* mRNA の安定化に関わるという新たな機能を見いだした。

(4) PGC の性差形成機構

PGC の雌化に中心的な遺伝子として *Sxl* を同定していた。*Sxl* は翻訳あるいはスプライシングを制御する RNA 結合タンパク質をコードしている。本研究では、PGC 中において Sxl タンパク質と *Su(var)2-10* mRNA が結合することを強く示唆する結果を得た。また、この mRNA の機能を低下させると、*Sxl* 遺伝子の機能低下と同様に PGC の雌化を示す表現型が観察された。以上のことは、Sxl の下流で *Su(var)2-10* が機能することを示唆している。さらに、雌雄の PGC を分別して、それぞれの PGC において発現する遺伝子を網羅することにも成功した。今後は、発現に性差がある遺伝子について機能解析を行う予定である。

【研究の意義・展望】

本研究では、PGC の発生過程に必要な母性 Ovo が、PGC 中で生殖系列遺伝子の活性化を行うとともに体細胞性遺伝子の抑制に関わることが明らかとなった。さらに、Ovo は母性 Mamo と協働して、生殖系列特異的に発現する *vasa* 遺伝子の活性化に関わること、母性 Nanos が *ovo* mRNA を安定化することにより Ovo タンパク質の産生を促進することが明らかとなった。以上の研究より、PGC の発生に重要な母性 Ovo を中心とした遺伝子ネットワークを明らかにする基盤が形成できたと考える。さらに、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、ショウジョウバエだけでなくマウスにおいても明らかになったことは特筆すべき事である。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る。本領域で得られた成果の多くは現在論文投稿準備中である。

【主な研究発表】（新しいもの順）

1. M. Hayashi, Y. Shinozuka, S. Shigenobu, M. Sato, M. Sugimoto, S. Ito, K. Abe and *S. Kobayashi: Conserved role of Ovo in germline development in mouse and *Drosophila*. ***Sci. Rep***, 7, 40056. (2017)
2. S. Sugimori, Y. Kumata, and *S. Kobayashi: Maternal Nanos-dependent RNA stabilization in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***Develop. Growth. Differ***, 60, 63-75. (2017)
3. R. Ota, S. Morita, M. Sato, S. Shigenobu, M. Hayashi, and *S. Kobayashi: The transcripts immunoprecipitated with Sxl protein in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. ***Develop. Growth. Differ***, 59, 713-723.(2017)
4. *M. Mukai, *S. Hira, K. Nakamura, S. Nakamura, H. Kimura, M. Sato and S. Kobayashi: H3K36 Trimethylation-Mediated Epigenetic Regulation is Activated by Bam and Promotes Germ Cell Differentiation During Early Oogenesis in Drosophila. ***Biol Open***, 4:119-24 Doi: 10.1242/bio.201410850 (2015)

計画研究２

マウスPGCの形成を制御する分子ネットワークの解明

Molecular networks regulating mouse primordial germ cell development

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００３）

研究代表者　　松居　靖久（東北大学・加齢医学研究所・教授）
研究分担者　　酒井　則良（国立遺伝学研究所・准教授）
連携研究者　　前田　郁麻（東北大学・加齢医学研究所・助教）
連携研究者　　小林　一也（弘前大学・農学生命科学部・准教授）
連携研究者　　望月研太郎（東北大学・加齢医学研究所・助教）
連携研究者　　林　陽平　（東北大学・加齢医学研究所・助教）
連携研究者　　網本　直記（東北大学・加齢医学研究所・助教）
連携研究者　　大塚　慧　（東北大学・加齢医学研究所・助教）
連携研究者　　斉藤　大介（東北大学・生命科学研究科・助教）
連携研究者　　石橋　崇　（東北大学・加齢医学研究所・技術専門職員）

【研究の目的】

胎仔期の未分化な生殖細胞である始原生殖細胞(PGC)と初期胚の多能性幹細胞は、遺伝子発現等に類似した部分があるが、多能性幹細胞は様々な種類の細胞に分化を開始できるのに対して、PGC は配偶子にのみ分化する単能性の細胞で、分化能には明らかな違いがある。従って、多能性幹細胞とPGCの間には、直接の相互変換を阻害する機構が備わっている可能性が考えられ、それにより胚発生初期の適切な時期に、適切な数のPGC が形成されることが保証されていると考えられる。このような考えの基に、これまでに転写因子Maxが、マウスES細胞で生殖細胞特異的遺伝子の発現を抑制していることを明らかにした。一方、Dnd1 遺伝子変異により、胎仔精巣内で 生殖細胞が多能性幹細胞へ変化し、様々な分化組織からなる奇形腫を形成することが知られており、Dnd1タンパク質の働きにより、PGCの多能性幹細胞への変化が抑制されていると考えられる。

マウスとは異なりニワトリやゼブラフィッシュでは、母性因子の働きにより PGC が形成されると考えられてきたが、それらの初期胚細胞からも ES 細胞と類似した多能性細胞が得られることが報告もされており、多能性幹細胞からの PGC 分化も起こっている可能性が考えられる。さらに扁形動物のプラナリアは、多能性幹細胞であるネオブラストの働きにより、個体再生能力を持ち、ネオブラストは生殖細胞へも分化する。しかし、ネオブラストからの生殖細胞形成を制御する分子機構の詳細は明らかでない。以上のような背景を踏まえて本研究では、マウスにおいて多能性幹細胞と PGC の違いを生み出している遺伝子ネットワークを明らかにし、さらにそれが進化的にどこまで普遍性があるかを、代表的なモデル生物と比較解析することにより解明することを目的とした。

【研究の成果】

(1) マウスES細胞でのPGC特異的遺伝子の発現抑制におけるMaxの作用機構

マウス ES 細胞で、Max が DNA メチル化酵素(DNMTs)、およびヒストン H3K9 トリメチル化酵素(SETDB1)と相互作用し、DNA のメチル化またはヒストン H3K9 トリメチル化を介して、一部の生殖細胞特異的遺伝子発現を抑制していることを明らかにした。

(2) PGC の多能性幹細胞への変化の制御に関わる分子経路の解明

Dnd1 が、マイクロ RNA(miR26a)を阻害することでヒストン H3K27 メチル化酵素遺伝子の発現を維持し、さらに、それにより細胞増殖を抑制するサイクリン D 遺伝子の発現を保つことで、PGC からの奇形腫形成を抑制することを明らかにした。

(3)PGC 再プログラム化因子の同定

多能性幹細胞に比べて PGC で発現が低い転写因子のなかで、KLF9 と BCL3 が、PGC の再プログラム化を促進することを見いだした。特に KLF9 は bFGF の下流で働き、その下流には cAMP シグナルが作用していることを示した。

(4)PGCと多能性幹細胞の代謝状態の解析

プロテオーム･メタボロームの統合比較解析により、マウスPGCでは、ES細胞と比べて解糖系が抑制され、酸化的リン酸化は、ES細胞、生殖巣体細胞と比較して促進されていることがわかった。さらにPGCが多能性幹細胞へ再プログラム化される際には、解糖系活性が必要であることがわかった。

(5)エピブラストからの PGC 形成に働くヒストン修飾関連因子の同定と、作用機構

エピブラスト細胞から PGC が形成される過程で、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 が体細胞遺伝子の発現を抑制すること、およびヒストンメチル化酵素 SETDB1 が BMP シグナル遺伝子の発現を維持することが、重要であることを明らかにした。

(6) プラナリアでのMaxの機能

プラナリアでMaxのノックダウン(KD)を行ったところ、一部の生殖細胞特異的遺伝子の発現の上昇が見られたが、その程度は小さかった。

(7) ニワトリ胚でのMaxの機構

ニワトリ初期胚のブラストダーム細胞を培養して得た多能性幹細胞様の細胞でMax-KDを行ったところ、一部の生殖細胞特異的遺伝子の、わずかな発現上昇が見られるにとどまった。

(8) ゼブラフィッシュ胚のMaxの機能

ゼブラフィッシュES細胞でMax-KDを行ったところ、いくつかの生殖細胞特異的遺伝子が上昇傾向を示したが、その程度は小さかった。またMax欠損胚ではPGC数の減少が見られ、MaxがPGCの維持に働いている可能性が示唆された。これらの結果から、プラナリア、ニワトリ、ゼブラフィッシュともに、Maxは生殖細胞特異的発現抑制には関与せず、別の機能を持つと考えられた。

【研究の意義・展望】

多能性幹細胞での生殖細胞遺伝子抑制、および多くの動物種の PGC 形成に重要な、形成期 PGC での体細胞遺伝子抑制などの、生殖細胞発生に重要な過程が、動物種により異なる分子機構により制御されていると考えられる。PGC の再プログラム化を含め、生殖細胞発生過程の様々な現象の保存性とメカニズムの多様性を解明することで、生殖細胞が、次世代に命を繋ぐ役割の頑強性を進化過程で維持してきた仕組みに迫ることが期待できる。

【主な研究発表】

1. K. Mochizuki, Y. Tando, T. Sekinaka, K. Otsuka, Y. Hayashi, H. Kobayashi, A. Kamio, Y. Ito-Matsuoka, A. Takehara, T. Kono, N. Osumi, and *Y. Matsui: SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling. ***Development***, 145, dev164160 (2018)
2. K. Mochizuki, Y. Hayashi, T. Sekinaka, K. Otsuka, Y. Ito-Matsuoka, H. Kobayashi, S. Oki, A. Takehara, T. Kono, N. Osumi, and *Y. Matsui: Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination. ***Cell Rep***, 24, 2682–2693 (2018)
3. Y. Hayashi, K. Otsuka, M. Ebina, K. Igarashi, A. Takehara, M. Matsumoto, A. Kanai, K. Igarashi, T. Soga, and *Y. Matsui: Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. ***PNAS***, 114, 8286-8294 (2017)
4. I.Maeda, D. Okamura, Y. Tokitake, M. Ikeda, H. Kawaguchi, N. Mise, K. Abe, T. Noce, A. Okuda, and *Y. Matsui: Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. ***Nature Commun***, 4, 1754 (2013)
5. T. Kawasaki, A. Maeno, T. Shiroishi and *N. Sakai: Development and growth of organs in living whole embryo and larval grafts in zebrafish. ***Sci Rep*** 7, 16508 (2017)
6. T. Kawasaki, K. R. Siegfried and *N. Sakai: Differentiation of zebrafish spermatogonial stem cells to functional sperm in culture. ***Development*** 143, 566-574 (2016)

計画研究 3

マウス配偶子産生における GSC の制御機構の解明

Investigating the mechanisms for GSC regulation in mouse gametogenesis

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００４）

研究代表者　　吉田松生（基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授）
研究分担者　　大保和之（横浜市立大学・医学研究科・教授）
研究分担者　　原健士朗（東北大学・農学研究科・准教授）
連携研究者　　北舘　祐（基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教）
連携研究者　　中川俊徳（基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教）

【研究の目的】

マウスの GSC である精子幹細胞の動態と制御メカニズムの解明を目的とした。GSC は組織中に散在し、自己複製と分化をランダムに行い、組織障害など環境に応じて柔軟に挙動を変えることが分かっていた。このような「開放型ニッチ」では、「特定の（閉鎖型）ニッチで常に非対称分裂する」と言う古典的モデルでは解決済みとされてきた疑問が再燃していた。

本研究では、①自己複製する GSC と分化する GSC が同じ環境に共存するメカニズム、②個々の幹細胞はランダムに振る舞うにもかかわらず、GSC の数が一定に保たれるメカニズムに挑戦した。さらに、③精子形成の源である GSC におけるエピゲノム修飾の、精子形成における意義を検討した。

【研究の成果】

(1) マウス GSC の精巣組織中のダイナミックな挙動（文献 5）

生体ライブイメージングとパルス標識により、GSC の組織内動態を一細胞レベルで計測し、GSC が組織内を不規則に動き回り、個々にバラバラの運命挙動を示すことを見出した。これらは統計学的に予測可能なストカスティックな現象であった。

(2) 同じ微小環境で自己複製と分化を両立するメカニズム（文献 3,4）

SSC が不均一な集団で、分化を誘導する細胞外シグナル（既知のレチノイン酸と、本課題で明らかにした WNT）に対する反応性が細胞ごとに異なるため、分化する細胞と自己複製する細胞が共存できることを見出した。レチノイン酸に対しては受容体(RARg)の、WNT に対しては新規の WNT 抑制因子(SHISA6)の不均一な発現が、反応性の違いを生む分子的基盤であった。

(3) SSC 数を一定に保つメカニズム（文献 1）

GSC 数（密度=精細管長さあたりの数）を制御する因子として線維芽細胞増殖因子（FGF5/4/8）を同定、血管近くのリンパ内皮細胞から分泌されることを発見した。FGF 量を人工的に変化させると、これと直線的に相関して GSC 密度が変化し、FGF が GSC 密度制御の律速因子であるとわかった。さらに、GSC は FGF を細胞内に取り込んでいたため、「精巣組織に一定量の FGF が供給され、GSC が取り込んで消費する。SSC の自己複製と分化は、FGF の消費量に依存して確率的に決まる」という数理モデルを構築した。この単純なモデルは、生体内で観察される多彩な GSC 動態を定量的に予測した。特に、組織障害後に減衰振動を経て定常状態に復する過程を高い精度で予測し、本モデルの信頼性が示された。

(4) GSC のエピジェネティック制御による配偶子の品質管理（文献 2）

精子形成後期の半数体細胞で発現する遺伝子について、GSC におけるエピジェネティック状態を解析した。これらの遺伝子の一部では、GSC の段階から転写開始点が

H3K4me3 修飾を受け、発現する準備を整えていることを見出した。さらに、その準備に失敗した細胞を減数分裂に入る直前に殺してしまう品質管理機構を発見した。

【研究の意義・展望】

本研究の結果得られた GSC の自己複製と分化の制御メカニズムと、それに基づく数理モデルは、新規のメカニズム（原理）であり、精子形成のみならず「開放型ニッチ」を持つ他の組織幹細胞に広く当てはまる可能性がある。

また、正常な GSC ホメオスタシスの動態と制御機構が明らかになったことで、長期間にわたるホメオスタシスの維持（加齢）や性質の異なる変異幹細胞の出現（腫瘍）などへの理解が飛躍的に深まると期待される。

さらに、GSC で正しいエピジェネティック修飾が導入されなかった細胞が除去されるという発見から発展し、新規の配偶子品質管理機構の詳細が明らかとなることが期待される。

【主な研究発表】

1. Y. Kitadate, D. J. Jörg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, *B. D. Simons, and *S. Yoshida: Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. ***Cell Stem Cell*,** 24, 79-92 (2019)

2. *S. Tomizawa, Y. Kobayashi, T. Shirakawa, K. Watanabe, K. Mizoguchi, I. Hoshi, K. Nakajima, J. Nakabayashi, S.Singh, A. Dahl, D. Alexopoulou, M. Seki, Y. Suzuki, H. Royo, AHFM. Peters, K. Anastassiadis, AF. Stewart and *K. Ohbo: Kmt2 conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in mouse spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters. ***Development*, 145,** dev169102 (2018)

3. M. Tokue, K. Ikami, S. Mizuno, C. Takagi, A. Miyagi, R. Takada, C. Noda, Y. Kitadate, K. Hara, H. Mizuguchi, T. Sato, M. M. Taketo, F. Sugiyama, T. Ogawa, S. Kobayashi, N. Ueno, S. Takahashi, S. Takada, and *S. Yoshida: SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/β-Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. ***Stem Cell Reports***, 8, 561-575 (2017)

4. K. Ikami, M. Tokue, R. Sugimoto, C. Noda, S. Kobayashi, K. Hara, and *S. Yoshida: Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. ***Development***, 142, 1582-1592 (2015)

5. K. Hara, T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, *B. D. Simons, and *S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. ***Cell Stem Cell***, 14, 658-672 (2014)

計画研究４

サケ科魚類の進化に伴う GSC 制御機構の変化

How had germ-line stem cells changed their regulation mechanism during salmonid evolution?

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００５）

研究代表者　　吉崎　悟朗（東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授）

【研究の目的】

本課題では、これら種間で繁殖回数の違いを生み出す GSC の挙動を、形態学的な手法と移植実験の組み合わせで明らかにすることを目指した。さらに、異種間 GSC 移植により、一回繁殖種由来の生殖細胞をもつ多回繁殖種、あるいはその逆を種々の組み合わせで作出し、GSC の挙動を解析した。これにより、GSC の挙動は完全に細胞自律的なのか、あるいは体細胞環境の影響も受けているのかを明らかにすることを試みた。続いて、この両繁殖型を生み出す GSC 自律的な制御機構と生殖腺を構成する体細胞からの非自律的制御機構を解明することを目指した。

【研究の成果】

(1) サケ科魚類の成熟後精巣における Type A Spermatogonia（ASG）の振る舞い

まず、排精後の ASG の振る舞いを明らかにするため、上記 4 種の排精後の各精巣組織を生殖細胞特異抗体で免疫染色した。その結果、ニジマスは排精後も ASG を保持したが、ヒメマスは排精後に ASG を消失した。また、ニジマスに最も近縁なヤマメは排精後も ASG を保持したが、ヒメマスに近縁なマスノスケは排精後に ASG を消失した。以上のことから、タイヘイヨウサケ属魚類の繁殖回数は、寿命に規定されるのみならず、精巣の精子生産能力によっても規定されていることが明らかになった。

(2) サケ科魚類の成熟年齢と ASG の振る舞いの関連

サケ科魚類の雄は通常の成熟年齢より 1 年早く成熟する早熟個体が一定の頻度で出現する。そこで成熟年齢と排精後の ASG の振る舞いとの関係を明らかにするために、早熟雄個体の排精後の精巣を解析した。その結果、満 2 歳の早熟ヒメマスは満 3 歳の同成熟魚と同様、排精後に ASG を消失した。このことから、ヒメマスは成熟年齢にかかわらず、初回排精後に ASG を消失することが明らかになった。すなわち、ヒメマスは仮に初回排精後に生残しても、翌年以降の繁殖期に精子を再生産できないと示唆された。一方、満 3 歳の早熟マスノスケは満 4 歳の同成熟魚と異なり、排精後もニジマス、ヤマメ同様、ASG を保持した。このことから、一回繁殖型種の中でも進化した魚種ほど、成熟年齢に関係なく初回排精後に ASG が消失する傾向が示唆された。

(3) 排精精巣における ASG 消失の要因の解明

まず、ASG の消失過程の詳細を明らかにするため、ニジマス、ヒメマスの精子形成開始前（33 か月齢）から排精後（38 か月齢）までの各精巣組織を解析し、両種 ASG 数の経時変化を計数した。その結果、ニジマスの精巣あたり ASG 数は、33 か月齢から 38 か月齢まで、5×10^6個から 12×10^6個の間を推移した。一方、ヒメマスの精巣あたり ASG 数は、33 か月齢の 6×10^6個から、35 か月齢までの期間に半減し、排精後 1 か月以内に消失した。

そこで、これら ASG の消長が、生殖細

胞と体細胞のどちらによって制御されているかを明らかにするため、三倍体化処理を施したヒメマスにニジマス ASG を移植し、ヒメマス精巣環境下でのニジマス ASG の振る舞いを解析した。その結果、ヒメマスへ移植されたニジマス ASG は、排精 1 か月後もニジマス同様、精巣に保持された。さらに、このニジマス ASG をニジマス孵化稚魚へ再移植したところ、一部の細胞が生殖腺へ生着した。すなわち、ヒメマス精巣内に排精後も保持されたニジマス ASG は、SSC を含むことが明らかになった。一方、dnd 遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノ処理により内在性の生殖細胞を欠損させたニジマスにヒメマス ASG を移植した結果、ヒメマス ASG 中に含まれる SSC はニジマス精巣内に残存し続け、これらニジマス雄宿主は 5 年間にわたりヒメマス精子を生産し続けることが明らかになった。

以上の結果から、ニジマス SSC の挙動は生殖細胞自律的な制御も受けていることが示唆された一方、ヒメマス SSC は体細胞環境にも支配されていることが明らかになった。そこで、これらの制御機構の一端を明らかにすべくニジマス、ヒメマス両種の ASG におけるトランスクリプトームの比較解析を行った結果、細胞の生存や増殖に関わる複数のシグナル経路がニジマス ASG で亢進していることが明らかになった。今後、ニジマスにおいてこれらのシグナル経路を薬剤等で阻害、あるいは活性化することで、繁殖様式依存的な ASG の動態制御機構を解明していきたい。

【研究の意義・展望】

本研究はサケ科魚類の繁殖様式の変化の原動力を探るのみならず、SSC の増殖、分化、生残の制御機構を理解する際のモデルとしても有用であると期待される。また生殖細胞移植のドナーとしてこれらサケ科魚類を用いる際には、上記の基礎情報を考慮して移植実験を行うことが、移植細胞由来の配偶子を効率的に生産させるうえでは不可欠であろう。

【主な研究発表】

1. M. Hayashi, D. Sakuma, and *G. Yoshizaki: Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. ***Molecular Reproduction and Development***, 85, 155-162(2018)
2. *G. Yoshizaki, and S. Lee: Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. ***Stem Cell Research***, 29, 103-110 (2018)
3. M. Sato, M. Hayashi, and *G. Yoshizaki: Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout. ***Biology of Reproduction***, 96, 1303-1316 (2017)

計画研究５

*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

Reconstitution in culture of germ cell differentiation in mice

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００６）

研究代表者　　林　克彦（九州大学・大学院医学研究院・教授）

【研究の目的】

本研究はマウスの多能性幹細胞(ES 細胞)から始原生殖細胞(PGCs)を作出する体外培養技術を発展させ、ES 細胞から卵原細胞、精原細胞を分化させる体外培養系の確立を目指す。この体外培養系を利用して、PGCs の増殖・性分化に関わる因子を単離・同定する新たな研究を開始する。さらに、他の計画研究と連携して、ES 細胞由来の卵原／精原細胞を受精可能な配偶子まで分化させる体外培養系の確立を目指すとともに、他の計画研究と連携し、培養系を用いてマウスやショウジョバエの PGCs の形成に必須な遺伝子の機能について詳細に解析する。

【研究の成果】

(1) 多能性幹細胞からの機能的な卵母細胞の誘導

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から体外で卵細胞を産生する体外分化培養技術の開発は長い間望まれていたが、これまでにいずれの動物種においても成功例はなかった。本成果では世界で初めて、多能性幹細胞から卵子までのすべての過程を培養皿上で再現できる体外分化培養技術を構築することに成功した。本培養技術では成体のマウスの尻尾の組織由来の iPS 細胞から培養皿上で卵子を作製でき、得られた卵子からはマウスが産まれた。また、これらのマウスは妊孕性を持つことも明らかになった。本成果は Science 誌が選ぶ 2016 年の 10 大ブレークスルーに選出された。

(2) 多能性幹細胞からの精原細胞の誘導

ES 細胞から精原細胞を誘導する培養系を確立した。研究では、ES 細胞から誘導した始原生殖細胞 (PGC)様細胞を胎仔精巣の体細胞との共培養により精原細胞を得た。それらの精原細胞は培養により体外で無限に増殖する生殖幹（GS）細胞となった。これらの GS 細胞を精巣へ移植すると、機能的な精子に分化した。

(3) マウス Ovo 遺伝子群の機能解析

PGC 形成の分子機構を解明するため、ショウジョウバエの生殖細胞分化に必須である *Ovo* のマウスホモログである *Ovol* 遺伝子群（Ovol1、Ovol2、Ovol3）の機能を解析した。マウス ES 細胞において、これらすべての遺伝子をノックアウトした結果、PGCs への分化が初期の段階で著しく阻害されていることが明らかとなった。次にそれぞれの遺伝子をノックアウトした結果、*Ovol2* が主に PGC 形成に寄与していることが示された。*Ovol2* をノックアウトした ES 細胞から誘導した PGCs の遺伝子発現を解析した結果、多能性遺伝子および PGC 特異的遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。以上のことから、Ovol2 は PGC 形成において、（なんらかの作用を介して）多能性遺伝子および PGC 特異的遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

【研究の意義・展望】

本成果により、多能性幹細胞から体外培養条件下で卵母細胞や精原細胞の分化過程を再現できた意義は大きい。まず開発した培養技術により卵母細胞や精原細胞の形成過程を観察できることから、これらの細胞分化に関わる遺伝子機能の解明や不妊原因の究明が飛躍的に進むことが期待される。また他の動物への応用により、繁殖の困難な動物や絶滅危惧種などの種の維持に貢献することが期待される。これらの培養技術により、個体

を用いることなく卵母細胞や精原細胞の分化を誘導できる可能性が広がり、研究の効率化や実験動物の削減に大きく貢献する。

【主な研究発表】

1. *K. Hayashi, O. Hikabe, Y. Obata, and Y. Hirao: Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. ***Nature Protocols***, 12, 1733-1744 (2017)
2. Y. Ishikura, Y. Yabuta, H. Ohta, K. Hayashi, T. Nakamura, I. Okamoto, T. Yamamoto, K. Kurimoto, K. Shirane, H. Sasaki, and *M. Saitou: In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. ***Cell Reports***, 17, 2789-2804 (2016)
3. Hikabe, N. Hamazaki, G. Nagamatsu, Y. Obata, Y. Hirao, N. Hamada, S. Shimamoto, T. Imamura, K. Nakashima, M. Saitou, and *K. Hayashi: Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. ***Nature,*** 539, 299-303 (2016)
4. K. Morohaku, R. Tanimoto, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K. Hayashi, *Y. Hirao, and *Y. Obata: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 113, 9021-9026 (2016)
5. F. Nakaki, K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, Y. Yabuta, and *M. Saitou: Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. ***Nature***, 501, 222-226 (2013)
6. S. Aramaki, K. Hayashi, K. Kurimoto, H. Ohta, Y. Yabuta, H. Iwanari, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Kato, K. Shirahige, and *M. Saitou: A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. ***Developmental Cell***, 27, 516-529 (2013)
7. *K. Hayashi and *M. Saitou: Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. ***Nature Protocols***, 8, 1513-15124 (2013)
8. *K. Hayashi and *M. Saitou: Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. ***Methods in Molecular Biology,*** 1074, 175-183 (2013)

計画研究 6

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

In vitro system maintaining efficient spermatogenesis for a long duration

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００７）

研究代表者　　小川　毅彦（横浜市立大学・生命医科学研究科・教授）
研究分担者　　木村　啓志（東海大学・工学部・准教授）
連携研究者　　佐藤　卓也（横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教）

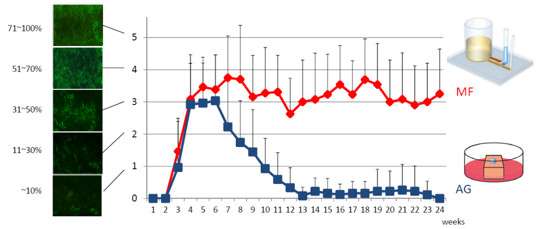
【研究の目的】

研究代表者らは新生仔マウス精巣組織片をアガロースゲル上で培養することにより、精原幹細胞から精子産生に至る精子形成の全過程を in vitro で再現することに成功した（Nature 2011）。培養下で産生された精子を用いて顕微授精を行い、正常な産仔も得られた。しかしながら、その方法には幾つかの点で限界があった。特に、培養維持期間が２か月足らずであり、培養液の組成の詳細も明らかではないことから改良も儘ならなかった。本研究においては、培養液組成や培養微小環境を検討することにより、機能的に正常な配偶子を長期間作り続けることのできる全く新しい培養系を開発することを目的とした。その開発過程で、配偶子形成の調節機構・制御因子の詳細も明らかにすることを目指した。

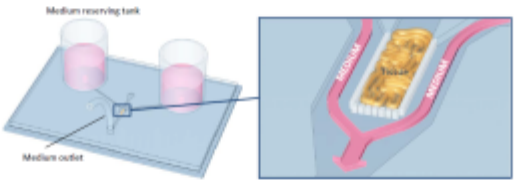
【研究の成果】

(1) 精巣組織片を長期間維持できる培養系の開発：

これまでの器官培養法は気相液相境界部培養法が主流であったが、生体内のような微小循環系による酸素や栄養素の供給と老廃物の除去が効率よくなされるわけではなかった。この課題を解決するために、マイクロ流体システムを導入し、物質供給を効率化することを計った。デバイスの素材であるPDMS(Polydimethylsiloxane)は酸素透過性に優れており、組織は十分な酸素供給が得られる仕組みになっている。デバイス内に設置したタンクに培養液を貯め、ポンプでゆっくりと吸引することにより、培養液流を作成した。このデバイスにマウス精巣組織片を留置し、流路に培養液を流しながら培養を行うことにより、組織全体にわたって効率よく精子形成を誘導することに成功した。さらにこれまでの方法では 2～3 か月で精子形成は低下・消滅し、組織形態も崩壊していたが、マイクロ流体デバイス内では 6 か月以上に亘って精子形成が維持され、精子産生を持続することに成功した(下図)（論文 2)。さらにマイク



ロ流体デバイスでの精巣組織培養を効率化するために、それまで外部動力ポンプを使って培養液の流れを作っていたが、ポンプを使わずに培養液流束を造れるデバイスを開発した。これにより実験数・実験組織数の増加も可能となり、この手法の普及にも貢献が期待できる状況となった。またデバイスの基本コンセプトを下図のように変えた新しいデバイスも作製した。組織片の周囲を培養液が



流れ、上面から酸素が供給される様式であり、シンプルな設計ゆえにデバイス作製過程で組織を導入できることから、精巣組織以外への応用も可能となった。

(2) 化学組成の明らかな培養液による in vitro 精子形成：

マウス精巣組織片を器官培養して精子産生に成功した最大の要因は、KSR あるいは AlbMAX という血清代替物を培養液に添加したことであった。そこで、AlbuMAX の成分分析を行った。同時に、KSR/AlbuMAX を用いずに化学組成の明らかな（Chemically-Defined、CD）培養液での精子形成誘導を試みた。その結果、精巣組織器官培養法において重要な因子として、レチノイン酸、脂質（コレステロール、脂肪酸、リン脂質）、ホルモン（LH, FSH, Testosterone, Triiodo-thyronine）が確認できた（論文 1）。さらに、脂質に関する分析を行い、培養液作製における有効は手法を発見した。CD 培地での精子形成が可能になったことから、今後さらに精子形成を促進・維持・阻害する因子を同定してゆき、より良い培養液の作成に取り組んでゆけると考えている。

(3) 精巣の凍結保存：

凍結保存したマウス精巣組織を解凍後に培養し、精子産生に成功した。得られた精子から顕微授精にて健康な産仔に成功した（論文 3)。これにより、小児がん患者の精巣組織保存が生殖能の保持に繋がることを示した。

【研究の意義・展望】

マイクロ流体デバイスの導入により、培養法の根本的改良に成功し、CD 培地での精子形成が可能になったことから、今後は in vitro ヒト精子形成への挑戦が現実的となった。動物実験でしか解明できなかった精子形成の詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

【主な研究発表】

1. H. Sanjo, M. Komeya, T. Sato, T. Abe, K. Katagiri, H. Yamanaka, Y. Ino, N. Arakawa, H. Hirano, T. Yao, Y. Asayama, A. Matsuhisa, M. Yao, *T. Ogawa: In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. ***PLoSOne*,** 13, e0192884 (2018)
2. M. Komeya, H. Kimura, H. Nakamura, T. Yokonishi, T. Sato, K. Kojima, K. Hayashi, K. Katagiri, H. Yamanaka, H. Sanjo, M. Yao, S. Kamimura, K. Inoue,　N. Ogonuki, A. Ogura, T. Fujii, *T. Ogawa: Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. ***Sci. Rep.*** 6, 21472 (2016)
3. T. Yokonishi, T. Sato, M. Komeya, K, Katagiri, Y. Kubota, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, *T. Ogawa: Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. ***Nat Commun.*** 5, 4320 (2014)

計画研究７

*in vitro*において卵を産生する新規培養系の開発

Establishment of novel *in vitro* systems to produce mammalian oocytes

２０１３年度～２０１７年度（２５１１４００８）

研究代表者　　尾畑やよい（東京農業大学・生命科学部・教授）
研究分担者　　平尾　雄二（農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上席研究員）

【研究の目的】

哺乳類の卵母細胞はその形成過程で、減数分裂やインプリンティングを完了させる他、発生に必要な mRNA やタンパク質を合成・蓄積し細胞質を成熟させる。しかし、卵の機能を左右する要因は多岐にわたり、その全容は明らかにされていない。また、ほ乳類では生体内において、ごくわずかな成熟卵しか産生されない。増殖期の始原生殖細胞から *in vitro* で成熟卵を産生することが可能になれば、優良家畜の繁殖や希少動物の保護に役立つことが期待される他、生体内では見えない複雑な発生現象を可視化でき、卵母細胞の分化・成熟に必要な分子機構を解明するツールになりうる。しかし、卵形成の全過程を *in vitro* で再現する培養法は確立できずにいた。そこで本研究は、マウス始原生殖細胞から成熟卵を産生する新規 *in vitro* 系の開発を行うことを目的とした。

【研究の成果】

胎齢 12.5 日のマウス胎仔から生殖巣を採取し、10% ウシ胎子血清（FBS）添加 alpha-MEM 中で器官培養を行った。培養 0 日目では、減数分裂マーカーSYCP3 のシグナルは検出されなかったが、培養 5 日目には対合する染色体上にシグナルが検出され、生殖細胞は培養下で減数分裂に移行し卵母細胞に分化していることが示された。培養 17 日目には培養卵巣に 100 以上の成長期卵母細胞が観察された。成熟卵を分化させるために、さらに卵巣培養を継続したが、卵巣組織が変性・退行していった。そこで、卵巣から二次卵胞を単離し、卵胞培養を行う必要があると考えた。しかし、*in vitro* で分化した卵巣から二次卵胞を採取することができなかった。卵胞の基底膜を構成するラミニンの免疫染色を行ったところ、卵胞構造が欠如していることがわかった。

卵胞が形成されない原因を解明するために、培養 7 日目の卵巣と生体由来卵巣の RNA-seq 解析を行った。その結果、30000 を超える遺伝子の発現が認められ、*in vitro* 由来卵巣と生体由来卵巣の遺伝子発現プロファイルには高い相関が認められた（R = 0.99）。*in vitro* において卵巣の発生・分化プログラムは概ね正常に動いていることがわかった。一方、*in vitro* 由来卵巣と生体由来卵巣で差次的発現を呈する 547 遺伝子が抽出された。これらのパスウェイ解析を実施し、上流制御因子を推定した結果、β-エストラジオール、HP1、および β–カテニンが上位 3 因子としてこの順で抽出された。驚くべきことに、これら 3 因子はいずれもエストロジェン受容体に結合し転写を制御することが知られる因子であった。そのため、*in vitro* 環境ではエストロジェンシグナルが活性化し、卵胞形成が阻害されているのではないかと考えられた。そこで、原始卵胞が形成される時期、すなわち、培養 5 から 11 日目の期間のみ、従来の培地にエストロジェン受容体阻害剤（ICI 182,780; ICI）を添加し、培養 17 日目に卵胞形成を評価することにした。その結果、ICI 無添加区の卵巣では 1 卵巣あたり 6 ヶの二次卵胞しか回収されなかったのに対し、ICI を 1、5、および 10 μM 添加した区の卵

巣からは、それぞれ 44、53 および 82 ヶの二次卵胞を回収することが可能となり、卵胞形成不全が大幅に改善されることが示された。

得られた二次卵胞から成熟卵を分化させるため、コラゲナーゼ処理により、莢膜細胞層を除去した卵胞を培養した。卵胞培養培地には高分子化合物である PVP を添加した。PVP の添加は、無添加区で培養した卵胞と比較してサイトカインをコードする遺伝子の発現を有意に上昇させ、最終的に卵母細胞の生存率を 3 倍も増加させた。卵胞培養 12–14 日後に、卵母細胞と卵丘細胞の複合体を採取し成熟培養を実施したところ約 80%の卵母細胞が第一極体を放出し、第二減数分裂中期卵へと成熟した。これら成熟卵の核型を解析した結果 n=20 の半数体像が確認された。また、卵特異的な DNA メチル化インプリントが完了していることも示された。最後に、*in vitro* 由来卵の体外受精および胚移植後の発生能を解析した結果、胎仔生殖巣 1 ヶから最大で 7 匹のマウスが得られることが示された。以上により、始原生殖細胞から産仔へと発生しうる機能的な成熟卵を産生する新規 *in vitro* 系が確立されたことが証明された。

【研究の意義・展望】

現状において、*in vitro* で産生された卵の発生能は生体内で産生された卵と比較して格段に低い。生体内ではどのように機能的成熟度の高い卵が産生されるのだろうか。また、卵胞形成時、生体内ではどのようにエストロジェンシグナルを制御しているのだろうか。今後は、*in vitro* と生体内を比較解析する、あるいは、機能的成熟度の高い卵が産生できるよう *in vitro* 系を改変していくことによって、卵子形成機構の未解明部分を明らかにしていきたい。

【主な研究発表】

1. S. Mizumachi, T. Aritomi, K. Sasaki, K. Matsubara, and *Y. Hirao: Macromolecular crowded conditions strengthen contacts between mouse oocytes and companion granulosa cells during growth in vitro. ***J Reprod Dev***, 64, 153-160 (2018)
2. K. Morohaku, R. Tanimoto, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K. Hayashi, *Y. Hirao, and *Y. Obata: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 113, 9021-9026 (2016)
3. S. Hara, T. Takano, T. Fujikawa, M. Yamada, T. Wakai, T. Kono, and *Y. Obata: Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting. ***Hum Mol Genet***, 23, 3853-3864 (2014)

公募研究

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

Mechanism for gamete production in planarian sexualization regulated by FGF-Wnt signaling pathway

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０１）

研究代表者　　小林　一也（弘前大学・農学生命科学部・准教授）
連携研究者　　阿形　清和（京都大学・理学研究科・教授）
連携研究者　　織井　秀文（兵庫県立大学・生命理学研究科・助教）
連携研究者　　前澤　孝信（津山工業高等専門学校・講師）

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

Planarian sex-inducing substances break down the dormancy in postembryonic reproductive development regulated by Wnt signaling pathway

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２４９）

研究代表者　　小林　一也（弘前大学・農学生命科学部・准教授）
連携研究者　　織井　秀文（兵庫県立大学・生命理学研究科・助教）
連携研究者　　前澤　孝信（津山工業高等専門学校・准教授）

【研究の目的】

分化多能性幹細胞を持つプラナリアは、自切ののちに再生する、いわゆる無性生殖が可能である。また、必要な時に生殖器官を分化して配偶子を産生し有性生殖も行なうことができる。このように分化多能性幹細胞を持つ動物では胚発生後(postembryonic)に生殖器官を分化することが可能であり、成体が無性状態と有性状態とを切り替えるといった、胚発生時に生殖細胞を分化する動物とは異なるユニークな仕組みが存在していると考えられる。

自然界では環境要因の変化が刺激となり有性化に必須な機構がオンになることで、分化多能性幹細胞から生殖器官への分化の休眠状態が打破されるが、研究代表者はプラナリア（雌雄同体）*Dugesia ryukyuensis* の無性個体のクローン集団に有性個体を給餌することで、分化多能性幹細胞から卵巣や精巣といった生殖器官を誘導して実験的に有性化を引き起こせることを見出した。この有性化系は、有性個体に「有性化因子」と呼ばれる生理活性物質が含まれていることを意味している。そして、有性化因子の外部投与によって働き始める仕組みが、環境要因の変化がきっかけで直接的に働き始める本来の有性化機構であり、無性個体で有性化されないために抑制されている機構といえる。

本研究では、分化多能性幹細胞からの postembryonic な生殖細胞分化機構の解明を目的として、(1)先行研究で示唆されていた生殖器官分化に抑制的に働いている Wnt 分子の同定、(2) Wnt シグナル経路とは別に有性化因子の外部投与によって打破される有性化抑制機構（あるいは、誘導される有性化誘導機構）の解明、そして、(3)これらの機構のスイッチを切り替える有性化因子の同定を行った。

【研究の成果】

(1) 生殖器官の分化抑制に働いている

Wnt 分子の同定

卵巣分化を抑制している Wnt 分子として *Dr-wntA* を、精巣分化を抑制している Wnt 分子として *Dr-wntP1* を、そして卵黄腺分化に関与している Wnt 分子として *Dr-wntP3* と *Dr-wnt11-2* を同定した。

(2) 有性化に関与する新規機構

有性化因子の外部投与による刺激を与えて発現変動する遺伝子には有性化新規機構に関与する遺伝子が含まれていると仮定して RNA-seq 解析を行なったところ、候補遺伝子が 12 遺伝子得られた。12 遺伝子に含まれていた核内受容体ホモログについて RNAi 法による遺伝子機能解析を行なったところ、驚くことに、核内受容体ホモログのノックダウン個体に有性化因子の刺激を与えても全く有性化が起こらないことがわかった。有性化因子は親水性であるという事実とあわせて考えると、この結果は、親水性の有性化因子の刺激の下流では、脂溶性の化合物の産生と、その受容体の発現が誘導されていることを示唆する。つまり、この２つの仕組みが無性個体で有性化されないために抑制されている機構であり、有性化のためにはどちらか一方だけでなく、同時にこれら２つの機構がオンになる仕組みがあることが示唆された。

(3) 有性化因子の同定

先行研究で有性化因子のひとつ（卵巣誘導因子）として同定されていたトリプトファンが卵黄腺に大量に含まれているという発見から、有性化因子の候補化合物として卵黄腺に含まれている低分子化合物に注目し、メタボローム解析を行った。候補物質として絞りこんだ低分子化合物から、トリプトファン以外に 15 種の卵巣誘導因子と 3 種の完全有性化に必須な因子を同定した。

【研究の意義・展望】

プラナリアでは、５０年程前に有性化を引き起こす有性化因子と名付けられた化学物質の存在が示唆されていたが、本研究で、ついに完全有性化因子を 3 種、同定することに成功した。特に物質 A の生合成経路はこれまで細菌での合成経路しか報告がない。また、プラナリアのゲノム/トランスクリプトーム情報には物質 A の合成酵素ホモログは見当たらないことから、プラナリアに含まれている物質 A は細菌由来と考えられる。

生殖細胞を誘導する仕組みに共生細菌の存在が関与しているという本研究での発見は、配偶子産生制御の動物間での共通性を明らかにするという点で、新しい概念として提案していける。

【主な研究発表】

1. H. Nakagawa, K. Sekii, T. Maezawa, M. Kitamura, S. Miyashita, M. Abukawa, M. Matsumoto, and *K. Kobayashi: A comprehensive comparison of sex-inducing activity in asexual worms of the planarian *Dugesia ryukyuensis*: the crucial sex-inducing substance appears to be present in yolk glands in Tricladida. ***Zool Lett*,** 4: 14 (2018)
2. *K. Kobayashi, T. Maezawa, et al.: The identification of D-tryptophan as a bioactive substance for postembryonic ovarian development in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. ***Sci Rep*,** 7: 45175 (2017)

公募研究

生殖細胞の増殖制御に関与するWnt-Piwi シグナル系の解明

Wnt-Piwi signaling that regulates germ cell proliferation

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０２）

研究代表者　　山元　大輔（東北大学・大学院生命科学研究科・教授）

【研究の目的】

Drosophila の卵巣は、幹細胞を育むニッチの全細胞を同定して解析が可能な、幹細胞の in vivo 研究の花形である。そこから生物学の常識を覆す発見が次々生まれた。その最右翼にあるのは、パラサイト配列にあたる transposon の活動を抑止する機構が、ホストの世代継承に必須の機構を提供しているという進化のパラドックスであろう。この核心を担うのが Argonaute タンパク質の Piwi とそれに結合する microRNA 群、piRNA である。Piwi/piRNA による transposon silencing の機構が急速に明らかにされてきている反面、同じ複合体がいかにして生殖幹細胞の増殖・分化を制御し、ホストゲノムの継承を可能にするのかについては多くが不明である。パラサイトからホストゲノム継承の主導者へ、Piwi/piRNA のこの変容の実態を理解することは、生物進化の謎解明にとっての鍵となる。

【研究の成果】

(1)Btk29A による Wnt4-Piwi を介した増殖制御

幹細胞の増殖そして分化の場はニッチとよばれている。もっともよく定式化されているのがショウジョウバエの生殖幹細胞（GSC）とそのニッチである。ここでは GSC が、体細胞により構成されるニッチからのシグナルをうけて自己複製しつつ、同時に、卵細胞への分化を運命づけられた娘細胞、すなわち cystoblast を生み出す。この増殖と分化のバランスが損なわれると、GSC が消滅して生殖細胞がなったり、反対に、幹細胞や cystoblast が過剰につくられて腫瘍化することになる。我々は、GSC のニッチにおいて Tec family のチロシンキナーゼ、Btk29A のはたらきにより Armadillo（Arm: βカテニン・オルソローグ）がチロシンリン酸化されると、Arm の転写活性化能が亢進し *piwi* 遺伝子の発現が上昇する結果、ニッチ起源の Piwi 依存性シグナルを介して cystoblast の増殖が止まり、卵細胞への分化に進むことを発見した。哺乳類細胞を用いた場合も同様に、Btk によってβカテニンのチロシンリン酸化と転写活性化能が上昇したことから、これは進化的に保存された発生のスイッチ機構であると思われる。

【研究の意義・展望】

本研究により、ニッチが生殖幹細胞の増殖を抑制する機構の一端が見えて来た。しかし、なおも多くが不明のままである。例えば、チロシンリン酸化されたβカテニンが *piwi* 遺伝子の転写を活性化する道筋が不明である。また、Piwi に依存性してニッチから出るシグナルの実体は何か、という重要な問いも残っている。さらには、cystoblast の増殖を停めるメカニズムは何かという疑問にも答えなければならない。これまでの研究で、Btk29A の機能が低下すると Bam の結合パートナー Bgcn をコードする遺伝子の転写が顕著に上昇していることがわかっているほか、Bam-Bgcn 複合体の翻訳制御を受ける ***mei-P26*** 遺伝子の欠損が、Btk29A 変異体と同様の生殖細胞の過剰増殖を惹起することが知られている。あるいは、ニッチ由来シグナルの作用点はここかもしれない。今後の解明が待たれる。

【主な研究発表】

1. N. Hamada-Kawaguchi, Y. Nishida, and *D. Yamamoto: Btk29A-mediated tyrosine phosphorylation of armadillo/β-catenin promotes ring canal growth in *Drosophila* oogenesis. ***PLoS One***, 24;10(3):e0121484. doi: 10.1371/journal.pone.0121484 (2015)

公募研究

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

Molecular Basis of a Sertoli Valve Niche in Mammalian Testes

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０４）
２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５１）

研究代表者　　金井　克晃（東京大学・農学生命科学研究科・准教授）

【研究の目的】

哺乳類の精子は曲精細管で恒常的に産生され、曲精細管から直精細管-精巣網を経て、精巣上体へと運ばれる。曲精細管での恒常的な精子形成は精原幹細胞(SSC)の自己複製により制御されており、SSC は曲精細管全域の基底区画に幅広く存在する(open ニッチ)。申請者らは、曲精細管の open ニッチとは別の SSC の安定供給源が、直精細管のセルトリバルブ(SV;特殊なセルトリ細胞で構成され、精巣網から精細管への精子/管腔液の逆流防止弁を構築)に存在することを見出した。本研究課題は、この進化的に保存された SV ニッチの制御メカミズムを解明することにより、無脊椎動物から哺乳類に至る生殖幹細胞ニッチの共通性、普遍性を探求することを目的とした。

【研究の成果】

(1) 哺乳類の精細管基部の SV ニッチの特性

ハムスター、マウスの直精細管内の SV 領域の解析の結果、①SV ニッチは、無脊椎動物の SSC ニッチの組織構造と類似し、精巣の全ての精細管の基部に存在すること、②SV 領域内のセルトリ細胞は、GDNF, WNT5 等のニッチ因子を恒常的に分泌し、③SV 内では、恒常的に SSCs を維持すると同時に、c-Kit 陽性の精原細胞への分化が抑制されていることが判明した。また、④ハムスター精巣では、SV 中のセルトリ細胞は、セルトリ前駆細胞を含んでおり、成体において増殖し、曲精細管側にセルトリ細胞を供給することが明らかとなった。つまり、SV ニッチは、ショウジョウバエの SSC ニッチ構造と極めて類似し、生殖幹細胞と支持前駆細胞を維持していることが判明した(Aiyama et al, 2015)。

(2) マウス SV ニッチの分子基盤

SV 領域を単離し、網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、SV 領域で特異的に高発現を示す 352 遺伝子の同定に成功した。さらに、single cell RNA seq 解析により、SV 領域のセルトリ細胞の個々の発現プロファイルを得ることにも成功した。これらの同定された SV 領域を特徴付ける鍵遺伝子群に着目し、シグナル因子を含む鍵遺伝子の発現パターン、AMH-Treck マウスを用いた SV 領域の再構築系での解析の結果、①SV 領域は、FGF シグナルが上昇、レチノイン酸シグナルが抑制されており、これらのバランスにより SV 構造が維持されていることを見出した（Kishi et al,投稿中)。②無脊椎動物から保存されたニッチ領域のシグナル因子である pSTAT、pAKT の恒常的な活性化が SV ニッチでも誘導されることを見出した(Nagasawa et al, 2018)。③これらの SV 特異的なシグナル経路の活性化は、luminal flow が形成する生後 2 週齢から開始すること、④様々なイオンチャンネル分子が SV 領域に特異的に発現していることから、SV 領域が精細管内の管腔液の flow 形成にも関与している可能性も示唆された。さらに、⑥実験的に精巣輸出管の結紮により flow を止めた場合、24 時間以内に SV ニッチ内の SSCs が増殖し、SV 領域で SSCs がリング状に集積することを見出し、SV 領域の SSCs の動態は管腔内の flow

と密接に関連していることが判明した。

(3) SV ニッチを規定するシグナル因子の機能解析系の開発

in vivo でのシグナル因子の機能解析の実験系として、GDNF を染み込ませたビーズを精巣間質へ移植することにより、一過性（1-5 日間）にビーズ付近のみで GFRa1 陽性細胞の集積とそれ以降の精子形成の抑制に成功した。ビーズ移植法という生体での SSC ニッチ因子の簡便な機能アッセイ系の確立に成功した(Uchida et al, 2016; Kitadate et al, 2019)。

【研究の意義・展望】

SV ニッチの発見とその分子基盤の研究成果を通して、SSC ニッチの多様性と進化に対して新たな研究分野の創出に繋がっていくものと信じている。今後、様々な哺乳動物での SSC の研究材料としての SV ニッチの価値が高まるものと期待される。

【主な研究発表】

1. Y. Kitadate, D.J. Jörg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, *B.D. Simons, and *S. Yoshida: Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. ***Cell Stem Cell***, in press (2019)
2. H. Igarashi, M. Uemura, R. Hiramatsu, R. Hiramatsu, S. Segami, M. Pattarapanawan, Y. Hirate, Y. Yoshimura, H. Hashimoto, H. Higashiyama, H. Sumitomo, M. Kurohmaru, Y. Saijoh, H. Suemizu, M. Kanai-Azuma, and *Y. Kanai: Sox17 is essential for proper formation of the marginal zone of extraembryonic endoderm adjacent to a developing mouse placental disk. ***Biology of Reproduction***, 99, 578-589 (2018)
3. K. Nagasawa, K. Imura-Kishi, A. Uchida, R. Hiramatsu, M. Kurohmaru, and *Y. Kanai: Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in the seminiferous epithelia of mouse testes. ***Molecular Reproduction and Devevelopment***, 85, 262-270 (2018)
4. Y. Kawai, A. Oda, Y. Kanai, and *R. Goitsuka: Germ cell-intrinsic requirement for the homeodomain transcription factor PKnox1/Prep1 in adult spermatogenesis. ***PLoS ONE***, 13, e0190702 (2018)
5. K. Kishi, A. Uchida, H.M. Takase, H. Suzuki, M. Kurohmaru, N. Tsunekawa, M. Kanai-Azuma, S.A. Wood, and *Y. Kanai: Spermatogonial deubiquitinase USP9X is essential for proper spermatogenesis in mice. ***Reproduction***, 154, 135-143. (2017)
6. A. Uchida, K. Kishi, Y. Aiyama, K. Miura, M.H. Takase, H. Suzuki, M. Kanai-Azuma, T. Iwamori, M. Kurohmaru, N. Tsunekawa, and *Y. Kanai: In vivo dynamics of GFRα1-positive spermatogonia stimulated by GDNF signals using a bead transplantation assay. ***Biochemical and Biophysical Research Communications,*** 476, 546-552 (2016)
7. Y. Aiyama, N. Tsunekawa, K. Kishi, A. Yoneda, H. Suzuki, M. Kanai-Azuma, M. Kurohmaru, and *Y. Kanai: Niche for GFRα1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in mammalian testes. ***Stem Cells,*** 33, 2811-2824 (2015)

公募研究

哺乳類生殖細胞におけるRNP顆粒の形成機構と機能

Assembly of RNP granules and their functions in mammalian germ cells

２０１４年度〜２０１５年度（２６１１４５０５）

始原生殖細胞における潜在的分化多能性の制御機構

Potential pluripotency in primordial germ cells.

２０１６年度〜２０１７年度（１６Ｈ０１２５２）

研究代表者　　鈴木敦（横浜国立大学・工学研究院・准教授）

【研究の目的】

生殖細胞は配偶子へと一方向に分化する単能性の細胞であるが、潜在的に多能性を保持していると考えられている。その傍証として、マウス始原生殖細胞（PGCs）が精細管内で初期胚様細胞へと転換して分化多能性の精巣テラトーマを生じること、また、始原生殖細胞を特定の条件下で培養すると分化多能性のEG細胞を生じることなどが挙げられる。これらの現象は生殖細胞が保持する潜在的な分化多能性が顕在化した結果であり、このような多能性は配偶子形成過程においては抑制されていると考えられる。しかしながら、その制御機構は未だに不明である。我々は、マウスの始原生殖細胞を題材として、生殖細胞が潜在的な分化多能性を制御する機構の解明を目指している。本研究においては、RNA 結合タンパク質 Dead end1（DND1）に注目し、その機能を解析することで、始原生殖細胞が多能性を保持しつつも発現させることなく配偶子へと分化する機構の解明を目指した。

【研究の成果】

(1) DND1はNANOS2と結合して始原生殖細胞の雄性分化を促進する

DND1の機能を解析するために、胎生15.5日目の雄性生殖巣抽出液から DND1 を免疫沈降により回収し、その結合タンパク質を質量分析により解析した。その結果、RNA 結合タンパク質 NANOS2 を同定した。NANOS2 との結合の生理的意義を解析するために、Dnd1 遺伝子のエキソン 2 と 3 を flox 配列で挟んだ Dnd1-flox マウスを作製し、NANOS2 の発現する胎生 12.5 日目に薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼによって PGC 特異的に DND1 を欠損させた。その結果、NANOS2 欠損マウスと同様の表現型が観察されたことから、DND1 は NANOS2 と協同して始原生殖細胞の雄性分化を促進することが示された（Suzuki A, et a. *EMBO Rep*. 2016）。

(2) 移動期PGCにおけるDnd1の欠損は精巣テラトーマの発症を誘発する

上述の Dnd1 条件付き欠損マウスにおいて、始原生殖細胞が移動期の胎生 10.5 日目に薬剤誘導により DND1 を欠損させ、生後において精巣の表現型を解析した。当初、DND1 の欠損により NANOS2 が機能しなくなるために NANOS2 欠損マウスと同様の表現型が観察されると予想された。しかしながら、予想に反して、この DND1 条件付き欠損マウスは精巣テラトーマを発症することが明らかになった。その発症率は、24 個体のうち 23 個体であり、95.8%であった。薬剤投与を胎生 11.5 日と 12.5 日へと遅らせると、発症率はそれぞれ 46.2%, 0%と低下し、PGCs が移動期に DND1 を欠損することが精巣テラトーマの発症に大きく寄与することが明らかになった。

(3)Dnd1 欠損 PGC の EG 細胞への転換しやすい

マウス PGCs は LIF, FGF, KitL 存在下で培養すると多能性細胞である EG 細胞へと転換することが知られている。DND1 を欠損する PGCs は生体内で多能性細胞へと転換することから、培養下で EG 細胞への転換効率が高いことが予想された。そこで、Dnd1 条件付き欠損マウスの PGCs を EG 細胞樹立系で培養した。その結果、その樹立効率はコントロールに比べて優位に高いことが明らかになった。これは、DND1 を欠損する細胞が in vitro で多能性細胞へと転換しやすいことを示すと共に、精巣テラトーマの発症を in vitro で解析できることを示している。

(4)Dnd1 は精原細胞の維持に必須である

一方、DND1 は生後の精巣において精原細胞特異的に発現するが、その機能は不明である。そこで、生後 4 週齢で薬剤投与により DND1 を欠損させたところ、3 ヶ月齢においては精巣重量が半分以下になり不妊となった。そこで、薬剤投与から 1 週間後の 5 週齢で解析を行ったところ、c-Kit 陽性の分化型精原細胞が劇的に減少していた。一方で、未分化型精原細胞においては、GFRa1 陽性の A_{s} と A_{pr} の細胞が減少するが、A_{al4} はやや増加し、それ以降の A_{al} は変化がなかった。このことから、DND1 は分化型と未分化型の精原細胞において、異なる分子機構によりこれらの細胞の維持に機能することが示唆された（Niimi Y, et al. *Dev Biol*. 2019）。

【研究の意義・展望】

以上の研究により、DND1 の生殖細胞発生における機能が明らかになるとともに、その欠損による精巣テラトーマ発症の分子機構も明らかになりつつある。今後は、DND1 欠損 PGC のトランスクリプトーム解析により同定した遺伝子を中心に、精巣テラトーマ発症の具体的な原因遺伝子を明らかにできると期待できる。

【主な研究発表】

1. Y. Niimi, A. Imai, H. Nishimura, K. Yui, A. Kikuchi, H. Koike, Y. Saga, and *A. Suzuki: Essential role of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonia. ***Developmental Biology***, 445, 103-112 (2019)
2. *A. Suzuki, Y. Niimi, K. Shinmyozu, Z. Zhou, M. Kiso, *Y. Saga: 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)

公募研究

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

Identification of ICB associated factors and analyses of their effects on the growth of connecting cells for *in vitro* spermatogenesis

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０６）

研究代表者　　岩森督子（九州大学・大学院医学研究院・助教）

【研究の目的】

精子形成において生殖細胞は一生を通じて生殖細胞間架橋（ICB）により連結したまま分化増殖する。卵子形成では胎児期に卵原細胞を連結していたICBは生後まもなく消失する。ICBを欠損した雄マウスでは精子形成の破綻による雄性不妊になり、雌マウスでは卵母細胞数が半減した。このように、ICBは精子形成において必要不可欠な構造体であるが、その構成因子や機能など詳細は未明であった。そこで、ICBの存在意義の解明を目的として“生殖細胞間架橋関連因子の同定”を遂行した。

ICB関連因子を網羅的に同定し、同定タンパク質の局在および相互作用等を解析する。本研究成果を統合的に解析する事により、精子形成におけるICBの機能解明に近づき、質の良い体外精子形成の実現への一助になることを目標としている。

【研究の成果】

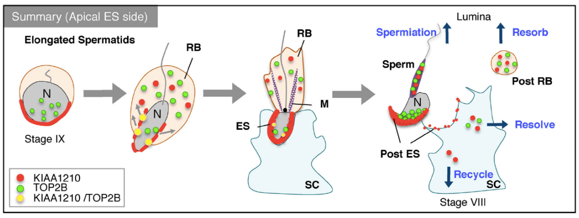
(1) ICB 関連因子の網羅的同定

これまでの我々の研究から、精巣内でICBは精子形成のステージによって ICB 構成因子や環状 ICB の直径が変化する。そこで、異なる週令のマウス精巣から ICB を濃縮精製し、プロテオミクス解析により精子形成過程ごとの ICB 関連因子プロファイリングを行った。さらに、同定した ICB 関連タンパク質の抗体を作製し、免疫沈降–プロテオミクス、免疫沈降-RNA シークエンスを行った。得られた結果の解析から複合体を構成する因子を同定し、ICB の機能的に中心に位置する因子をプロファイリングした。

個々の遺伝子解析や相互作用予測を進め、遺伝子・相互作用ネットワークの理解が進展した。

(2) ICB 関連新規遺伝子 KIAA1210 の発見

(1)で同定された新規遺伝子KIAA1210について詳細な解析を行った。その結果、KIAA1210はICBタンパク質と相互作用し、かつAcrosome-Ectoplasmic Specialization（EPS）関連遺伝子であることを発見した（BOR. 2017）。さらに、KIAA1210中に核酸二本鎖切断に機能することで知られているTopoisomerase2B（TOP2B）との結合が予想されるドメインを発見した。精巣においてTOP2Bは円形精細胞から伸長期精細胞にかけて核に局在することが報告されていたため、KIAA1210とTOP2Bとの関連性を詳細に解析したところ、KIAA1210はEPS近傍においてTOP2Bと共局在しており、精子形成における精子頭部のコンパクト化に機能していることが予想された（図説）。



また、パキテン期精母細胞の核内においてもKIAA1210-TOP2Bの共局在が同定されており、減数分裂過程においても何らかの機能をしていることが予想される。現在、KIAA1210のノックアウトマウスを作製・解

析しており、精子形成異常を確認している。KIAA1210の発見により、ICBと核酸の関連性という予期しなかった結果が得られ、ICBの機能の可能性が広がった。

【研究の意義・展望】

本研究では ICB 関連因子の網羅的な同定により、ICB 関連タンパク質の膨大な情報が得られた。さらに、複数の免疫沈降プロテオミクスの結果から詳細な相互作用情報が得られ、ICB 構築や機能的にコアな部分に位置すると予想されるタンパク質群を同定できた。特に、KIAA1210 という ICB 以外に複数の局在を示すタンパク質が同定されたことから、ICB が単に生殖細胞間の同調化などに機能しているだけではなく、精子形成全般において重要な役割を果たしている事が示唆された。

また、KIAA1210 と TOP2B との関連性から、核酸と ICB の関係性を追求する研究を継続している。今後、個々の ICB 構成因子について、さらに詳細な機能解析や相互作用解析を行う事により、ICB の機能を解明できることが期待される。その成果は、生殖生物学分野の重要な知見となるだけでなく、応用研究においても活用が期待される。

【主な研究発表】

1. *T Iwamori, N Iwamori, M Matsumoto, E Ono, MM Matzuk: 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 (2), 469-477 (2017)
2. N Iwamori, K Tominaga, Sato T, Riehle K, T Iwamori, Y Ohkawa, C Coarfa, E Ono, and MM Matzuk: MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 113(37): E5408-15. (2016)

公募研究

シヨ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

Search and molecular functional analysis of new factors that control the formation and differentiation of Drosophila germ cells

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０８）

研究代表者　　中村　輝（熊本大学・発生医学研究所・教授）
連携研究者　　田中　翼（熊本大学・発生医学研究所・助教）

【研究の目的】

生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝える役割を担う細胞系列であり、生物種の維持や進化に対して重要な役割を果たしている。その形成機構の解明は発生生物学における最重要課題の 1 つである。多くの動物において、生殖細胞の形成・分化は、生殖質とよばれる領域に局在する母性因子の作用により制御される。本研究では、ショウジョウバエをモデルとして、殖細胞形成・分化に関わる新規母性因子の同定すすめ、生殖細胞形成分化に関する知見を深めることを目的とした。

【研究の成果】

(1) 遺伝子ノックダウン法による新規因子のスクリーニング

卵形成初期過程では発現せず、中期以降から生殖系列で特に的に活性化する Gal4 系統を選出し、その Gal4 の制御下で短鎖ヘアピン RNA (shRNA) を発現させせることにより、標的遺伝子の機能を卵形成初期では維持しつつ、中期以降生殖細胞でノックダウンすることを計画し、2267 の TRiP 系統をスクリーニングした。その結果、表現型を以下のように分類した。

① 胚発生が正常に進行する 1742 系統
② 卵を全く、あるいはほとんど生まない 37 系統
③ 胞胚期まで胚が発生しない 94 系統
④ 20%異常の胚において生殖細胞の発生に異常を示す 170 系統
⑤ 胚の形態異常を示す 224 系統

さらに、④の分類群のうち、既知の遺伝子を除いて生殖細胞の挙動に異常を生じる割合の高い 67 系統について、再解析を行った。その結果、２次スクリーニングでも生殖細胞の挙動に異常を生じる系統が 37 (32 遺伝子) 得られた。

(2) 遺伝子ノックアウト系統作出によるスクリーニング

上記スクリーニングとは別個に、分子生物学的側面から生殖細胞発生に関わる候補遺伝子を選出し、CRISPR-Cas9 により候補遺伝子のノックアウト系統を作製して機能欠失胚における表現型解析を進めた。候補遺伝子の選出に当たって、ゲノムワイドな *in situ* hybridization により mRNA が生殖質に集積することが報告されている機能未知遺伝子、RNA-seq によりトランスクリプトームプロフィールが既知の生殖質因子と似ている機能未知遺伝子を標的とした。その結果、トランスクリプトームプロフィールが生殖質因子型であった *CG14036* をノックアウトした雌由来の胚では、生殖細胞形成が不全となることが判明した。

【研究の意義・展望】

ノックダウンスクリーニングにより、生殖細胞の形成や挙動に関わる新規候補として 32 遺伝子を得ることができた。興味深いことに、これら新規候補遺伝子は、分子機能によって、転写因子、クロマチン制御、mTOR 経路などに分類することが可能であった。

一方、*CG14036* 遺伝子はわずか 93 アミノ

酸残基の小タンパク質をコードする。このタンパク質配列は，ショウジョウバエから、線虫、マウス・人に至るまで保存されていることから、生殖細胞形成に共通して働く因子である可能性がある。

今回得られた遺伝子について、それらの生殖細胞機能における解析を進めることにより、生殖細胞の形成・分化における新たな制御メカニズムが明らかにされることが期待される。

【主な研究発表】

1. *K. Kikuchi, A. Nakamura, M. Arata, D. Shi, M. Nakagawa, T. Tanaka, T. Uemura, T. Fujimori, A. Kikuchi, A. Uezu, Y. Sakamoto, and *H. Nakanishi: Map7/7D1 and Dvl form a feedback loop that facilitates microtubule remodeling and Wnt5a signaling. ***EMBO Rep***, e45471 (2018).
2. M. Yamane, S. Ohtsuka, K. Matsuura, A. Nakamura, M. Okano, and *H. Niwa: Overlapping functions of Krüppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain naïve pluripotency of mouse embryonic stem cells. ***Development*** , 145, dev162404 (2018).
3. *H. Niwa, A. Nakamura, M. Urata, M. Shirae-Kurabayashi, S. Kuraku, and S. Ohtsuka: The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells. ***BMC Evol Biol*** , 16, 173 (2016).
4. G. Liu, P. Sanghavi, K. E. Bollinger, L.Perry, B. Marshall, P. Roon, T. Tanaka, A. Nakamura, and *G. B. Gonsalvez: Efficient endocytic uptake and maturation in *Drosophila* oocytes requires Dynamitin/p50. **Genetics**, 201, 631-649 (2015).
5. *H. Sano, A. Nakamura, M. Texada, J. W. Truman, H. Ishimoto, A. Kamikouchi, Y. Nibu, K. Kume, T. Ida, and M. Kojima: The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. ***PLOS Genet***, 11, e1005209 (2015).
6. G. Kim, C.-I. Pai, K. Sato, M. D. Person , A. Nakamura, and *P. M. Macdonald: Region-specific activation of *oskar* mRNA translation by inhibition of Bruno-mediated repression. ***PLOS Genet***, 11, e1004992 (2015).

公募研究

RNA 制御による原始卵胞維持機構の解明

RNA regulatory mechanisms involved in the sustainability of primordial follicles

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５１２）

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

Role of antagonistic interaction between two RNA-binding proteins in the activation of primordial follicles

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５９）

研究代表者　　加藤　譲　（国立遺伝学研究所・発生工学研究室・助教）

【研究の目的】

哺乳動物の雌にとって生殖可能期間を通して継続的に卵子を産生することは、種の存続に必須である。本研究では卵子のリザーバーとして卵巣内で保持されている「原始卵胞」の形成及びその活性化制御機構を明らかにするため、マウスを用いて主に遺伝学的手法により研究を行った。

他のモデル動物を含め、卵形成過程では種特異的あるいは進化的に保存された RNA 結合タンパク質が必須な役割を果たすことが知られている。一方、原始卵胞における RNA 制御に関する知見は極めて乏しい。そこで本研究は RNA 制御が介する分子機構に着目し、原始卵胞の形成及び活性化制御に関与する RNA 結合タンパク質の同定を目指した。

【研究の成果】

(1)RNA 結合タンパク質 ELAVL2 は原始卵胞の形成に必須である。

まず原始卵胞形成に関与する RNA 結合タンパク質を同定するため、出生前後の卵巣を用いたマイクアレイによるスクリーニングを行い、ELAVL2 を同定した。*Elavl2* ノックアウト(KO)マウスにおける解析から、*Elavl2* は原始卵胞の形成に必須であることが明らかとなった（加藤ら投稿中）。

(2)ELAVL2 は原始卵胞の活性化制御に関与する。

ELAVL2 は原始卵胞形成以降も卵母細胞特異的に発現するが、免疫染色においてその発現は原始卵胞の活性化により生じる一次・二次卵胞において強くなり、卵母細胞が十分成長すると一転して発現が減少することを見出した。ELAVL2 の発現量と卵母細胞の大きさの関係について定量的に解析するため、我々は *Elavl2*-venus 融合ノックインマウスを作成し、卵巣の透明化・画像解析を行い、上述の結果を支持する結果を得た。

ELAVL2 の発現量と原始卵胞活性化の関係を明らかにするため、卵母細胞特異的 *Elavl2* KO・*Elavl2* 過剰発現マウス(OE)を作成し、解析を行った。その結果、*Elavl2* KO 卵巣では原始卵胞を含め全ての卵母細胞が死滅した。このことは、ELAVL2 が卵母細胞の生存に必須であることを示す重要な結果であるが、残念ながら原始卵胞の活性化について知見を得ることはできなかった。一方、*Elavl2* OE 卵巣では原始卵胞は野生型よりも早い速度で減少し、同時に活性化卵胞の増加が見られた。このことから ELAVL2 が原始卵胞の活性化に寄与することが示された。

(3)ELAVL2 に拮抗する候補因子 A は原始卵胞の維持に関与する

ELAVL2 は翻訳の促進に関与することが知られている。そこで我々は原始卵胞においてELAVL2に対し拮抗的に働くRNA結合タンパク質の存在を仮定し、その候補因子の探索を行った。その結果、RNA の分解に関与することが報告されている候補遺伝子 A を見出した。

A は卵巣において卵母細胞特異的に発現する。興味深いことに、A は ELAVL2 とは逆に原始卵胞において高発現し、活性化した卵胞で発現が減少する。培養細胞におけるレポーターアッセイから、A は *Elavl2* の発現を抑制する効果を持つことが示された。

上述の結果から、A は ELAVL2 に対し拮抗的に働き原始卵胞の維持に働く可能性が示唆された。この可能性を検証するため、A の KO マウスを作成・解析したところ、ELAVL2 の発現が増加し、*Elavl2* OE 卵巣とよく似た表現型を示した。

(1) (2)の結果から、原始卵胞の活性化制御においてELAVL2・A が介するRNA制御が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

【研究の意義・展望】

原始卵胞活性化制御に関するこれまでの知見から、卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞由来のシグナルが卵母細胞の活性化を促すことが知られている。すなわち、原始卵胞活性化に際し卵母細胞は受動的であると認識されてきた。本研究から得られた成果により卵母細胞において活性化をコントロールする機構が存在することが示唆された。今後は顆粒膜細胞由来のシグナルと卵母細胞の活性化制御との関係を明らかにしてゆくことが課題となると思われる。

本研究では主に遺伝学的手法により原始卵胞活性化制御関連因子の同定を行った。今後はこれら因子の分子・生化学的機能解析を行い、RNA 制御が介する原始卵胞活性化制御機構の解明が必要であろう。

また、他のモデル生物を用いた卵形成研究の成果によると卵母細胞における細胞質RNP顆粒がRNA制御にとって極めて重要な役割を果たしている。しかし、哺乳動物における細胞質 RNP 顆粒について知見は未だ乏しい。本研究成果により原始卵胞における RNA 結合タンパク質の重要性が示されたことから、今後細胞質 RNP 顆粒に着目した研究を展開する必要があると思われる。

【主な研究発表】

1. K. Fukuda, A. masuda, T. Naka, A. Suzuki, *Y. Kato, and *Y. Saga: Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in oocytes for pre-implantation mouse development. ***PLOS Genetics***, 14(6): e1007436. (2018)
2. Q. Wu, K. Fukuda, Y. Kato, Z. Zhou, CX. Deng, and *Y. Saga: Sexual fate change of XX germ cells caused by the deletion of SMAD4 and STRA8 independent of somatic sex reprogramming. ***PLOS Biology***, 8; 14(9): e1002553. (2016)
3. Y. Kato, T. Katsuki, H. Kokubo, A. Masuda, and *Y. Saga: Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. ***Nature Communications***, 13; 7:11272. (2016)

公募研究

カタユウレイボヤPGC形成に関わる遺伝子発現制御機構の解析

Analysis of gene expression and regulation for PGC formation in the ascidian, *Ciona robusta*

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５１３）

研究代表者　白江（倉林）麻貴　（名古屋大学・理学研究科・特任助教）
連携研究者　山本　卓　（広島大学・理学研究科・教授）
連携研究者　笹倉　靖徳　（筑波大学・生命環境系・教授）
連携研究者　佐久間哲史　（広島大学・理学研究科・特任講師）
連携研究者　和田　修一　（長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授）
連携研究者　砂長　毅　（高知大学・自然科学系・講師）

【研究の目的】

動物は、体内に次世代を担う配偶子の元となる細胞「始原生殖細胞（primordial germ cell, PGC）」を持つ。PCGは主に以下の２種類の方法で形成される。１）卵形成時に「生殖質」が蓄積され、発生過程にこれを取り込んだ細胞が分化する。２）胚発生期又は成体期に細胞間相互作用により分化する。PGC形成様式は動物の進化過程においてダイナミックに変遷してきたと予想されるが、その進化メカニズムや普遍原理は不明である。興味深いことに、原索動物カタユウレイボヤは上記２通りのPGC形成を併せ持つことが知られる。報告者は、本種のPGC形成に関わる遺伝子発現カスケードの比較解析を通じ、PGC形成の進化メカニズム関する新規知見を得たいと考えている。

【研究の成果】

(1) 人工ヌクレアーゼを用いた生殖関連遺伝子TDRD7のノックアウト解析

これまで、カタユウレイボヤには胚発生期以降の遺伝子機能解析手法がなく、発生後期に起こる生殖細胞分化に関与する遺伝子の機能解析は困難だった。報告者は、連携研究者の山本・佐久間らが開発したPlatinum TALENを用いた生殖細胞関連因子TDRD7のノックアウト解析を試み、成果を得た。

TDRD7は、哺乳類では精細胞のクロマトイド小体に局在し、ホモ変異個体は不稔になる。そこでカタユウレイボヤホモログについて調べると、TDRD7はPGCを含む雌性雄性双方の生殖系列細胞に発現すること、卵生殖質内の生殖顆粒に局在し、胚発生期にPGCにのみ引き継がれることが分かった。次に初期発生におけるTDRD7の機能を解析するために、モルフォリノヌクレオチド(MO)を用いたノックダウンを試みた。卵にTDRD7に対するMOを注入すると、幼生期から変態期にかけて、PGCにTDRD7はほとんど発現しなくなった。しかし、その後PGCにおけるTDRD7は復活し、受精能力のある配偶子が産生された。つまりTDRD7は初期発生のPGC分化に役割を持たない可能性があるが、MOによる発生初期における一過的な翻訳抑制では機能解析として不十分である。そこで報告者はゲノム編集によるノックアウト個体作成を試みた。

カタユウレイボヤTDRD7遺伝子の翻訳開始領域付近を標的とするTALENを作成し卵に注入したところ、90%以上の高い変異効率を示した。ホヤは雌雄同体であり、卵の酸性処理によって自家受精が可能である。そこでTALEN注入個体G0から得られた配偶子同士を自家受精させると、30%以上の確率でホモの変異個体F1が得られた。ホモ変異体は一見正常な卵巣を持ち、受精能を有する卵を産生した。しかし一方で精巣は萎縮し、精子の産生はヘテロ変異体と比較してもごくわずか

であり、ほぼ不稔といえた。

ハエのTDRD7はホヤと同様雌雄配偶子の生殖顆粒に局在するが、ノックアウトによって生殖機能に大きな影響はない。一方で、本研究によりホヤTDRD7は哺乳類と同様、雄性配偶子の分化に重要な役割を果たすことが示唆された。また、カタユウレイボヤではTALENを用いたノックアウトと人工自家受精により、F1のノックアウト個体作成が可能であることが分かった。現在は本実験の再現実験を行い、さらにF1ホモの母性TDRD7を失った卵における生殖細胞形成について解析を進めており論文投稿を準備している。

一方、上記の手法では、初期発生に重要な機能があり生殖細胞形成にも何らかの機能を持つ遺伝子群の解析が不可能である。実際に、生殖細胞関連転写因子*GCNF*や*Pou2*などの転写因子をTALENでノックアウトすると、幼生は変態せずに死んでしまう。連携研究者の笹倉らは、*Not1*や*TnI*など体組織特異的な胚性発現を示す遺伝子のシス領域を利用し、変態後後生的に出現するPGCにおいて高効率にTALENを発現させることに成功した。現在本システムによる上述遺伝子の機能解析を進めている。

【研究の意義・展望】

本研究では、①ゲノム編集による生殖細胞関連遺伝子のノックアウト解析、②シス領域を利用した PGC のマーキング、③マーキングした PGC を用いた RNAseq によるホヤ生殖細胞関連遺伝子の網羅的解析を 3 本の柱としていた。結果として、①についてはゲノム編集によるノックアウトホヤ作成について解析手法が確立し成果が得られた。しかし②、③については課題が残った。②については PGC マーキングについて再現性が得られず、③へとつなげることができなかった。しかし最近、別のグループが *Vasa* プロモーターを用いた PGC マーキングに成功したため、報告者が意図したような生殖細胞関連因子の網羅的な解析への道筋がつけられている。一方で、③で明らかにされる予定の関連因子の機能解析には①のノックアウトが必須である。本研究で得られた成果により、今後カタユウレイボヤの生殖細胞分化メカニズムの解明が進み、ひいては動物生殖細胞形成における基本メカニズムや普遍原理の理解に大きな貢献が望めると考える。

【主な研究発表】

1. *M. Shirae-Kurabayashi, and A. Nakamura: Germ-Cell Formation in Solitary Ascidians: Coexistence of Preformation and Epigenesis. ***Reproductive and Developmental Strategies***, 3-18 (2018)
2. K. Yoshida, A. Hozumi, N. Treen, T. Sakuma, T. Yamamoto, M. Shirae-Kurabayashi, and *Y.Sasakura: Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian Ciona intestinalis reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. ***Developmental Biology*** 423, 111-125 (2017)

公募研究

ミツバチの生殖機能制御機構の解析

Investigation of mechanism underlying fecundity in honeybees

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５０９）

研究代表者　　鎌倉昌樹（富山県立大学・工学部生物工学科・講師）

【研究の目的】

ミツバチは女王蜂と働き蜂からなる階級社会（カースト）を形成しており，同じ遺伝子型をもつ雌の幼虫のなかでも働き蜂の分泌するローヤルゼリーを摂取した個体のみが女王蜂へと分化することから、ミツバチの発生および分化においてはローヤルゼリー（RJ）によるエピジェネティックな調節が行われている。女王蜂は働き蜂に比べ、体サイズが 1.5 倍、寿命が 20 倍であり、1 日に 2000 個の卵を産むという特徴をもっている。本申請者はこれまでにミツバチのカースト分化誘導機構について解析した結果、RJ 中に含まれる「ロイヤラクチン」というタンパク質が、上皮増殖因子受容体（EGFR）を介して女王蜂の分化を誘導することを明らかにした。しかし、これまでにミツバチの生殖制御機構の詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、ミツバチの生殖機能の制御機構を明らかにする研究を実施した。本研究の実施により女王蜂の卵形成機構が明らかになることで、高い生殖能を有す女王蜂の安定供給が可能となり、ミツバチ不足の問題解決に貢献できるものと期待できる。

【研究の成果】

(1) 女王蜂において卵巣小管が増加する分子機構の解析

働き蜂は卵巣小管の数が約 1-5 本なのに対し女王蜂の卵巣小管は 200 本以上に発達する。この卵巣発達の違いは、幼虫期に RJ を摂取するか否かでもたらされる。女王蜂と働き蜂のとの間での卵巣発達における違いがどのような機構によってもたらされているかについて解析を行った。女王蜂の卵巣小管の増加に関与するシグナルについて解析した結果、幼虫期の wnt1 が女王蜂の卵巣小管の増加に関与していることが明らかとなった。さらに、幼虫期の幼若ホルモン（JH)が JH 受容体（Methoprene tolerant）を介して wnt1 の発現を増加させ、ミツバチの卵巣小管の増加に関与している可能性を新たに見出した。

(2) ミツバチにおける卵巣構造の解析

女王蜂における卵巣構造について解析した結果、女王蜂では、cap cell の隣接する部分ではなく germarium の表面全体に dpp により活性化する pSMAD 陽性細胞が見られたことから、ミツバチの卵形性機構はショウジョウバエとは異なることが明らかとなった。

(3) ミツバチの卵形成機構の解析

女王蜂と働き蜂の間での卵形成機構の違いについて解析した。働き蜂は、卵巣小管が少ないながらも存在するが、卵形成は行わない。働き蜂の卵巣構造を解析した結果、働き蜂では、egg chamber の形成が見られず、germarium において卵形成の直前で生殖細胞の分裂が休止することによって産卵できなくなっていることが明らかとなった。

【研究の意義・展望】

女王蜂の卵巣小管は幼虫期の餌の違いによりに働き蜂は 1-5 本であるのに対し、200 本以上に発達する。本研究の実施により、女王蜂の卵巣小管の形成には幼虫期の JH と wnt1 が重要であることが明らかとなった。養蜂の現場では、飼育された女王蜂のすべての個体が多産の表現型を有すわけでなく、卵を産みにくい個体も存在する。従って、養蜂業においては、高い生殖能を有す女王蜂を安定して産出する方法の確立が強く求められている。今後、本研究で明らかになった成果

をさらに進展させ、wnt1 の下流で 200 以上の卵巣小管の形成に関与する因子を明らかにしたいと考えている。女王蜂の卵巣小管形成における鍵因子を見出すことができれば、同因子の発現を指標として高い生殖能を有す女王蜂の飼育条件の確立が可能となる。今後、ミツバチの幼虫期における wnt1 を含めた卵形成機構の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

さらに本研究により、ミツバチの成虫における卵巣構造や卵形成機構が少しずつではあるが明らかになってきた。高い生殖能を有す女王蜂を多く保持していくためには、女王蜂が安定して卵を形成できる飼育条件を見出すことも重要である。今後、特に女王蜂の成虫の卵形成機構の全貌を明らかにし、女王蜂が継続して卵形成が行えるような飼育条件の確立につなげたいと考えている。

また、最近になり女王蜂の分化誘導因子であるロイヤラクチンが、マウスの ES 細胞の多能性を維持するという報告がなされた（Nat. Commun. 2018）。今後は、昆虫の生殖細胞に対するロイヤラクチンの効果も検討していきたいと考えている。

【主な研究発表】

1. M. Kamakura：Royalactin induces queen differentiation in honeybees. ***International congress of international union for the study for social insects.*** (Cairns・Australia) (2014)

公募研究

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

Development of novel infertility treatment by regeneration of human oocytes and ovarian follicle culture

２０１４年度～２０１５年度（２６１１４５１０）

研究代表者　河村　和弘（聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授）
連携研究者　川島　一公（聖マリアンナ医科大学・医学部・研究員）

【研究の目的】

配偶子産生に関する知見の蓄積は、不妊症の治療に応用されてきた。しかし、卵巣内の残存卵胞の減少・喪失が原因となる卵巣機能低下による不妊の治療は未解決のままであり、晩婚化により患者数は急増している。現状で確実な治療法は他者からの提供卵子のみであり、新たな不妊治療法の開発が急務である。

最近我々は、卵巣機能が低下し卵胞発育が認められない患者から卵巣を摘出し、体外培養下で残存休眠卵胞を活性化し、卵巣自家移植を行い妊孕性を再生する卵胞活性化療法の開発に成功した。しかし、本法は、卵胞が残存している患者のみが対象となり、卵胞が喪失している患者には無効である。また、卵巣移植後も原因疾患によっては生体内で卵胞が障害される可能性がある。

そこで、本研究では卵巣機能不全患者の卵巣から卵子を再生する方法の開発と、原始卵胞の活性化を基盤とした原始卵胞から排卵前卵胞までのヒト完全体外培養法の開発を行うことを目的とし、卵巣機能低下による不妊患者の完全な治療法を確立することを最終目標とする。

【研究の成果】

(1) 卵巣機能不全患者の残存卵胞の解析

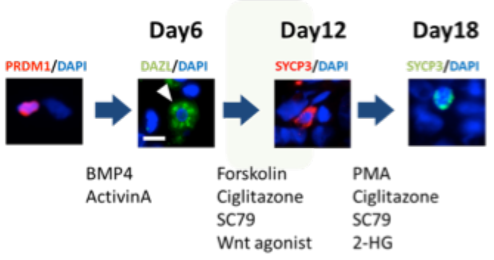
重度の卵巣機能不全である早発卵巣不全では、約半数の患者で原始卵胞を含めた卵胞が完全に喪失していることが明らかとなった（Hum Reprod 2015; Curr Opin Obset Gynecol 2016)。

(2) ヒト卵巣組織内の卵子前駆細胞の確認

採取したヒト卵巣臨床検体のうち、卵巣髄質の組織分散処理と髄質細胞の体外培養によってPRDM1陽性細胞が出現することを確認した。PRDM1 陽性細胞はがん患者由来の正常卵巣および残存卵胞が完全に喪失した早発卵巣不全患者の全てにおいて認められた。

(3) ヒト卵巣髄質由来の PRDM1 陽性細胞の減数分裂誘導

各種アゴニスト等を用いて PRDM1 陽性細胞を培養することで、DAZL、SYCP3 陽性細胞の出現と核局在細胞の出現を可能とする培養法を開発した（下図、特願 2017-217115)。



【研究の意義・展望】

早発卵巣不全患者が自己の卵子で妊娠することは困難であり、様々な問題を含む第三者からの提供卵子を用いた体外受精胚移植によって子供を得る方法のみが確立された不妊治療法である。我々が開発した卵胞活性化療法は卵巣内に残存卵胞のない患者には

無効であり、そのような患者も多いことが本研究にて解明された。しかし、残存卵胞のない患者でも卵巣髄質内にはPRDM1陽性の細胞が存在し、各種アゴニスト等を用いることで減数分裂関連遺伝子の発現誘導に成功した。今後は、さらに研究を重ね減数分裂の完了と機能的な卵子の再生を目指したい。ヒト卵子の卵巣髄質由来細胞からの分化誘導が可能となれば、早発卵巣不全のみならず、高齢不妊女性など多くの不妊患者の福音となることが期待される。

【主な研究発表】

1. I. Kawashima, and *K. Kawamura: Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. ***Reproduction***, 153, R205-R213 (2017)
2. *K. Kawamura, N. Kawamura, and A.J. Hsueh: Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? ***Curr Opin Obstet Gynecol***, 28, 217-22, (2016)
3. N. Suzuki, N. Yoshioka, S. Takae, Y. Sugishita, M. Tamura, S. Hashimoto, Y. Morimoto, and *K. Kawamura: Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. ***Hum Reprod***, 30, 608-615, (2015)
4. *K. Kawamura, Y. Cheng, Y.P. Sun, J. Zhai, C. Diaz-Garcia, C. Simon, A. Pellicer, and A.J. Hsueh: Ovary transplantation: to activate or not to activate. ***Hum Reprod***, 30, 2457-60 (2015)
5. *A.J. Hsueh, K. Kawamura, Y. Cheng, B.C. and Fauser: Intraovarian control of early folliculogenesis. ***Endocr Rev***, 36, 1-24, (2015)

公募研究

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

Transcriptional regulation of primordial germ cell formation in urochordate embryos.

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５０）

研究代表者　　熊野　岳　（東北大学・大学院生命科学研究科・教授）
連携研究者　　西野　敦雄（弘前大学・農学生命科学部・准教授）

【研究の目的】

本研究では、尾索動物胚を用いた生殖細胞系列での転写制御機構に焦点を当てた発生学的および比較発生学的解析を通して、発生初期における始原生殖細胞形成機構とその進化について明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

(1) 発生学的解析

マボヤ初期胚において、生殖細胞系列に局在する母性局在因子 Pem と Popk-1 と Zf-1 の 3 因子の機能について明らかにし、論文を発表した。すなわち、１）ホヤの生殖質形成に関わる PopK-1 が、転写抑制因子 Pem の転写物の生殖質への局在量および核内 Pem タンパク質量を適切なものとすることで、卵割期に観察される生殖細胞系列でのグローバルな転写抑制を間接的に関与すること、２）Pem のタンパク質量が発生に伴って徐々に減少することで、生殖細胞系列での生殖細胞関連遺伝子の胚性遺伝子発現の開始に寄与すること、３）RNA 結合タンパク質である Zf-1 が、胚性遺伝子発現開始のための Pem タンパク質減少を引き起こすこと、を明らかにした。以上より、動物初期胚における始原生殖細胞でのグローバルな転写抑制に至る過程と、転写抑制が解除され胚性遺伝子発現が開始する過程についてマボヤにおいて知見を得ることができた。

一方で、転写抑制が解除された以降も引き続き体細胞遺伝子の発現については抑制される仕組みについては明らかにすることができなかったが、生殖細胞系列において胚性遺伝子発現開始直前から、H3K27me3 のレベルが上昇することを見出した。この時期、生殖細胞系列では H3K4me3 のレベルも高く、このような抑制と活性マーカーが同在する Poised chromatin 状態が生殖細胞系列と体細胞系列の分離に関わる可能性が示唆された。さらに、H3K27me3 の阻害剤処理胚において、生殖細胞系列で筋肉特異的遺伝子が異所的に発現することを見出した。

(2) 比較発生学的解析

マボヤと同じホヤ綱に属するユウレイボヤの Pem が、マボヤ Pem と同様に体細胞遺伝子に対して転写抑制活性を持つが、この活性に必要なドメインは、マボヤ Pem 内で既に同定されている同等のドメインとは別領域に存在することを明らかにした。したがって、ホヤ綱の動物種間でさえも、転写抑制機構に多様性を示すことを示唆する興味深い結果となった。

さらに、同じ尾索動物でありながら、Pem をそのゲノム上に持たないワカレオタマボヤ（オタマボヤ綱）の転写抑制機構を明らかにするために解析を行った結果、Vasa タンパク質がワカレオタマボヤ初期胚の生殖細胞系列に局在すること、生殖細胞系列が完全に生殖細胞のみを作るようになる 32 細胞期になってはじめて、転写抑制を示唆する RNA polymerase II のリン酸化の消失が観察されることがわかった。このことから、Pem のないワカレオタマボヤにおいても、おそらく母性局在因子により生殖細胞系列の形成が制御されており、同系列においてグローバルな転写抑制が起こっていることが示唆さ

れた。

【研究の意義・展望】

胚発生期の生殖細胞系列において、転写抑制から転写抑制解除・胚性遺伝子発現に至る制御機構は、ショウジョウバエを除き他の動物種でその機構はほとんどわかっていなかった。したがって、本研究により「生殖質局在型」を示す新口動物胚生殖細胞系列において、3つの母性局在因子による体系だった転写制御機構を明らかに出来たことは、後生生物全体の始原生殖細胞形成機構の理解にとっても意義は大きいといえる。今後は、マボヤにおいて、転写抑制が解除されて胚性遺伝子発現が起こって以降も、引き続き体細胞遺伝子の発現が抑制される仕組みを明らかにしたい。もし、本研究で示唆出来たように、クロマチン修飾が関わることが明らかになれば、生殖細胞系列における体細胞運命の抑制に、母性局在因子による転写抑制からクロマチン修飾による転写抑制への移行が起こるという点で、マボヤ・ショウジョウバエ・線虫において共通の仕組みが見えてくる。

一方で、生殖細胞系列における転写抑制を担う母性局在因子（Pgc/ハエ、PIE-1/線虫、PEM/ホヤ）は、それぞれの動物系統に特異的な進化上新しい因子であることが知られている。したがって、本研究の結果は、尾索動物の間でさえも進化の過程で、転写抑制を制御する母性因子やその制御機構が変化したことを示唆し、始原生殖細胞形成が生物にとって必須なイベントであるにも拘らず、その制御機構が進化上比較的容易に変わりえたことになり、今後、この観点から生殖細胞の新たな特徴が見えてくるのではないかと期待している。

【主な研究発表】

1. *K. Miyaoku, A. Nakamoto, H. Nishida, and G. Kumano**:** 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)

公募研究

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

Analysis of chicken primordial germ cells using transgenic technology

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５３）

研究代表者　　西島　謙一　（名古屋大学大学院・工学研究科・准教授）

【研究の目的】

ニワトリ生殖系列細胞分化に関する研究は遅れている。本研究では、トランスジェニック技術により、マウスにおいて始原生殖細胞分化のマスターレギュレーターとされるPRDM14 及び BLIMP1 がニワトリ始原生殖細胞分化において果たす役割を明らかとすることを目指した。

【研究の成果】

(1) ニワトリ始原生殖細胞分化における *PRDM14* 及び *BLIMP1* の役割

ニワトリ *PRDM14* 及び *BLIMP1* はいずれも胚発生初期の始原生殖細胞で高発現していた。生殖腺に定着した後の発現レベルは、いずれも血中循環期(2.5 日胚)の発現レベルの数分の一程度であった。

放卵直後の胚である胚盤葉細胞の *in vitro* 培養系で PRDM14 及び BLIMP1 を過剰発現させると、生殖細胞のマーカーとされる *CVH* や *DAZL* の発現が高くなることが認められた。ルシフェラーゼをレポーターとして用いたプロモーター活性の測定では、BLIMP1 は *PRDM14*、*NANOG* 及び *DAZL* プロモーターの転写を促進し、この転写促進には BLIMP1 のジンクフィンガードメインが重要であることが示された。また、PRDM14 は *CVH* 及び *DAZL* プロモーターの転写を促進することが認められた。

一方、ニワトリ培養始原生殖細胞に PRDM14 の siRNA をエレクトロポレーションにより導入したところ、*CVH* や *DAZL* の発現には影響を与えず、*NANOG* の発現が若干低下することが認められた。一方、BLIMP1 の siRNA を導入したところ、*NANOG* の発現が低下するとともに *PRDM14* の発現が低下することが認められた。胚盤葉細胞を用いた実験との差違は、細胞種の違いやノックダウン効率などによるものと考えられる。

PRDM14 及び BLIMP1 の *in vivo* での役割を明らかとするために、ラウス肉腫ウイルスベースの複製型レトロウイルスベクターを用いて、ノックダウンを試みた。胚盤葉期の胚に PRDM14 及び BLIMP1 の shRNA 発現ベクターを導入したところ、いずれの場合も生殖巣内に定着する始原生殖細胞の数が有意に減少することが確認された(図 1)。これらのことから、PRDM14 及び BLIMP1 がニワトリ始原生殖細胞分化に重要であることが示された。

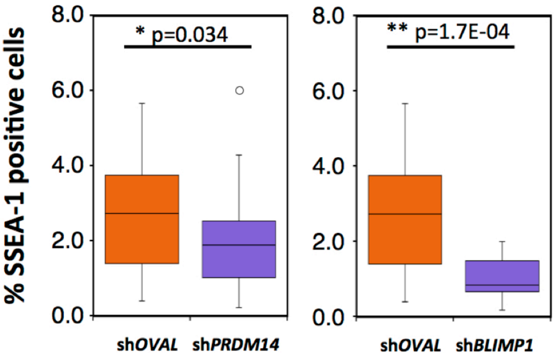


図 1. *in vivo* ノックダウンによる始原生殖細胞数の減少

(2) *PRDM14* 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしたニワトリの作製

培養始原生殖細胞を用いて、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を試みた。*PRDM14* 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインした始原生殖細胞株の樹立に成功した。この細胞をレシピエント胚に移植したところ、高効率で生殖腺

に定着することが確認され、成熟したオス個体の交配により GFP を持つ子孫を得ることに成功した。この PRDM14 ヘテロノックアウトニワトリは健康で子孫も生まれるが、PRDM14 ホモノックアウトニワトリは発生初期で死亡することが観察された。*in situ* ハイブリダイゼーションでは、始原生殖細胞以外でも胚盤葉や神経板などで *PRDM14* の発現が認められており、ほ乳類にない新たな機能を果たしている可能性が示唆された。

(3)ニワトリ DNA メチル化制御機構の解析

エピジェネティック制御の一つであるゲノム DNA のメチル化は強い転写抑制のシグナルとして知られる。メチル化された DNA は TET タンパク質を介して能動的に消去されることが哺乳類で明らかとなっているが、鳥類における *TET* 遺伝子の役割は不明であった。クローニングしたニワトリ TET タンパク質の酵素活性を培養細胞により確認した結果、ニワトリ TET (cTET) 1/2/3 いずれのタンパク質もメチル化シトシンをヒドロキシメチルシトシンに変換する酵素活性を持つことが確認された。c*TET* 遺伝子の発現パターンは哺乳類とは異なり、発生初期の胚盤葉や始原生殖細胞では低かった。一方、成鳥において多くの臓器で c*TET* 遺伝子の発現が観察され、赤血球で c*TET1* が高発現していることが見出された。ノックダウン実験により、cTET1 はb-グロビン遺伝子の発現誘導に関わることが示された。

【研究の意義・展望】

ニワトリ始原生殖細胞の分化過程の一端が明らかとなり、ほ乳類と一部共通の仕組みを持つことが示唆された。GFP ノックイン（PRDM14 ノックアウト）ニワトリが胚性致死であったことは予想外であり、今後の検討が必要である。作製したヘテロニワトリは鳥類バイオサイエンス研究センターに寄託済みであり、初期始原生殖細胞のトレースが可能なため、今後有用なリソースとして広く利用されることが期待される。

【主な研究発表】

1. Y. Okuzaki, *H. Kaneoka, <u>K. Nishijima</u>, S. Murakami, Y. Ozawa, and S. Iijima: Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 490, 753-759 (2017)

公募研究

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

Mechanism of determination and maintenance of the PGCs in the newt.

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５４）

研究代表者　　林　利憲　（鳥取大学・医学部・准教授）
連携研究者　　竹内　隆　（鳥取大学・医学部・教授）
連携研究者　　恒川　直樹（日本大学・生物資源学部・教授）

【研究の目的】

両生類のイモリは、誘導作用により始原生殖細胞（PGC）が決定される、雄イモリは PGC 様の性質を持つ細胞から生殖幹細胞を含む精巣を新生するなど、興味深い特徴を持つ。しかし、PGC の決定やその維持を始め、イモリ配偶子の分化を制御する機構はほとんど研究されてこなかった。そこで本研究では、新規のモデル動物であるイベリアトゲイモリを利用して、イモリ PGC の決定機構を明らかにするとともに、イモリ配偶子の形成機構を研究するための情報基盤の整備を目指した研究を行なった。

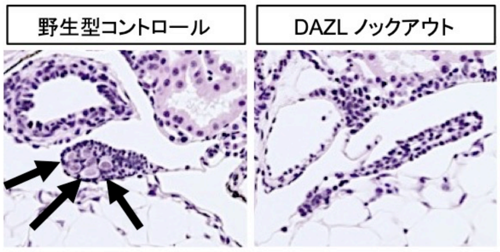
【研究の成果】

(1)イモリの配偶子形成における *vasa* および *dazl* 遺伝子の機能解析

vasa および *dazl* 遺伝子のノックアウトイモリを作製して、イモリの配偶子形成に対する影響を調べた。その結果、*vasa* ノックアウトイモリから正常に発生する卵あるいは精子を得ることができたことから、イモリの配偶子形成にとって、*vasa* 遺伝子が必須ではないことが示された。

一方、*dazl* 遺伝子をノックアウトしたイモリでは、オス、メスともに配偶子の形成が阻害された。

さらに、配偶子の形成過程を詳細に調べた結果、発生の段階で PGC が分化して始原生殖巣に移動した（受精後 2 週）後、受精後 2 ヶ月までにそれらの細胞が失われた。このことから、*dazl* 遺伝子はイモリの PGC の維持あるいは増殖に重要な役割を持っていることが示された。



・ノックアウトイモリの生殖巣原基では、PGC（矢印）が見られない。

(2)イベリアトゲイモリ遺伝子カタログの作成

新規のモデル動物であるイベリアトゲイモリでは、遺伝情報が整備されていないことが研究上の制約であった。そこで、精巣や卵巣、未受精卵を始めとする様々な器官や発生段階の胚、合計 29 のサンプルから得たトランスクリプトームを元に、イモリの遺伝子カタログ（Gene model）を構築した。この Gene model はイモリゲノムがコードする遺伝子の 99%をカバーすると評価された。

このカタログにより、本研究課題の推進に必要な、配偶子の形成に関連する遺伝子の配列情報を得ただけでなく、多くの共同研究に利用されている。

(3)CRISPR/Cas9 を介したイベリアトゲイモリゲノム編集法の確立

配偶子形成に関わることが期待される遺伝子を操作するためのゲノム編集技術を確立する目的で、広島大学のグループと共同研究を実施した。受精卵に標的とする遺伝子の

ガイドRNAとCas9タンパク質をマイクロインジェクションすることで、イモリの遺伝子を極めて効率よくノックアウト(KO)する方法を確立した。

この技術は、先述した *dazl* や *vasa* 遺伝子の KO を始め、本研究課題の推進に貢献した。

(4) イモリを利用した生殖毒性の評価

獣医学分野の研究者との共同研究により、イモリを利用した化学物質の生殖細胞に対する毒性の評価を行なった。その結果、カドミウムのイモリ精子形成における毒性を明らかにすることができた

(5) イモリ研究コミュニティーリソースの公開

我々が作成したイモリの遺伝子カタログや、生殖巣を始めとする様々な器官におけるトランスクリプトームデータベース、さらには実験方法などを公開するためのウェブサイト（iNewt）を基礎生物学研究所のサーバーを利用して開設した。

【研究の意義・展望】

今後は、イモリをはじめとする有尾両生類の PGC や配偶子形成の機構が明らかにされていくことが期待される。加えて、イモリを利用した化学物質の毒性の評価など、新しい分野への利用が期待される。我々が作成・公開したデータベースや実験方法は、イモリ研究を促進すると考えられる。

【主な研究発表】

1. M. Matsunami, M. Suzuki, Y. Haramoto, A. Fukui, T. Inoue, K. Yamaguchi, I. Uchiyama, K. Mori, K. Tashiro, Y. Ito, T. Takeuchi, KT. Suzuki, K. Agata, *S. Shigenobu, and *T. Hayashi: A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt Pleurodeles waltl, an emerging model for developmental and regeneration biology. ***bioRxiv*** doi: https://doi.org/10.1101/423699. (2018)
2. M. Suzuki, *T. Hayashi, T. Inoue, K. Agata, M. Hirayama, M. Suzuki, S. Shigenobu, T. Takeuchi, T. Yamamoto, and *KT. Suzuki: Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in *Pleurodeles waltl* development and regeneration. ***Dev Biol*** 443: 127-136. (2018)
3. A. Hirako, Y. Takeoka, T. Hayashi, T. Takeuchi, S. Furukawa and *A. Sugiyama: Effects of cadmium exposure on Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*) testes. ***J. Toxicol. Pathol.*** 30: 345–350. (2017)
4. *林　利憲、竹内 隆 : イモリをマウスと結ぶための新しい実験モデル　***生体の科学***、67, 264-269.(2016)

公募研究

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

Reconstruction of testicular interstitium which is indispensable for spermatogenesis.

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５５）

研究代表者　　嶋　雄一（川崎医科大学・医学部・准教授）

【研究の目的】

精子形成幹細胞の維持や精子の継続的な産生には、周囲の体細胞が形成するシグナルネットワークが不可欠である。研究代表者は、胎仔期の精巣間質に存在する胎仔型ライディッヒ細胞が出生前後に脱分化・分化転換し、出生後の精巣の組織構築に寄与することを見出した。本研究では、胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換のメカニズムを明らかにするとともに、脱分化・分化転換によって生じた細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにする。さらに、胎仔ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換プロセスの破綻が精子形成にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

【研究の成果】

(1)胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換

Nr5a1 遺伝子の胎仔型ライディッヒ細胞エンハンサーを用いて、細胞運命追跡実験を行なった結果、胎仔型ライディッヒ細胞が脱分化を起こすことが明らかになった。さらに、脱分化した細胞の一部が、新生仔期の精巣間質において精細管周囲の筋様細胞や血管周囲の周皮細胞へ分化転換することを明らかにした。

脱分化・分化転換によって生じた細胞を思春期の精巣間質に移植したところ、成獣型ライディッヒ細胞へ分化した。この結果から、胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換によって生じた細胞は成獣型ライディッヒ細胞の幹細胞や前駆細胞として機能することが示唆された。

(2)胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換によって生じた細胞の遺伝子発現

新生仔の精巣から、ソーティングによって胎仔型ライディッヒ細胞、および脱分化・分化転換によって生じた細胞を分取した。分取した細胞の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 解析および mRNA-sequence 解析により明らかにした。mRNA-sequence 解析の結果を、先行研究により明らかにされた胎仔期精巣の単一細胞遺伝子発現解析の結果（I. Stevant, *et al.*, ***Cell Rep.*** 22, 1589-1599. 2018）と比較した結果、脱分化・分化転換によって生じた細胞は、いずれも精巣間質のライディッヒ前駆細胞の集団として分類された。この結果は、研究成果（1）で示した細胞移植実験の結果とよく合致するものであった。

(3)Nr5a1 遺伝子の胎仔型ライディッヒ細胞エンハンサー欠損マウスの解析

ゲノム編集により、*Nr5a1* 遺伝子の胎仔型ライディッヒ細胞エンハンサーを欠損するマウスを作出した。このマウスでは、胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞の両方が完全に消失していた。この結果は、異なる 2 つの可能性を示唆した。一つは、胎仔型ライディッヒ細胞エンハンサーが胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞両方の機能分化に必須であるという可能性である。もう一つは、成獣型ライディッヒ細胞として分化するためには、いったん胎仔型ライディッヒ細胞へと分化した細胞が脱分化・分化転換する必要がある、という可能性である。

エンハンサー欠損マウスの精巣では、間質に

高度の線維化が生じ成熟した精子が存在しなかった。この結果から、胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換によって出生前後に精巣間質組織が再構築されることが、精子形成に必須であることが強く示唆された。

【研究の意義・展望】

本研究によって、胎仔期と成獣期に機能の異なるライディッヒ細胞が出現する仕組みを初めて明らかにした。また、精巣間質細胞の分化プロセスの異常により、精子形成が障害されることを明らかにした。今後は、*Nr5a1* 遺伝子の発現制御メカニズムという観点から、胎仔型ライディッヒ細胞の脱分化・分化転換の分子メカニズムの解明を目指す。また、精巣間質細胞がどのようなシグナルによって精子形成のどのステップに関与するのかを明らかにするために、精巣組織再構築培養系を用いた解析を予定している。

【主な研究発表】

1. *Y. Shima, K. Miyabayashi, T. Sato, M. Suyama, Y. Ohkawa, M. Doi, H. Okamura, and K. Suzuki: Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. ***Development***, 145, e2306 (2018)
2. Y. Li, K. Kobayashi, K. Murayama, K. Kawahara, Y. Shima, A. Suzuki, K. Tani, and *A. Takahashi: FEAT enhances INSL3 expression in testicular Leydig cells. ***Genes to Cells***, 23, 952-962 (2018)
3. K. Miyabayashi, Y. Shima, M. Inoue, T. Sato, T. Baba, Y. Ohkawa, M. Suyama, and *K. Morohashi: Alterations in fetal Leydig cell gene expression during fetal and adult development. ***Sexual Development***, 11, 53-637 (2017)

公募研究

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

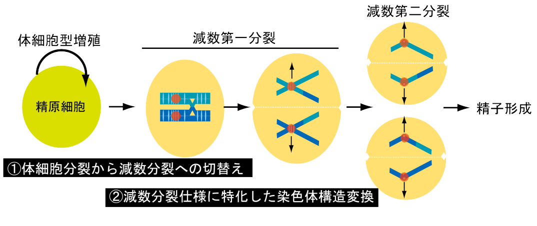
Mechanism of Cell cycle switching from mitosis to meiosis

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５７）

研究代表者　石黒啓一郎（熊本大学・発生医学研究所・独立准教授）

【研究の目的】

本研究は減数分裂の開始制御機構の解明を目的とする。体細胞分裂と比較した場合、減数分裂では第一分裂に還元型の染色体分配が挿入されている点が両者の本質的な相違を決定付けている。生殖細胞では減数分裂の進行に伴って、減数分裂仕様に特化された染色体の再構築が起きている(下図)。とりわけ、この減数第一分裂では姉妹動原体の接着、相同染色体のペアリングと対合による二価染色体の形成、染色体の axis-loop 構造形成、テロメア-核膜複合体を介した染色体運動など、体細胞系譜では見られないユニークな染色体動態が観察される。さらに減数第一分裂は通常の体細胞と同様の細胞周期の機構を巧みに転用しながらも、減数分裂仕様にプログラムされている。減数第一分裂前期(meiotic prophase I)と呼ばれる時期は、通常の体細胞の細胞周期の G2 期に相当するが、そのタイムスパンが通常の細胞周期 G2 期と比べて際だって長い。さらに第一分裂 M 期が完了しても次の S 期が開始されずに直ちに第二分裂へ進行する点も、通常の細胞周期と極めて異なる特徴の一つである。



このように細胞周期の調節は減数分裂仕様に大幅に特殊化されると同時に体細胞分裂を積極的に抑制するメカニズムがあると推定される。その実態については未だ不明な点が多く、体細胞分裂から減数分裂への切替えが何によって制御されているのかという問題は、生物種を問わず長年の懸案とされていた。レチノイン酸に応答して発現が誘導される STRA8 と呼ばれるタンパク質が減数分裂の進行に必須であることが先行研究により示唆されていたが、その分子機構の解明は国際的にも攻め倦んでいた(Bowles et al. Science 2006, Anderson et al. PNAS 2008)。本研究では STRA8 と相互作用する因子の同定を行って減数分裂の開始について解析を行った。

【研究の成果】

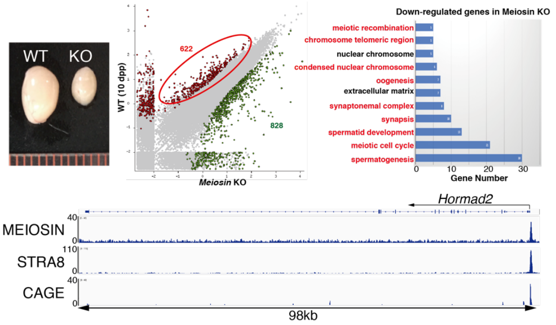
(1) 減数分裂の開始を制御する新規 STRA8 相互作用因子の同定

♂精母細胞や♀胎生期の生殖細胞集団のうち、Stra8 陽性細胞は体細胞型から減数分裂型細胞周期へと切り替わる遷移状態にあると推測されるが、ある一時におけるその存在割合は細胞集団のごく一部でその数も多くはないことが研究遂行上のハードルであった。そこで本研究では内在性の Stra8 遺伝子座に蛍光レポーターと精製用のタグを導入したノックインマウスを作製して、減数分裂にコミットとした生殖細胞集団より Stra8 タンパク質複合体の精製と MS 解析を行った。その結果、Stra8 と相互作用する新規の因子が同定された。MEIOSIS initiator (MEIOSIN) と名付けた因子は hypothetical gene によってコードされる DNA 結合因子と推測されるが、雌雄ともに減数第一分裂の開始前と符合するタイミングで一過的に発現を示すことが判明した。さらに MEIOSIN を欠損させると、雌雄ともに減数分裂への進行に障害が見られることが判明した(下図)。

興味深いことに、これらのKOマウスの精

母細胞、卵母細胞は減数第一分裂に進行できないかわりに、体細胞分裂様の染色体凝縮が見られた。従って、MEIOSIN-STRA8複合体が体細胞分裂から減数分裂型の細胞周期の切り替えに役割を果たしていることが示唆された。さらに*Meiosin*欠損マウス*Meiosin* KOおよび*Stra8* KOと野生型精巣のトランスクリプトーム比較解析により、減数第一分裂前期に本来発現されるべき遺伝子群の顕著な低下が見られた。*Meiosin* KOおよび*Stra8* KOでは減数分裂に特異的な染色体構造因子(コヒーシンサブユニット、減数分裂組換え因子、シナプトネマ複合体) の多くが発現低下を示し、表現型とも符合することが判明した。

さらにChIP-seqを駆使した解析により、MEIOSIN-STRA8複合体は、第一分裂前期の進行に関連する多くの遺伝子の転写開始点に結合して発現制御を行うことが示唆された。



MEIOSIN-STRA8複合体はこれらの遺伝子群の活性化を介して、減数第一分裂に特異的な染色体イベントと減数分裂仕様の細胞周期の開始とを協調させる役割があることが結論された。

【研究の意義・展望】

本研究から長年の懸案とされる減数分裂の開始制御機構の解明に一石を投じる成果が得られた。興味深いことに、*Meiosin*欠損マウス精巣で発現低下を示す遺伝子には多くのhypothetical geneが含まれる。これらの未解析の遺伝子には、減数分裂の進行に必要とされる未知のものが含まれる可能性がある。これら新規の因子の機能解明を行って、減数分裂の進行の制御機構の全貌解明を目指す。

【主な研究発表】

1. *K. Ishiguro: The cohesin complex in mammalian meiosis. ***Genes Cells*** 27, AOP doi: 10.1111/gtc.12652. (2018)
2. K. Ishiguro, Y. Nakatake, N. Chikazawa-Nohtomi, H. Kimura, T. Akiyama, M. Oda, SBH. Ko, and *MSH. Ko: 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)
3. K. Ishiguro, M. Monti, T. Akiyama, H. Kimura, N. Chikazawa-Nohtomi, M. Sakota, S. Sato, CA. Redi, SBH. Ko, and *MSH. Ko: Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis. ***In Vitro Cell.Dev.Biol.-Anim***. 53, 167-178 (2017)
4. K. Ishiguro, and *Y. Watanabe: The cohesin REC8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex. ***EMBO reports*** 17, 783-784 (2016)

公募研究

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

Evolutionary conservation and specificity of the genetic program for germ cell formation

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２５８）

研究代表者　関　由行　（関西学院大学・理工学部生命医化学科・准教授）

【研究の目的】

生殖細胞形成様式には、’Preformation’と’Epigenesis’が存在する。本研究提案では、ヒト、マウス、アホロートル（ウーパールーパー）を用いて、以下の研究項目を遂行し、’Epigenesis’による生殖細胞形成を制御する生物種を超えた共通原理と種特異性の解明を目指した。

（１）アホロートル始原生殖細胞形成機構の解明

（２）マウス始原生殖細胞による‘潜在的’多能性獲得機構の解明

（３）PRDM14 の分子系統・進化解析

【研究の成果】

(1) アホロートル始原生殖細胞形成機構の解明

マウス始原生殖細胞形成には転写因子 PRDM14 が必須である。そこで、アンチセンスモルフォリノを用いて、有尾両生類アホロートルにおける PRDM14 の機能解析を行った。その結果、PRDM14 モルフォリノ胚では、始原生殖細胞や生殖巣を含む後極腹側中胚葉組織が完全に欠損することが明らかとなった（図１）。

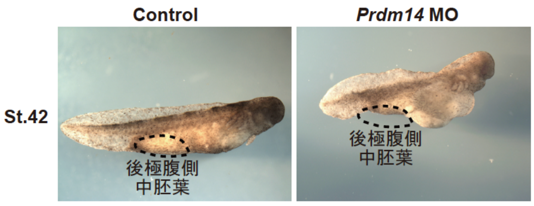


図１ *Prdm14* MO アホロートル胚の表現型

この結果から、有尾両生類において PRDM14 は始原生殖細胞形成に直接関与しているのではなく、始原生殖細胞の前駆細胞である中胚葉性多能性細胞の成立・維持に必須である可能性が示唆された。

(2) マウス始原生殖細胞による‘潜在的’多能性獲得機構の解明

マウスにおいて、始原生殖細胞では多能性を制御する転写因子群が発現しており、特定のサイトカイン存在下で培養することで多能性幹細胞へと脱分化できる（潜在的多能性）。我々は、この潜在的多能性の獲得機構を解明するために、転写因子 PRDM14 の機能解析を行った。その結果、始原生殖細胞の前駆細胞であるエピブラスト様細胞（EpiLC）に PRDM14 を誘導的に発現させ、接着培養すると ES 細胞へと脱分化し、浮遊培養すると始原生殖細胞へと分化することを明らかにした。

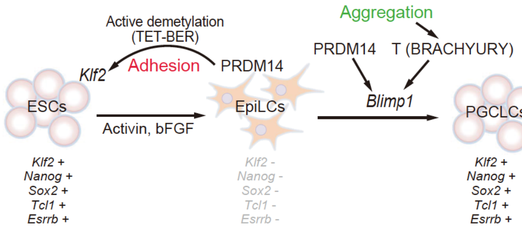


図 2 Prdm14 による潜在的多能性獲得機構

また、EpiLC に PRDM14 と BLIMP1 を共発現し接着培養を行ったところ、始原生殖細胞への分化が促進された。これらの結果より、PRDM14 が始原生殖細胞における多能性ネットワークを再確立するが、BLIMP1 がそのネットワークの下流を抑制し、始原生殖細胞へ誘導することで、潜在的多能性状態が維持される可能性が考えられる。

(3) PRDM14 の分子系統・進化解析

生殖細胞形成の種超えた共通原理を理解するために、PRDM14 の分子系統解析を行った。その結果、PRDM14 は原始的な後生動物

である刺胞動物のゲノムからその存在が確認でき、後口動物に広く分布していることが分かった。そこで、マウス PRDM14 が持つ ES 細胞の未分化性維持活性を他のオーソログが補完できるか否か機能補完実験を行った。その結果、ウニ PRDM14 は機能補完が行えず、ナメクジウオ、ゼブラフィッシュ PRDM14 はマウス PRDM14 の機能を補完できることが明らかとなった。マウス PRDM14 は転写制御因子 CBFA2T2 と結合し、機能を発揮することが知られていたが、興味深いことにウニ PRDM14 とウニ CBFA2T の共発現によって、マウス PRDM14 及びマウス CBFA2T2 の機能を完全に補完できることも見いだした。次に、ナメクジウオ胚における Prdm14 の発現解析を行ったところ、多能性細胞や生殖細胞での発現は観察されず、運動ニューロン特異的に発現していた。この運動ニューロンでの発現はゼブラフィッシュでも保存されているため、四肢動物の出現前後に PRDM14-CBFA2T 複合体の機能が運動ニューロンから多能性細胞へ転用された可能性が推測できる。

【研究の意義・展望】

マウスを用いた解析のみでは転写因子 PRDM14 は始原生殖細胞のためだけに存在するように見えるが、他の生物の発現及び機能比較実験を行うことで、PRDM14 を中心とした転写因子ネットワークの進化的起源や変容を推測することができた。今後は、PRDM14 の発現が多能性細胞へ変化した進化的時期、そのメカニズム、PRDM14 の挿入による多能性ネットワークの変化、またその結果胚発生に与えた影響など、様々な側面を解析する予定である。

【主な研究発表】

1. M. Masanori, K. Sugiyama, K. Matsubara, CY. Lin, S. Kuraku, S. Hashimoto, Y. Suwa, LW. Yong, K Takino, S Higashida, D Kawamura, JK. Yu, and *Y. Seki: Co-option of the PRDM14–CBFA2T complex from motor neurons to pluripotent cells during vertebrate evolution. ***Development***, 印刷中
2. *Y. Seki: PRDM14 is a unique epigenetic regulator stabilizing transcriptional networks for pluripotency, ***Frontiers in Cell and Developmental Biology,*** 6(12) (2018)
3. N. Okashita, Y. Suwa, O. Nishimura, N. Sakashita, M. Kadota, G. Nagamatsu, M. Kawaguchi, H. Kashida, A. Nakajima, M. Tachibana, and *Y. Seki: PRDM14 drives OCT3/4 recruitment via active demethylation in the transition from primed to naïve pluripotency. ***Stem Cell Reports***, 7(6), 1072-1086 (2016)

公募研究

カイコ *Sex-lethal* による二型精子産生システムの制御機構の解明

Regulation of dimorphic sperm development in *Bombyx mori*

２０１６年度～２０１７年度（１６Ｈ０１２６０）

研究代表者　　新美輝幸　（基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授）

【研究の目的】

昆虫は最も種数の多い生物群であり、あらゆる環境に適応するための生殖戦略を発達させてきた。鱗翅目昆虫（チョウやガ）では、鱗翅目の系統で獲得された特異的な配偶子産生過程の制御により、二型精子（有核精子と無核精子）が形成される。カイコでは無核精子が有核精子の受精に必須の役割を果たすことが示されているが、二型精子が生じる分子機構は全く不明である。

本研究では、有核精子と無核精子という特徴的な配偶子産生制御を行うカイコを材料に、世界に先駆けて研究代表者らがカイコにおいて発見した二型精子形成における性決定遺伝子 *Sex-lethal*（*Sxl*）の新規機能の解析に焦点を絞り、配偶子産生の制御機構の分子基盤を解明する。本研究から得られた知見をショウジョウバエと比較することにより、*Sxl* が関与する配偶子産生システムの進化的多様性と普遍性を明らかにすることを目指す。

【研究の成果】

(1) カイコ *Sxl* 変異系統の作出

申請者のこれまでの研究により、カイコ（*Bombyx mori*）の Sxl（Bm-Sxl）には N 末端の長さのみが異なる 2 種のアイソフォーム（Bm-Sxl-L および Bm-Sxl-S）が存在することが明らかとなった。興味深いことに、いずれのアイソフォームも主に精巣で発現し、Bm-Sxl-L は有核精子の分化時期に発現し、精母細胞の細胞質に局在する。一方、Bm-Sxl-S は無核精子の分化時期に発現し、精母細胞の核に局在することが判明した。したがって、*Bm-Sxl* が二型精子の分化が決定される時期と密接に関連した発現動態を示したことから、二型精子の分化に必須の役割を果たすことが示唆された。もし *Bm-Sxl* が二型精子形成においてこのような重要な役割を担っているのであれば、*Bm-Sxl-L* の loss-of-function により有核精子形成が阻害され、*Bm-Sxl-L* と *Bm-Sxl-S* の両方の loss-of-function により正常な精子形成が阻害される可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するため、TALEN を用いて *Bm-Sxl* 遺伝子の変異系統の作出を試みた。その結果、Bm-Sxl-L の開始メチオニン付近に生じた欠失によりフレームシフトが生じた変異体及び Bm-Sxl-L と Bm-Sxl-S の両方のアイソフォームに存在する RNA 結合ドメイン内に変異が導入された系統を作出することができた。

(2) カイコ *Sxl* 変異系統の解析

Bm-Sxl-L のフレームシフト変異体系統では、異常が認められなかった。一方、両アイソフォームの RNA 結合ドメイン内に変異が生じた系統については、変異体のホモ接合体系統の雄を交配した次世代において不受精卵となり、精子の受精能が消失した可能性が示された。つぎに、*Bm-Sxl* 遺伝子の変異体系統において、精子の詳細な形態観察および受精能を調査したところ、無核精子が機能していないことが明らかとなった。

上記の結果から Bm-Sxl の RNA 結合ドメイン内に変異が導入された系統のホモ接合体のオスにおける不妊の原因は、無核精子形成の異常である可能性が示唆された。そこで、

不妊の原因が無核精子にあることを検証するため、正常な無核精子を用いたレスキュー実験を行うこととした。カイコの三倍体のオスでは、有核精子が受精能力を喪失するものの、正常な無核精子は形成されることが知られている。この三倍体の無核精子を用いて *Bm-Sxl* 変異体のレスキュー実験を行った。コントロールとして、正常なメスに対して三倍体のオスを単独で交尾させた場合、および *Bm-Sxl* 変異体のオスを単独で交尾させた場合は、いずれも受精はほとんど認められなかった。これに対し、まず初めに正常なメスに対して三倍体のオスを交尾させ、続いて *Bm-Sxl* 変異体のオスを交尾させた二重交尾実験では、非常に高い受精率が得られた。以上の結果より、*Bm-Sxl* 変異体のオスの不妊の原因は無核精子の異常にあることが明らかとなった。

【研究の意義・展望】

Sxl は、キイロショウジョウバエにおいて性決定のマスター遺伝子としての機能を有する。多くの昆虫において *Sxl* の相同遺伝子は存在するが、これまでに調査された昆虫では性決定に関する機能はなく、その機能は不明であった。本研究では、カイコにおいて *Sxl* が、鱗翅目昆虫に特徴的な無核精子形成に必須の役割を果たすことを世界で初めて明らかにすることに成功した。本成果は、進化的に保存された *Sxl* の機能をショウジョウバエ以外で初めて明らかにしただけでなく、全く未知であった鱗翅目昆虫の無核精子形成に関与する遺伝子を初めて明らかにしたものである。

今後は、*Bm-Sxl* 遺伝子を足がかりに、無核精子の機能や、二型精子形成の分子基盤を明らかにすることが期待される。鱗翅目昆虫であるカイコでは、無核精子が有核精子の受精に必須であることが明らかとなっているが、どのように受精に関与しているのかは依然不明のままである。本研究で作出された無核精子が異常な変異体と、無核精子が正常な個体を比較解析することで、無核精子がどのように受精に関わっているのかを明らかにすることが可能となる。さらに、RNA 結合タンパク質である Bm-Sxl が、無核精子形成に必須であることが本研究により判明したので、この遺伝子を切り口として、二型精子形成の遺伝子ネットワークを明らかにすることが期待される。

【主な研究発表】

なし