

領域略称名：配偶子構築

領域番号：7002

令和5年度科学研究費助成事業
「新学術領域研究（研究領域提案型）」
に係る研究成果報告書（研究領域）兼
事後評価報告書

「配偶子インテグリティの構築」

領域設定期間

平成30年度～令和4年度

令和5年6月

領域代表者 大阪大学・大学院医学系研究科・教授・林 克彦

目 次

研究組織

| | |
|------------------|---|
| 1 総括班・総括班以外の計画研究 | 2 |
| 2 公募研究 | 3 |

研究領域全体に係る事項

| | |
|-------------------------------------|----|
| 3 交付決定額 | 6 |
| 4 研究領域の目的及び概要 | 7 |
| 5 審査結果の所見及び中間評価結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況 | 9 |
| 6 研究目的の達成度及び主な成果 | 11 |
| 7 研究発表の状況 | 16 |
| 8 研究組織の連携体制 | 21 |
| 9 研究費の使用状況 | 22 |
| 10 当該学問分野及び関連学問分野への貢献の状況 | 24 |
| 11 若手研究者の育成に関する取組実績 | 25 |
| 12 総括班評価者による評価 | 26 |

研究組織

(令和5年3月末現在。ただし完了した研究課題は完了時現在、補助事業廃止の研究課題は廃止時現在。)

1 総括班・総括班以外の計画研究

| 研究項目[1] | 課題番号 研究課題名 | 研究期間 | 研究代表者 氏名 | 所属研究機関・部局・職 | 人数 [2] |
|-------------------------------------|--|----------------------|-------------|--------------------------------|-----------|
| X00 総 | 18H05544 配偶子インテグリティの構築 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 林 克彦 | 大阪大学・大学院医学系研究科・教授 | 10 |
| A01 計 | 18H05545 多能性幹細胞による配偶子産生システムの in vitro 再構築 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 林 克彦 | 大阪大学・大学院医学系研究科・教授 | 3 |
| A01 計 | 18H05546 高インテグリティを実現する in vitro 精子形成系の開発 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 小川 毅彦 | 横浜市立大学・大学院医学研究科・教授 | 3 |
| A01 計 | 18H05547 高インテグリティを実現する in vitro 卵子産生系の開発 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 尾畑 やよい | 東京農業大学・生命科学部・教授 | 1 |
| A01 計 | 18H05548 種を越えた配偶子産生システムの in vitro 再構築 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 小林 俊寛 | 東京大学・医科学研究所・特任准教授 | 1 |
| A02 計 | 18H05549 染色体イメージングによる卵子インテグリティの予見 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 北島 智也 | 理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー | 1 |
| A02 計 | 18H05550 非破壊的可視化による配偶子インテグリティの予見 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 八幡 穰 | 筑波大学・生命環境系・准教授 | 1 |
| A03 計 | 18H05551 個体発生における生殖細胞集団のレパトリー動態の解明 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 吉田 松生 | 基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授 | 2 |
| A03 計 | 18H05552 生殖細胞発生過程における選択機構の解明 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 小林 悟 | 筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授 | 1 |
| A03 計 | 18H05553 組織学的情報とリンクした単一細胞遺伝子発現プロファイル動態の解明 | 平成30年度 ～ 令和4年度 | 栗本 一基 | 奈良県立医科大学・医学研究科・教授 | 1 |
| 総括班・総括班以外の計画研究 計 10 件（廃止を含む） | | | | | |

[1] 総：総括班、国：国際活動支援班、計：総括班以外の計画研究、公：公募研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数（辞退又は削除した者を除く。）

2 公募研究

| 研究項目[1] | 課題番号 研究課題名 | 研究期間 | 研究代表者 氏名 | 所属研究機関・部局・職 | 人数 [2] |
|----------|--|---------------------|-------------|------------------------|-----------|
| A01 公 | 19H05237 精細管内フローと精子インテグリティ | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 原 健士朗 | 東北大学・農学研究科 ・准教授 | 1 |
| A01 公 | 19H05242 卵胞発育プロファイリングを利用した汎用型体外培養系の開発 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 諸白 家奈子 | 信州大学・学術研究院農学系・助教 | 1 |
| A02 公 | 19H05243 1配偶子定量プロテオミクスによる配偶子インテグリティ評価マーカー探索 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 松本 雅記 | 新潟大学・医歯学系・教授 | 1 |
| A02 公 | 19H05239 光干渉断層画像化法を応用した生殖細胞インテグリティ評価技術の開発 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 阿部 宏之 | 山形大学・理工学研究科・教授 | 1 |
| A02 公 | 19H05244 高転写状態獲得を理解するためのエピゲノム・トランスクリプトーム解析技術の開発 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 大川 恭行 | 九州大学・生体防御医学研究所・教授 | 1 |
| A03 公 | 19H05236 プラナリア生殖戦略のインテグリティを支える新奇機構の解明 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 小林 一也 | 弘前大学・農学生命科学部・准教授 | 1 |
| A03 公 | 19H05240 生殖幹細胞インテグリティ制御におけるホルモンと神経伝達物質の役割の解明 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 丹羽 隆介 | 筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授 | 1 |
| A03 公 | 19H05241 精子形成の品質保証と luminal flow による精上皮クリアランス機構 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 金井 克晃 | 東京大学・農学生命科学研究科・准教授 | 1 |
| A03 公 | 19H05238 代謝調節を介したオス胎仔生殖細胞のインテグリティ構築機構の解明 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 林 陽平 | 東北大学・加齢医学研究所・助教 | 1 |
| A03 公 | 19H05247 卵母細胞に顕在する新規細胞質顆粒が担う原始卵胞の品質管理機構 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 加藤 譲 | 国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教 | 1 |
| A03 公 | 19H05248 共生微生物による配偶子インテグリティの構築とその制御 | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 重信 秀治 | 基礎生物学研究所・生物機能情報分析室・教授 | 1 |

| | | | | | |
|----------|---|---------------------|--------|--------------------------------|---|
| A03 公 | 19H05249 卵子成熟過程のインテグリティを支える Wnt の原始卵胞活性化メカニズム | 令和元年度 ～ 令和2年度 | 高瀬 比菜子 | 理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員 | 1 |
| A01 公 | 21H00236 ロバストなショウジョウバエ生殖幹細胞の培養系構築 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 齊藤 都暁 | 国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・教授 | 1 |
| A02 公 | 21H00232 高転写状態解明に向けた空間マルチオミクス解析技術の開発 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 大川 恭行 | 九州大学・生体防御医学研究所・教授 | 1 |
| A02 公 | 21H00240 卵子形成過程で合成される脂肪滴と卵子インテグリティの分子基盤に関する研究 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 塚本 智史 | 量子科学技術研究開発機構・量子生命医学部門・主幹研究員 | 1 |
| A03 公 | 21H00224 小胞輸送因子が制御する卵母細胞インテグリティ制御機構の解明 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 水野 聖哉 | 筑波大学・医学医療系トランスボーダー医学研究センター・准教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00225 加齢に伴う生殖系列からの変異型ミトコンドリアDNA消失機構の解明 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 石川 香 | 筑波大学・生命環境系・助教 | 1 |
| A03 公 | 21H00226 ホルモンと神経伝達物質のシグナルの統合による配偶子インテグリティ制御機構の解明 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 丹羽 隆介 | 筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00227 精子形成の品質保証と luminal flow による精上皮クリアランス機構 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 金井 克晃 | 東京大学・農学生命科学研究科・教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00228 精子インテグリティに関わる脂質分子の解明 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 河野 望 | 東京大学・大学院薬学系研究科・准教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00230 受精能獲得における精子インテグリティ | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 鈴木 淳 | 京都大学・高等研究院 物質-細胞統合システム拠点・教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00231 精子受精能を制御する生殖路管腔環境のデザイン原理 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 浄住 大慈 | 大阪大学・微生物病研究所・助教 | 1 |
| A03 公 | 21H00233 精子形成期における分化運命決定機構 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 前澤 創 | 東京理科大学・理工学部・准教授 | 1 |
| A03 公 | 21H00235 精子形成における"mini-puberty"の生理的意義の解明 | 令和3年度 ～ 令和4年度 | 嶋 雄一 | 川崎医科大学・医学部・教授 | 1 |

| | | | | | |
|--------------------|--|-------------------------|------|-------------------------|---|
| A03 公 | 21H00237 In vivo ライブイメージングで迫る 原始卵胞の不均一性と活性化機構 の理解 | 令和 3 年度 ～ 令和 4 年度 | 加藤 護 | 国立遺伝学研究所・遺伝形 質研究系・助教 | 1 |
| 公募研究 計 25 件（廃止を含む） | | | | | |

[1] 総：総括班、国：国際活動支援班、計：総括班以外の計画研究、公：公募研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数（辞退又は削除した者を除く。）

研究領域全体に係る事項

3 交付決定額

| 年度 | 合計 | 直接経費 | 間接経費 |
|----------|-----------------|-----------------|---------------|
| 平成 30 年度 | 319,150,000 円 | 245,500,000 円 | 73,650,000 円 |
| 令和元年度 | 300,170,000 円 | 230,900,000 円 | 69,270,000 円 |
| 令和 2 年度 | 301,210,000 円 | 231,700,000 円 | 69,510,000 円 |
| 令和 3 年度 | 303,940,000 円 | 233,800,000 円 | 70,140,000 円 |
| 令和 4 年度 | 304,720,000 円 | 234,400,000 円 | 70,320,000 円 |
| 合計 | 1,529,190,000 円 | 1,176,300,000 円 | 352,890,000 円 |

4 研究領域の目的及び概要

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時の領域計画書を基に、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、どのような点が「革新的・創造的な学術研究の発展が期待される研究領域」であるか、研究の学術的背景や領域設定期間終了後に期待される成果等を明確にすること。

研究領域の背景と目的

生殖細胞は次世代の個体を作るという極めて特殊な性質をもつ。その特性を解明するために、多くの基礎研究が展開されてきたと同時に、その利用は発生工学分野を創成して生物学・医学・畜産学・水産学等に大きな影響を及ぼしてきた。本邦においては平成11年の特定領域研究(B)「生殖系列の制御機構と発生工学」以降の継続的な領域研究に支えられて、質量ともに長く世界のトップレベルを維持している。その中で、本研究領域を構成する研究者らが中心となり、配偶子形成過程を体外培養で再現する培養技術“*in vitro* gametogenesis”が開発された。具体的には、小川らが「マウス精巢の器官培養による機能的な精子の作製」、尾畑らは「マウス胎仔卵巣からの機能的な卵子の作製」、さらに林らは「マウス ES/iPS 細胞からの卵子の作製」にそれぞれ世界で初めて成功した。体外培養系で配偶子を分化誘導するという極めてシンプルな発想に基づく方法論が完成すれば、生殖細胞の分化メカニズムの解明や経時的な観察が可能となるほか、体外培養系で作られる配偶子を用いた生殖工学技術の開発に貢献する。これらの学術研究や技術開発は *in vitro* gametogenesis がモデル動物からヒト、産業動物、絶滅危惧種などへの応用に伴い、重要性や革新性を増大させながら加速するものと考えられる。

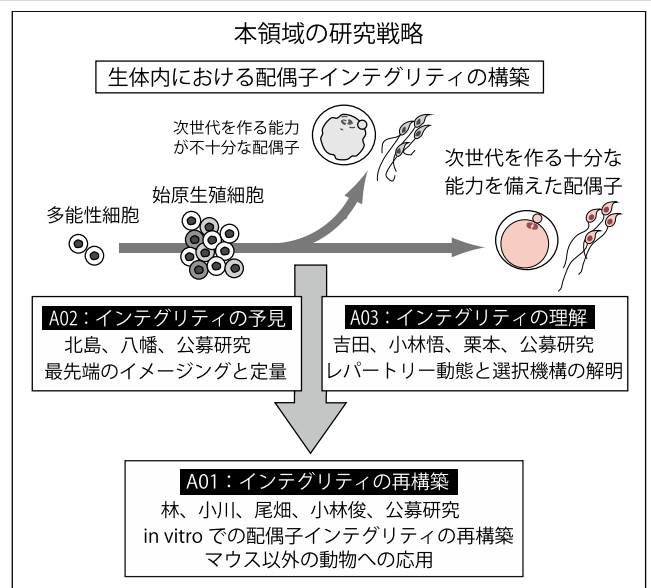
しかしながら、これまでに開発されてきた *in vitro* gametogenesis では発生能をもつ配偶子へと分化する効率は、生体内の配偶子産生システムには遠く及ばない。これは体外培養系において周囲の体細胞との相互作用を含めた生殖細胞分化のための環境が不完全であり、結果として得られる「配偶子のインテグリティ」すなわち受精能や発生能として定義される配偶子の機能的な完成度が低いことを示している。逆説的に言えば、生体内では配偶子のインテグリティを効率的に構築するシステムが存在することを示している。さらに、*in vitro* gametogenesis における多くの技術はマウス限定であり、とりわけ配偶子形成過程の再構築には胎仔生殖腺の体細胞を必要としていることが大動物への適用に対しての大きな障壁となっている。そこで本領域研究は、生体内の配偶子産生システムの理解のもと、高い発生能の賦与とともにマウス以外の動物にも適用可能な体外培養系を構築して、*in vitro* gametogenesis を学術研究の推進や生殖工学技術の開発に資する技術として確立することを目的とした。

研究領域の構想

本領域研究では、上記の目的を達成するために、高い発生能を担保するとともに様々な動物に適用可能な体外培養系の構築 (A01 インテグリティの再構築) を基盤として、それに配偶子インテグリティを非破壊的に計測する技術の開発 (A02 インテグリティの予見)、および配偶子インテグリティが賦与される生体内の配偶子産生システムの理解 (A03 インテグリティの理解) を加えた体制により領域研究を推進することを構想した (右図)。

A01 ではこれまで世界に先駆けて *in vitro* gametogenesis に着手している林、小川、尾畑に加えて、ラット、ウサギ、ブタ、ヒトの *in vitro* gametogenesis にいち早く着手している小林(俊)が加わり、これまでに蓄積された豊富な経験や知見を共有して、培養技術の

開発や培養条件の改善を行う。これらの開発には *in vitro* gametogenesis をマウス以外の動物へ適用する上で律速となっていた胎仔生殖腺の体細胞を人工的に作製することを含む。これと並行して、生体における生殖細胞の分化過程と *in vitro* gametogenesis をオミクス解析により比較し、体外培養系で制御すべき因子を見つけ出す。候補とする因子はタンパクや脂質などの生理活性物質のみならず、精巣内での組織液



の流れや卵胞の発育などにより生じる物理的刺激を含む。これらの因子の作用を効率的に検討するために、培養液の組成や水流などを精密に制御できる培養デバイスを開発する。これらの計画班研究に加え、独創的な培養の方法論をもつ公募班と連携することにより高い発生能をもつ配偶子を作り出す *in vitro* gametogenesis を開発する。

A02 では、配偶子インテグリティを非破壊的に計測するための最先端のイメージング技術と情報処理技術を開発する。八幡は独自に開発した網羅的な細胞の内在性蛍光パターンの特徴を機械学習で識別する CRIF (Confocal Reflection microscopy-assisted single-cell Innate Fluorescence analysis)解析を応用して、配偶子の内在性蛍光パターンを定量的に判定し、発生能との相関を調べる。また、北島は卵子が異数体となる過程をリアルタイムに可視化できるハイスループットかつ高解像度のイメージングを用いて、卵母細胞の染色体動態を解析し、染色体の異常分配を予測できる特徴を突き止める。さらに、これらの技術により予見された発生能を規定する因子の同定を目指す。このために卓越した測定技術をもつ、または開発している研究班を公募研究班として加える。これらの研究班は A01 と協力して、*in vitro* gametogenesis で作られた配偶子の予見的評価系を確立する。

研究項目 A03 では、生体内で高いインテグリティを実現する配偶子の発生プロセスを、「細胞の不均一性と選択」という新しい観点から理解する。吉田は 100 万種類以上の細胞を個別に標識できるバーコード解析によりマウス生殖細胞系列の集団内のレパートリーの変化を理解する。また栗本はその変化を時空間的に単一細胞レベルで明らかにする手段として、空間的な位置情報を維持した単一細胞遺伝子発現解析法の開発を行う。さらに小林(悟)が生殖細胞の選択について、人為的なトランスポゾンの活性化により様々なレベルのゲノム損傷もつ生殖細胞を用いて検証する。また生殖細胞の選択システムの破綻が個体の妊孕性や子孫への影響を調べる。これらの計画班研究に加え、生殖細胞の集団の変化に関する現象に独自の視点でアプローチしている研究班を公募班として加える。これらの研究班は A01 と協力して、生体内と *in vitro* gametogenesis における生殖細胞の集団の変化を比較する。

領域設定期間終了後に期待される成果等

本領域研究は *in vitro* gametogenesis を革新的技術として確立し、生殖細胞研究および生殖工学技術における新たな学術領域を開拓するものである。それが達成されれば、様々な波及効果が期待される。まず *in vitro* gametogenesis が最適化され、多くの関連する研究者が利用できる培養システムを供給できる。これに加え、支持細胞を分化誘導する方法が確立されれば、他の動物への *in vitro* gametogenesis の応用が進むほか、動物個体・胚を使用することなく生殖細胞と体細胞の両面から配偶子形成過程を解明する研究が進展すると予想される。支持細胞は生殖細胞系列の分化のみならず、性分化や性ホルモンの産生にも中心的な役割を担うことから、多くの分野において利用可能な培養系になる。非破壊的な配偶子の発生能の予見は、これまでに類似の研究はなく、大きな波及効果が期待される。発生能を規定する分子メカニズムの解明に貢献するほか、応用面では個体作製の効率が改善される。これは、妊娠に長い時間を要する動物や、胚を移植する母体の確保が困難な動物において特に有効であろう。また、この技術はヒトの配偶子に応用できる可能性もある。生殖細胞系列のレパートリーの変動についての大規模な解析例はこれまでにない。生殖細胞の不均一性や選択は様々な動物に保存されている可能性が高く、その成果は生殖細胞研究における新しい研究分野を作り出す可能性がある。また細胞集団レベルでの配偶子インテグリティの構築機構の解明は、様々な動物種における生殖戦略や進化を考える上で重要な知見となる。

5 審査結果の所見及び中間評価結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況

研究領域全体を通じ、審査結果の所見及び中間評価結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該指摘及びその対応状況等について、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

(審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況)

-----審査結果の所見-----

本研究領域は、生体内において極めて高いインテグリティを持つ配偶子が形成されるメカニズム、つまり配偶子形成の再構築、品質管理、配偶子産生機序の全貌を解明し理解することで、試験管内で配偶子インテグリティの再構築を目指すという先駆的かつ極めて意欲的な課題である。生殖系列細胞での単一細胞レベルでのヘテロジェネイティを解明しようとした、初めての試みである。また、*In vitro gametogenesis* は領域代表者が世界をリードする成果を挙げており、本研究領域は生物分野での重要性・発展性を共に備えたものである。過去に採択された新学術領域研究「動物における配偶子産生システムの制御」（平成25～29年度）での研究成果として、効率は低いが *In vitro gametogenesis* は確立されている。生体内における高い個体発生を可能とする配偶子インテグリティの解明と予見の実現により、ヒトを含む各種動物において発生能の高い配偶子形成が非破壊的に可能になる大きな成果が見込まれる。また、領域組織を構成する研究者がそれぞれの分野の世界的なエキスパートである計画研究を中心として、多岐にわたり、若手研究者の育成などにも配慮がされている。ただし、研究領域を補完する公募研究に更なる広がりが必要とされる。

(留意事項)

・公募研究1件当たりの配分額を研究項目ごとに見直すなどして、公募研究の採択件数を10件よりも増やすことが必要である。

・上記所見中の下線で示した点および留意事項に関して、以下の対応を行なった。

領域計画書に記載されている公募研究の規模は10件の採択、研究経費は各年度500万円であったが、留意事項を考慮し、第一回の公募研究の募集では、研究経費を600万円と400万円に分け、12件（600万円クラス3件、400万円クラス9件）を採択した。第二回の公募研究の募集でも同様に、研究経費を600万円と400万円に分け、13件（600万円クラス2件、400万円クラス10件）を採択した。

(中間評価結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況)

-----中間評価結果の所見-----

中間本研究領域では、生命をつなぐための基盤となる、配偶子、そして生殖細胞の生成機序解明とその人工的な再構築に焦点を当てた技術開発が行われた。この分野において世界をリードする我が国の研究者の連携により、卵子を形作る4つの転写因子の同定、卵巣環境再構築、精子形成を可能にする完全合成培地の開発、Mycと生殖細胞排除の関係解明など、期待以上の研究成果を上げた。さらに、マウスES細胞からメスの生殖腺体細胞の分化誘導は、将来的にヒトの*in vitro* 配偶子形成技術の確立につながる成果として期待できる。採択時の所見に対応して、若手を中心とした公募研究件数を増やすなど、領域の時代を担う若手の育成や研究領域の補完が適切に行われている。

㊤一方で、本研究領域で確立した配偶子培養技術の種差に関する検証はこれからであり、マウスから他動物への応用に挑む課題の進展が期待される。また、㊤それぞれの項目での研究の進展に比して、具体的な連携、共同研究の形は現時点では具体化できておらず、今後は更なる研究連携に注力していただきたい。

・上記所見中の下線㊤および㊤で示した点および留意事項に関して、以下の対応を行なった。

㊤: マウスから他動物の応用に挑む課題に集中的に取り組み、以下の研究成果を得た。

1. ラットES細胞を用いて始原生殖細胞の分化過程を再構築した。その手法で得られた始原生殖細胞から受精可能な精子の作製と産仔を得ることに成功した (*Science*. 2022、小林俊班)。
2. ラット精細管の培養において、化学合成培地と酸素条件の最適化により70日を超える長期培養と継続的な精子形成を達成した (*Sci Rep*. 2021、小川班)。

3. ウサギ ES 細胞を用いて始原生殖細胞の分化過程を再構築した。その分化過程は生体内の始原生殖細胞のものと非常に良く似ていた (**Cell Rep.** 2021、小林俊班)。
 4. コモンマーモセット ES 細胞を用いて始原生殖細胞の分化過程を再構築した。その過程はヒトとよく類似していたが、コモンマーモセット特有の誘導条件も明らかとなった (**Sci Rep.** 2023、林班)。
 5. 林らがミナミシロサイ ES 細胞およびキタシロサイ iPS 細胞を用いて始原生殖細胞の分化過程を再構築した。これらの種において、ヒトなどと同様に Sox17 が始原生殖細胞の分化に必須であることが明らかとなった (**Sci Adv.** 2022、林班)。
- ⑧: 留意事項を考慮して、各研究班間の連携と共同研究の形を以下の様に具体化した。
1. (林班-北島班) 転写因子により誘導された卵子様細胞の染色体分離様式を北島班がもつイメージング技術により解析した (**Nature.** 2021)。
 2. (小林俊班-栗本班) ラット ES 細胞から誘導した始原生殖細胞の遺伝子発現を栗本班がもつ解析技術により評価した (**Science.** 2022)。
 3. (吉田班-小川班) *in vitro* gametogenesis を利用して様々な温度で精子形成を試し、わずか 1°C の違いで異なるステップで精子形成障害が起こることを明らかにした (**Communications Biology** 2022)。
 4. (林班-北島班) 北島らの染色体不分離に関する知見により、マウス ES 細胞の性染色体の置き換え (XY→XX) に成功し、それらから機能的な卵子を誘導した (**Nature.** 2023)。
 5. (小川班-金井班) ラットのセルトリ細胞を Amh-Treck システムでセルトリ細胞を除去したマウス精巣に移植して、それらが機能的であることを証明した (**Biol. Reprod.** 2021)。

6 研究目的の達成度及び主な成果

(1) 領域設定期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、(2) 本研究領域により得られた成果について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。(1)は研究項目ごと、(2)は研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で記載すること。なお、本研究領域内の共同研究等による成果の場合はその旨を明確にすること。

(1)領域設定期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか

A01：インテグリティの再構築

何をどこまで明らかにしようとしたか- A01 では大きく以下の3つの達成目標を設定した。(1)in vitro gametogenesis で得られる配偶子の発生率を向上させる。このために、生体と体外培養系で構築される配偶子の比較とともに、化学合成培地や培養用マイクロデバイスの開発を含めた培養条件の検討を行うことにより、in vitro gametogenesis の質的および量的な向上を目指す。(2)これまでのin vitro gametogenesis では再現できない生殖細胞の分化過程を再構築する。このために、生体内の配偶子形成過程との差異に注目して、生体内に存在する様々な環境因子を培養系に導入することにより、生体内に近い配偶子形成過程の再構築を実現する。(3)マウス以外の動物にin vitro gametogenesis を適用させる。このために、様々な動物の生殖細胞や多能性幹細胞を用いて配偶子形成過程を再構築するほか、in vitro gametogenesis のために生体から採取する必要のある細胞(たとえば生殖腺の体細胞)の機能を代替する技術を開発して、様々な動物に適用できる技術基盤を確立する。

どの程度達成できたか-領域設定期間内において、尾畑と小川(ともに計画班)はそれぞれマウス卵子およびマウス・ラット精子を産生できる化学合成培地(*FASEB J*, 2020; *Sci Rep* 2021;論文作成中)を開発した。この開発の過程で、生体内でつくられる配偶子との比較により、体外培養におけるマウスの卵母細胞の成熟や受精卵の発生率の向上には、エストロゲン受容体 ESR1 の制御、AFP(Alpha Fetoprotein)の添加、パルミチン酸やセラミドの合成経路の制御が重要であることを明らかにした(*Development* 2021; *Reproduction* 2021)。また培地添加物の質量解析によりマウス・ラットの精子形成には、抗酸化物質とリゾリン脂質が精子形成に重要であることを明らかにした(*FASEB J*, 2020; *Sci Rep* 2021)。このほか、これまでの解析で様々な候補因子が同定されており、化学的組成が完全に把握された中でそれらの効果を検討する基盤が成立した。これと並行して小川は分担者の木村とともに、精巣の培養において栄養・酸素供給を均一化できるマイクロデバイスを開発した。合成培地の開発を含めて、これらの技術は人為的な制御下で精子形成をリアルタイムで評価するシステムの構築を可能としている。

林(計画班)は生体内と体外培養系におけるマウス卵母細胞の形成過程を比較することにより、低酸素状態と物理的ストレス状態が原始卵胞の維持に必要であることを見出した。実際にそれらの環境を体外培養系で再現すると、これまでのin vitro gametogenesis では不可能であった原始卵胞の静止状態が再構築された(*PNAS*, 2019; *Sci. Adv.*, 2019)。また小川は上記の培養条件の検討により、これまで不可能であったラット精巣の器官培養による円形精子細胞の分化を実現した(*Sci Rep* 2021)。このように、これまでin vitro gametogenesis で再現できなかった雌雄の生殖細胞の分化過程が再現できるようになっている。

小林(計画班)は世界で初めてラット ES 細胞から始原生殖細胞を分化誘導して、それらを精巣に移植することにより産仔を得た(*Science*. 2022)。これに加えて、ウサギ ES 細胞から始原生殖細胞を分化誘導した(*Cell Rep*. 2021)。また、林はマーモセット、ウシ、ミナミキタシロサイからの始原生殖細胞を分化誘導した(*Sci. Adv.*, 2022; *Sci. Rep.* 2023; 論文作成中)。これらの成果の蓄積は様々な哺乳類の多能性幹細胞を用いたin vitro gametogenesis の基盤となる。これに加えて、林はマウス ES 細胞から卵巣の体細胞と同等の細胞を分化誘導し、ES 細胞のみから誘導された卵巣オルガノイドから発生能をもつ卵子を作製した(*Science* 2021)。これにより ES 細胞のみから卵子を作る方法論が示され、他の動物への応用が加速することが期待される。

A02：インテグリティの予見

何をどこまで明らかにしようとしたか- A02 では、配偶子インテグリティを非破壊的に計測するための最先端のイメージング技術と情報処理技術を開発することを達成目標とした。具体的には、計画班研究において八幡が独自に開発した網羅的な細胞の内在性蛍光パターンの特徴を機械学習で識別する CRIF 解析を応用して、配偶子の内在性蛍光パターンを定量的に判定して発生能との相関を調べる。これにより、配偶

子インテグリティを予見的に定量化する手段を確立するとともに、機械が学習したデジタル情報がどのような物質に由来するのかを追究して *in vitro* gametogenesis でつくられた卵子の脆弱性の原因を突止める。また、北島が卵子において異数体が生じる過程をリアルタイムに可視化できるハイスループットかつ高解像度のイメージング技術を用いて、卵母細胞の染色体動態を解析し、染色体数異常分配を予測できる特徴を同定する。さらに、これらの技術により予見された発生能を規定する因子の同定を目指す。これらに加えて、この目的の達成に資する卓越した測定技術をもつ研究者を公募研究班として研究を推進する。

どの程度達成できたか-領域設定期間内において八幡はマウス生体内の卵子について CRIF 解析を行い、青色~緑色の自家蛍光が強い卵子は受精能が低いことを明らかにした、機械学習モデルにより二分した卵子では受精率に大きな差が認められた(受精率 67% vs 9%)。また生体由来の卵子と *in vitro* gametogenesis 由来の卵子を比較したところ、同様の相関が青色~緑色の自家蛍光の強弱に表れた。また染色実験の結果から、この青色~緑色の自家蛍光の空間分布はミトコンドリアの分布とほぼ一致していた。このほか、マウス精細管の器官培養およびニジマスの精子形成細胞において、自家蛍光のみで細胞の種類を区別できる計測技術と分別アルゴリズムを構築した。このアルゴリズムに従ってセッティングしたセルソーターを用いることにより、ニジマスの精原細胞が有意に濃縮された。

北島はまず卵子にプローブをマイクロインジェクションすることなく非侵襲的に染色体・紡錘体をイメージングするシステムを構築した。これを用いた高解像度かつハイスループットの染色体ライブイメージング技術を駆使して、卵子の紡錘体安定性に関わる分子の探索を行い、Ndc80 複合体が Prc1 (アンチパラレルな微小管の架橋因子) を動原体に濃縮させることで紡錘体形成を促進することを見出した (*Nat. Commun.* 2020)。また動原体で微小管を制御する因子である Prc1 の局在制御が Cdk1 キナーゼを介することを明らかにするとともに (*Genes Cells* 2020)、動原体-微小管接続の安定性が、紡錘体極のインテグリティおよび紡錘体長の制御に必要であることを明らかにした (*EMBO Rep* 2021)。また林が体外培養系で作製した減数分裂を介さない卵子様細胞で、染色体が異常に分裂する様子を観察した (*Nature* 2021)。これと同時に、老化卵子を用いた染色体分配のイメージング、トランスクリプトーム解析、質量解析により、老化卵子と若齢卵子の違いを多角的に明らかにした (*Aging Cell* 2021; *EMBO Rep* 2022)。

公募班においては小川および松本が微量サンプルからそれぞれ転写産物とエピゲノムおよびタンパクを定量的に解析する方法を開発した (*Nat Commun.* 2020, 2021; *Anal. Chem.* 2020)。以上のように配偶子インテグリティを非侵襲的に予測する技術の開発は進んでいる。今後はこれらを基盤として、計測の対象細胞によって技術的な改良を積み重ねて発展していくことが予想される。

A03 : インテグリティの理解

何をどこまで明らかにしようとしたか- A03 では、生体内で高いインテグリティを実現する配偶子の発生プロセスを、「細胞の不均一性と選択」という観点から理解する。具体的には生殖細胞の集団が「いつ、どこで、どのようにして変化しているか？」を単一細胞レベルで細胞運命のトラッキングと遺伝子発現解析を可能にする。また細胞の選択が破綻した時のアウトカムについて、個体レベルで解析する。これらに加えて、生殖細胞の集団の変化に関する現象に独自の視点でアプローチしている研究班を公募班として加えて、生殖細胞系列の不均一性と選択について理解を深める。

どの程度達成できたか- 吉田 (計画班) は 100 万種類以上の細胞を個別に標識できるバーコード解析により生殖細胞レパートリーの変遷を追跡した結果、初期の生殖細胞の発生における細胞クローンの減少と、後期における細胞クローンのバリエーションの保存を見出した。初期の削減は配偶子形成能を獲得した生殖細胞を選別する過程である可能性が示唆された。また、この実験系を *in vitro* gametogenesis において比較している。さらに、成体期のホメオスタシスにおけるクローン選択のメカニズムとして、精子幹細胞が生体内の限られた量の自己複製因子を消費して競合することを見出した、数理モデルを構築した (*Cell Stem Cell* 2019)。これに加えて、マウス精子幹細胞が複数の状態を常に転換して不均一な集団を作ること、最も未分化な亜集団 (Plvap+) は最も分裂頻度が低いことを見いだして数理モデルを構築した。これにより突然変異を伴う分裂を抑制しつつ、多くの精子を生み出す巧妙な動態を明らかにした (*Cell Reports* 2022)。これらの研究によりマウスの雄の生殖細胞系列の集団が「いつ」変化するかについては一定の理解を得た。栗本 (計画班) はその変化が「どこで」起こっているかを調べるために、空間的な位置情報を維持した単一細胞遺伝子発現解析法の開発を行った。具体的には、固定した組織切片から回収した細胞を用いて、新鮮な単一細胞と同等の RNA-seq を行える技術を確立した。この技術の実証実験として、同一

卵胞内の異なる領域に位置する顆粒膜細胞が異なる遺伝子を示すことを示した (*BioRxiv*, 2022; 査読中)。小林(悟)(計画班)はショウジョウバエの生殖細胞系列においてゲノム損傷をもつ生殖細胞の排除には *Myc* の発現低下が必要であり、*Myc* を強制発現するとゲノム損傷を許容する生殖細胞が作られることを明らかにした (*Commun Biol*, 2020)。これは「どのようにして」にアプローチした研究成果と言える。これらのほか、丹羽(公募班)は交尾や栄養状態などの外的刺激が生殖幹細胞の増殖を制御する神経内分泌シグナルを明らかにした (*eLife*, 2020; *Sci. Adv.*, 2023; *Development*. in press)ほか、加藤(公募班)は卵母細胞のリザーバーとして機能する原始卵胞において、P-body 様顆粒の形成と原始卵胞の活性化には負の相関があること、また顆粒の形成に必要な *Ddx6* の変異体は原始卵胞が早期枯渇することを明らかにした (*Biol. Reprod.* 2023)。これに加えて、生体内の原始卵胞のイメージングシステムも構築している。このように生体内の生殖細胞の「細胞の不均一性と選択」にスポットを当てることにより、これまでひとつの細胞集団という前提で進められてきた生殖細胞研究に新しい視点を吹き込むとともに、in vitro gametogenesis における新しい評価基準を設けることに成功している。

(2) 本研究領域により得られた成果

A01: インテグリティの再構築

●計画研究●

林班: ① 生体内と体外培養系の卵母細胞系列のトランスクリプトームの比較をもとに低酸素条件と周囲の環境からの物理的刺激が原始卵胞の成立に重要であることを明らかにした。それらを再構築すると静止状態の原始卵胞が体外培養系で再構築された(*PNAS*, 2019; *Sci. Adv.*, 2019)。② 卵子を形成するために十分な転写因子群(*Nobox*, *Figla*, *Tbpl2*, *Lhx8*)を同定した。これらの因子を ES 細胞に強制発現させると受精可能な卵子様細胞に分化した(*Nature*, 2021)。北島班との共同研究 ③ in vitro gametogenesis のマウス以外の動物への適用として、コモンマーモセット、キタシロサイの ES/iPS 細胞から始原生殖細胞を分化誘導する方法を確立した(*Sci. Adv.*, 2022; *Sci. Rep.* 2023)。④ マウス胎仔卵巣の体細胞と同等の細胞を ES 細胞から分化誘導する方法を確立した。分化誘導した細胞は卵子形成の支持に十分であり、ES 細胞のみから構成される卵巣オルガノイドから発生能をもった卵子を得ることができた(*Science*, 2021)。⑤ マウス ES 細胞を用いて性染色体のセットを改変する技術を構築した。XO や XY から XX が構築でき、それから分化誘導した卵子は発生能をもつことが確認された(*Nature*, 2023)。

小川班: ① マウスおよびラット精巣の器官培養系を化学合成培地で行った。この培養法の確立の過程で抗酸化物質とリゾリン脂質が精子形成に重要であることを明らかにした(*FASEB J*, 2020; *Sci Rep* 2021)。② ラットのセルトリ細胞を *Amh-Treck* システムでセルトリ細胞を除去したマウス精巣に移植して、それらが機能的であることを証明した(*Biol. Reprod.* 2021)。金井班(公募)との共同研究

尾畑班: ① ウシ胎仔血清存在下で培養した卵巣ではエストロゲン受容体 *ESR1* が *Amh* の発現を早期に誘導して卵胞形成が異常になることを明らかにした。また、胎仔肝臓由来の AFP を添加することで、卵胞形成異常が回避されることを明らかにした(*Development* 2021)。諸白班(公募)との共同研究 ② 生体と体外培養由来の卵母細胞の遺伝子発現を比較した結果、パルミチン酸やセラミドの合成経路の遺伝子の発現上昇を認め、体外培養由来の卵母細胞でこれらが多く含まれていることを確認した。これらは培養の酸素濃度を 5-7% に低下させることにより、生体由来の卵母細胞と同程度となった(*Reproduction* 2021)。

小林俊班: ① 始原生殖細胞に特異的な *Prdm14-Venus*, *Tfap2c-T2A-tdTomato* レポーターラットを作製し、始原生殖細胞の発生メカニズムを明らかにした。*Prdm14* はラット始原生殖細胞の発生に不可欠であることを明らかにした (*Development*, 2020; *Mol Reprod Dev.* 2022)。栗本班との共同研究 ② ラットおよびウサギ ES 細胞を用いて始原生殖細胞の分化過程を再構築した。その手法で得られた始原生殖細胞から受精可能な精子の作製と産仔を得ることに成功した(*Cell Rep.* 2021; *Science.* 2022)。栗本班との共同研究

○公募研究○ 諸白班: ① 直径 50-60 μm のマウスの初期一次卵胞を成熟培養する方法を開発して、得られた成熟卵の体外受精および胚移植により、世界で初めて産仔の作出に成功した(*J Reprod. Dev* 2022)。

齋藤班: ① L(3)mbt 遺伝子ノックアウトハエでは、脳などの体細胞株で顕著に生殖細胞由来遺伝子が発現することから、L(3)mbt 遺伝子のパートナー遺伝子を探索し、CG2662 を同定した(*EMBO reports*, 2022)。

A02: インテグリティの予見

●計画研究●

北島班: ① 卵子の紡錘体安定性に関わる分子の探索を行い、Ndc80 複合体が Prc1 (アンチパラレルな微小管の架橋因子) を動原体に濃縮させることで紡錘体形成を促進することを見出した (*Nat. Commun.* 2020)。② 動原体で微小管を制御する因子である Prc1 の局在制御が Cdk1 キナーゼを介することを、ライブイメージング及び in vitro 解析から明らかにした (*Genes Cells* 2020)。③ 動原体-微小管接続の安定性が、紡錘体極のインテグリティおよび紡錘体長の制御に必要であることを明らかにした (*EMBO Rep* 2021)。

④老化卵子を一細胞 RamDA-seq で解析することで、老化依存的なトランスクリプトーム変化の特徴を見出した (*Aging Cell* 2021)。⑤染色体分配装置である紡錘体を卵子から顕微操作によりちぎり取る方法を開発した。これにより紡錘体付近の LC-MS/MS 解析を可能にしたほか、卵母細胞に父性染色体を導入して機能的な卵子を作出する手法を確立した (*EMBO Rep* 2022)。

八幡班：①内在性蛍光パターンをスキャンするために、各励起波長の強さを記録する顕微鏡制御プログラムと、得られた撮影データから一細胞ごとの内在性蛍光パターンを再構築するアルゴリズムを作成した。[小川班との共同研究] ②生体内でつくられた卵子について CRIF 解析を行い受精能のない卵子は青色~緑色の自家蛍光が有意 ($P < 0.01$) に高いことを明らかにした。さらに、予測受精能を機械学習モデル (CNN) で二分した卵では、予測通り受精率に大きな差があった (受精率 67% vs 9%)。[尾畑班との共同研究]

③体外培養由来の卵母細胞の受精能を CRIF 解析により予測した結果、受精率が高い条件で培養した卵母細胞ほど、多変量分析 (PCA) 空間内の特定主成分が低い領域に分布する蛍光が観察された。おもに青色~緑色の自家蛍光が受精率と相関を示した。[尾畑班との共同研究]

○公募研究○ 松本班：①マウス卵子の 1 細胞プロテオームへの適用を達成するために、1 細胞プロテオーム解析に資する質量分析技術の超高感度化を行なった (*Anal. Chem.* 2020)。②独自に開発してきた革新的なタンパク質絶対定量法である iMPAQT 法を応用して、高速代謝酵素定量マッピング法の確立を行なった (*Nat. Commun.* 2020)。③マウス卵子およびその初期発生過程のショットガンプロテオミクスを行い、マウス卵子関連プロテオームのデータベース化を行った。

大川班：①独自に開発した ChILT 法を改良し、単一細胞レベルでトランスクリプトームとエピゲノムを同時に検出する技術を開発した。また、RNA pol II のゲノム上へのリクルートとエピゲノムを同時に検出できる multi-targeted ChILseq を開発した (*Nat Protoc.* 2020)。②組織切片上で光を照射した領域の遺伝子発現解析を可能にする PIC (Photo-isolation chemistry) 法を開発した (*Nat Commun.* 2021; *STAR Protoc* 2022)。

A03: インテグリティの理解

●計画研究●

吉田班：①成体期の精子形成過程におけるクローン選択のメカニズムとして、精子幹細胞が生体内の限られた量の自己複製因子を消費して競合することを見出して、数理モデルを構築した (*Cell Stem Cell* 2019)。

[小林班との共同研究] ②マウス精子幹細胞が複数の状態を常に転換して不均一な集団を作ること、最も未分化な亜集団 (Plvap+) は最も分裂頻度が低いことを見だし、数理モデルを構築した。これにより突然変異を伴う分裂を抑制しつつ多くの精子を生み出す巧妙な動態を明らかにした (*Cell Reports* 2022)。

[水野班との共同研究] ③マウス精子幹細胞をする際に薬剤でドナー細胞の分化を一時的に抑制すると、未分化状態を維持する細胞が増えて移植効率が約 10 倍向上した。さらに、通常では宿主オスの妊孕性を回復できない移植条件でも、自然交配で産仔が得られた (*Cell Stem Cell* 2021)。④ニトリ始原生殖細胞の増殖を促す培養系を改善し、天然記念物を含む多様なニトリ品種において配偶子への分化能を維持した PGC 株を樹立した。さらに、生細胞の回収率が 60% を超える新たな凍結保存液を開発し、天然記念物品種を用いた実証試験に成功した (*J Reprod. Dev.* 2023)。⑤様々な温度で *in vitro* gametogenesis を行い、精子形成の高温障害を解析した結果、第一減数分裂前期の DNA 二重鎖切断修復と染色体対合が 37-38 度で特異的に障害され、これらの細胞は減数分裂チェックポイントで除去されることを明らかにした (*Commun. Biol.* 2023)。

[小川班との共同研究] 小林悟班：①ショウジョウバエの生殖細胞系列において P 因子の転移により損傷したゲノムをもつ生殖細胞は Myc の発現が低下すること、Myc を強制発現すると配偶子の産生能が回復すること、さらに回復した状況下でつくられた生殖細胞はゲノムの損傷を多く持つことを明らかにした (*Commun Biol*, 2020)。

②始原生殖細胞を決定する母性因子 *Nanos* および *Pgc* はともに PGCs において体節形成に関わる体細胞遺伝子の発現を抑制することを明らかにした (*PLoS Genetics*, 2019)。また、*Pgc* が PGCs の細胞分裂を抑制することも明らかにした (*iScience*, 2020)。

栗本班：①サンプルの抽出と cDNA の増幅の条件検討により、凍結セルブロックから切り出した細胞において、新鮮な単一細胞と同等の RNA-seq を行える技術を確立した。この技術を用いて、卵母細胞に隣接する顆粒膜細胞と隣接しない細胞との間で発現レベルの異なる遺伝子を同定した (*BioRxiv*, 2022; 査読中)。また、組織切片から採取した細胞からエキソソーム解析を行い、卵母細胞特異的なスプライズアイソフォームを多数検出した (*BioRxiv*, 2022; 査読中)。

○公募研究○ 丹羽班：①キイロショウジョウバエのメス生殖幹細胞を制御する遠距離シグナルとしてオクトパミンを同定した。脳・神経系由来のオクトパミンは受容体 *Oamb* を介してニッチ細胞を含む卵巣体細胞に受容されることにより生殖幹細胞の増殖が促されることが明らかとなった (*eLife*, 2020)。②キイロショウジョウバエの交尾依存的な生殖幹細胞の増殖において NPF 分泌と餌由来のフルクトースが影響を与えることを解明した (*Sci. Adv.*, 2023)。③冬季条件における昆虫の生殖系列の発達抑制の過程で生殖休眠に必要な神経ペプチド DH31、および DH31 産生神経による生殖休眠制御系を発見した

(*Development*, in press)。

金井班：①曲精細管と精巣網の間に存在するセルトリバルブ(SV)弁に特異的な低 RA シグナル状態が、SV 弁での精子形成を抑制しているだけでなく、物理的に弁構造の維持に関与していることを明らかにした(*Sci Rep.* 2021)。②精巣網特異的に *Sox17* を欠損させた精巣では、SV 領域の弁構造が消失し、精巣網の内腔液が曲精細管へと逆流し、円形精子細胞の脱落と精子形成障害を誘導することを明らかにした。RNAseq 解析により、野生型の精巣網上皮では *RSPO1*、*FGF9* などのパラクライン因子が高発現しており、*Sox17* 欠損精巣ではこれらの因子の発現が顕著に低下することが判明した(*Nat Commun.* 2022)。

加藤班：①卵母細胞特異的 *Ddx6* 変異体を用いた解析から、同変異体では原始卵胞が異常な卵胞成長を開始し、生後 10 週齢以内に原始卵胞が枯渇することが明らかとなった(*Biol. Reprod.* 2023)。②生殖細胞を欠損するマウスを用いて、原始卵胞形成時期の RNA-seq 解析を行い、顆粒膜細胞において生殖細胞依存的または非依存的な発現を示す遺伝子を単離した(*Biol. Reprod.* 2021)。

林(陽)班：①胎仔生殖細胞の代謝特性の性差と分化段階による変化を明らかにし、雌雄生殖細胞で特徴的な代謝系を抽出した(*Biol. Reprod.* 2020)。

高瀬班：①遺伝子改変により顆粒膜細胞特異的に Wnt 分泌を抑制したマウスでは原始卵胞活性化に伴う顆粒膜細胞の分化成熟が阻害された。これに伴い発育卵胞数も有意に減少した。また顆粒膜細胞は Wnt シグナルを強く受容しており、Autocrine に機能する可能性が示された(*Development.* 2021)。

小林一班：①プラナリアの有性化を阻害している共生細菌を、有性個体と無性個体の細菌叢の比較により同定した。またメタボローム解析により有性化阻害因子の候補を同定した(*Sci. Rep.* 2019)。

淨住班：①精子成熟を制御する新たなルミクリン因子 NICOL を同定した。NICOL を欠損させたマウスはルミクリンシグナル伝達の不全により精子が成熟せず不妊となる(*J Biochem* 2021)。

河野班：①Phosphoinositide の異性体を超臨界クロマトグラフィーで分離・測定する系を作成し、精巣を解析した結果、精巣には他の臓器にはみられない飽和型の phosphoinositide が存在することを見出した(*Commun Biol* 2022; *Med Mass Spectrom* 2022)。

前澤班：①精子形成期の遺伝子発現を制御するクロマチンアクセシビリティの変化を ATAC-seq 等により明らかにして、それらに結合する新規の転写因子を同定した。さらに、精子形成期特異的なクロマチン高次構造制御機構の一旦を明らかにした(*Nucleic Acids Res, in press; Methods Mol Biol.* 2023)。

7 研究発表の状況

研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で、本研究領域により得られた研究成果の発表の状況（主な雑誌論文、学会発表、書籍、産業財産権、ホームページ、主催シンポジウム、一般向けアウトリーチ活動等の状況。令和5年6月末までに掲載等が確定しているものに限る。）について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。なお、雑誌論文の記述に当たっては、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究代表者（発表当時、以下同様。）には二重下線、研究分担者には一重下線、corresponding author には左に*印を付すこと。

A01：インテグリティの再構築

●計画研究1：林克彦・吉崎悟朗（分担）・平尾雄二（分担）●

雑誌論文（査読あり、抜粋9件ほか原著論文6件、英語総説6件）：

1. Murakami K, (14 authors), *Hayashi K. Generation of functional oocytes from male mice in vitro. *Nature* Mar 15. (2023)
2. Hayashi M, (14 authors), *Hayashi K. Robust induction of primordial germ cells of white rhinoceros on the brink of extinction. *Sci Adv*. 8: eabp9683 (2022)
3. Naitou Y, (6 authors), *Hayashi K. Dual role of *Ovol2* on the germ cell lineage segregation during gastrulation in mouse embryogenesis. *Development* 149: dev200319 (2022)
4. Yoshino T, (13 authors), *Hayashi K. Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science* 373: eabe0237 (2021)
5. *Hamazaki N, (11 authors), *Hayashi K. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature* 589: 264–269 (2021)
6. Iwasaki-Takahashi Y, (9 authors), *Yoshizaki G. Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Commun. Biol.* 3: 308 (2020)
7. Ichida K, (6 authors), *Yoshizaki G. Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye-conjugated antibodies. *Biol Reprod*, 100, 1637-1647. (2019)
8. *Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, Nishimura Y, *Hayashi K. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Sci Adv*. 5: eaav9960. (2019)
9. Shimamoto S, (6 authors), *Hayashi K. Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of *Foxo3*. *PNAS* 116:12321-12326. (2019)

学会発表（抜粋1件、ほか54件）：Hayashi K: Reconstitution of gametogenesis using pluripotent stem cells. Cold Spring Harbor Meeting Oct 5-9, 2022 NY, USA

産業財産権：

1. 永松剛、林克彦: 始原生殖細胞を in vitro で原始卵胞に分化する方法、出願番号:PCT/JP2019/21209
2. 平尾雄二: 二次卵胞内卵母細胞の培養方法及び培養用器具。出願番号:特願 2023-047840

ホームページ（抜粋1件、ほか2件）：研究領域 HP <https://www.gamete-integrity.com/achievement/2019>
一般向けのアウトリーチ活動（抜粋1件、ほか5件）：林克彦：第115回日本繁殖学会 市民公開講座 2022年9月11日

●計画研究2：小川毅彦・木村啓志（分担）・鈴木貴紘（分担）●

雑誌論文（査読あり、抜粋5件ほか原著論文5件、英語総説1件）：

1. Feng X, (10 authors), *Ogawa T. In vitro spermatogenesis in isolated seminiferous tubules of immature mice. *PLoS One*.18(4):e0283773. (2023)
2. Higuchi K, Matsumura T, Akiyama H, Kanai Y, Ogawa T, *Sato T. Sertoli cell replacement in explanted mouse testis tissue supporting host spermatogenesis. *Biol Reprod*. ioab104 (2021)
3. Matsumura T, (8 authors), *Ogawa T. Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Sci Rep*. Feb 10;11(1):3458. (2021)
4. Abe T, (3 authors), Ogawa T, *Suzuki T. Transcriptome analysis reveals inadequate spermatogenesis and immediate radical immune reactions during organ culture in vitro spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 530(4): 732-738. (2020)
5. Abe T, (3 authors), Ogawa T, *Suzuki T. Time-course microarray transcriptome data of in vitro cultured testes and age-matched in vivo testes. *Data in Brief* 33: 106482. (2020)
6. Sanjo H, (13 authors), *Ogawa T. Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB J.*, June 2. (2020)
7. Komeya M, (7 authors), *Ogawa T. In vitro spermatogenesis in two-dimensionally-spread mouse testis tissues. *Reprod Med Biol*.18: 362-369. (2019)
8. Ogawa T. Live Offspring after Testis Tissue Transplantation. *N Engl J Med*. 381:1477-1479. (2019)

学会発表（抜粋1件、ほか15件）：小川毅彦：教育講演「精子幹細胞」第67回日本生殖医学会学術講演会・総会 2022年11月3日パシフィコ横浜

●計画研究3：尾畑やよい●

雑誌論文（査読あり、抜粋8件ほか原著論文2件）：

1. Ikeda S, (5 authors), *Obata Y. Disruption of piRNA machinery by deletion of *ASZ1/GASZ* results in the expression of aberrant chimeric transcripts in gonocytes. *J Reprod Dev*. 68, 125-136. (2022)
2. Tanimoto R, Yoshida K, Ikeda S, *Obata Y. Insights into in vivo follicle formation: a review of in vitro systems.

- Histochem Cell Biol.* 157, 333-345. (2022)
- Ota S, (2 authors), *Obata Y. Optimal conditions for mouse follicle culture. *J Reprod Dev* 67, 327-331. (2021)
 - Takashima T, Fujimaru T, *Obata Y. Effect of in vitro growth on mouse oocyte competency, mitochondria and transcriptome. *Reproduction.* 162, 307-318. (2021)
 - Sasaki K, Takaoka S, *Obata Y. Oocyte-specific gene knockdown by intronic artificial microRNAs driven by Zp3 transcription in mice. *J Reprod Dev.* 67, 229-234. (2021)
 - Wang W, Kang T, Bai L, Hu W, Obata Y, Li J. Separation of Follicular Cells and Oocytes in Ovarian Follicles of Zebrafish. *J Vis Exp.* (170). (2021)
 - Tanimoto R, (4 authors), *Obata Y. Blocking estrogen-induced AMH expression is crucial for normal follicle formation. *Development.* (2021) 148, dev197459.
 - Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Sato Y, Hasegawa S, Kono T, Morohaku K, *Obata Y. Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice. *Mol Reprod Dev.* 86, 614-623. (2019) **Top Downloaded Paper 2018-2019 in Mol Reprod Dev.**
- 学会発表 (抜粋 1 件、ほか 12 件) : 尾畑やよい : 生命をつなぐ生殖細胞～受精卵ができるまで～. 第 130 回日本畜産学会公開シンポジウム 招待公演. 2022 年 6 月 10 日
書籍 : 尾畑やよい : 遺伝的性の決定、繁殖生物学 改訂版. 日本繁殖生物学会編. インターズー. (2020)

●計画研究 4 : 小林俊寛●

雑誌論文 (査読あり、抜粋 6 件ほか原著論文 10 件、英語総説 1 件) :

- Oikawa M, (12 authors), *Kobayashi T Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats. *Science.* Apr 8;376(6589):176-179. (2022)
- Oikawa M, (9 authors), *Kobayashi T Generation of Tfp2c-T2A-tdTomato knock-in reporter rats via adeno-associated virus-mediated efficient gene targeting. *Mol Reprod Dev.* 89:129-132. (2022)
- *Kobayashi T, (11 authors), Surani MA*. Tracing the emergence of primordial germ cells from bilaminar disc rabbit embryos and pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 37:109812. (2021)
- *Alberio R, Kobayashi T, *Surani MA. Conserved features of non-primate bilaminar disc embryos and the germline. *Stem Cell Reports.* 16:1078-1092. (2021)
- Kobayashi T, (12 authors), *Hirabayashi M. Blastocyst complementation using Prdm14 deficient rats enables efficient germline transmission and generation of functional mouse spermatids in rats. *Nat Commun* 12:1328 (2021)
- Kobayashi T, Kobayashi H, (8 authors), Kurimoto K, *Hirabayashi M. Germline Development in Rat Revealed by Visualization and Deletion of *Prdm14*. *Development.* 147: dev183798. (2020)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 14 件) : 小林 俊寛: In vivo および in vitro におけるラット多能性幹細胞からの生殖細胞誘導. 第 21 回 日本再生医療学会総会 (招待講演) , 2022 年 3 月 19 日, オンライン

○公募研究: 原健士朗○

雑誌論文 (査読あり、抜粋 1 件ほか原著論文 3 件、英語総説 1 件) : Rezende-Melo CA, Caldeira-Brant AL, (著者 5 名略), Hara K, Yoshida S, Meistrich ML, and *Chiarini-Garcia H: Spermatogonial asynchrony in Tex14 mutant mice lacking intercellular bridges. *Reproduction* 60:205-215. (2020).

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 1 件) : Hara K: Sperm stem cell behaviors in mammalian testis, International symposium on new insights on animal nutrition, breeding and reproduction, Yangzhou, (2019).

○公募研究: 諸白家奈子○

学会発表 : Morohaku K, Kohama T: "In vitro growth of early preantral follicles by two culture protocols", Society for the Study of Reproduction, 52th Annual conference, San Jose, CA, USA 2019 年 7 月 18 日～7 月 21 日

○公募研究: 斎藤 都暁○

雑誌論文 (査読あり) : Yamamoto-Matsuda H, (4 authors), *Saito K, *Yamanaka S, *Siomi MC: Lint-O cooperates with L(3)mbt in target gene suppression to maintain homeostasis in fly ovary and brain. *EMBO rep.* 23:e53813, 2022

A02 : インテグリティの予見

●計画研究 5 : 北島智也●

雑誌論文 (査読あり、抜粋 6 件ほか原著論文 7 件) :

- Ogonuki, N, (9 authors), *Kitajima TS, and *Ogura, A. Birth of mice from meiotically arrested spermatocytes following biparental meiosis in halved oocytes. *EMBO Reports* 23(7): e54992. (2022)
- Mishina, T, (8 authors), and *Kitajima TS. Single-oocyte transcriptome analysis reveals aging-associated effects influenced by life stage and calorie restriction. *Aging Cell* 20(8): e13428. (2021)
- Courtois A, Yoshida S, Takenouchi O, Asai K, and *Kitajima TS. Stable kinetochore-microtubule attachments restrict MTOC position and spindle elongation in oocytes. *EMBO Reports* e51400. (2021)
- Nishiyama, S., Yoshida, S., and *Kitajima TS. Cdk1 negatively regulates the spindle localization of Prc1 in mouse oocytes. *Genes to Cells* 25(10):685-694. (2020)
- Yoshida S, (11 authors), *Kitajima TS. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nature Commun.*, doi:10.1038/s41467-020-16488-y. (2020)
- Ding Y, Kaido M, Llano E, Pendas AM and *Kitajima TS. The post-anaphase SUMO pathway ensures the maintenance of centromeric cohesion through meiosis I-II transition in mammalian oocytes. *Current Biology* 28(10): 1661-1669. (2018)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 25 件) : Kitajima, T. S.: "Functional relevance of the two-pronuclear state in zygotes"

EMBO Workshop Chromosome segregation and aneuploidy. 2022.5.4. (Vienna, Austria)

書籍 (抜粋 1 件、ほか 4 件) : Courtois, A., Solc, P., and Kitajima, T.S. Triple-color live imaging of mouse oocytes. *Mouse Oocyte Development*. Springer, 1818:89-97. (2018)

ホームページ : 理化学研究所生命機能研究センター <http://chromosegr.riken.jp/index.html>

●計画研究 6 : 八幡穰●

雑誌論文 (査読あり) :

1. Okano C, Takabe K, Hirayama T, Nomura N, *Yawata Y. Three-dimensional morphology of bacterial community developed on the index-matched materials. *Sci Rep*, 11:19508. (2022)
2. Hirayama T, Takabe K, Kiyokawa T, Nomura N, *Yawata Y. Reconstruction of Single-Cell Innate Fluorescence Signature by Confocal Microscopy, *Journal of Visualised Experiments* 159, (2020)
3. *Yawata Y. (4 authors), *Nomura N.. Intra and inter species variability of single-cell innate fluorescence signature of microbial cell, *Applied and Environmental Microbiology* 85, e00608-19 (2019)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 10 件) : Yawata Y. Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy TSB2019, 2019.11 Thailand

ホームページ : <https://yawatalab.jp>

○公募研究 : 松本雅記○

雑誌論文 (査読あり、抜粋 2 件ほか原著論文 13 件) :

1. Kito Y, *Matsumoto M., Hatano A, Takami T, Oshikawa K, Matsumoto A, *Nakayama KI. Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin. *Sci.Rep.* 10(1): 5801. (2020)
2. Kodama M, Oshikawa K, (7 authors), *Matsumoto M., and *Nakayama KI. A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer. *Nat. Commun.*, 11(1):1320, 2020

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 2 件) : Matsumoto M.: New platform for protein absolute quantification: a tool for pathway structure determination 1st International symposium on Interdisciplinary Approaches to Integrative Understanding of Biological Signaling Networks, Tokyo (2019)

○公募研究 : 阿部宏之○

雑誌論文 (査読あり、抜粋 2 件ほか共著原著論文 3 件) :

1. *Nishizono H, Darwish M, Endo TA, Abe H., Glycine receptor $\alpha 4$ subunit facilitates the early embryonic development in mice. *Reproduction*. 159: 41 (2020)
2. *Sato M, Eto K, Goto T, Kurotani R, Abe H., Nishidate I. In-vitro rat brain imaging through full-field optical coherence microscopy using ultrathin short multimode fiber probe. *Applied Sciences*. 9 (2), 216. (2019)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 5 件) : 近藤綾香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之.:卵管液アミノ酸組成を基本とするウシ胚培養液の開発、第 60 回日本卵子学会、第 60 回日本卵子学会、広島市。(2019)

○公募研究 : 大川恭行○

雑誌論文 (査読あり、抜粋 2 件ほか原著論文 52 件) :

1. Honda M, *Okai S. (5 authors), *Ohkawa Y. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun*. 12(1):4416 (2021)
2. Oka M, Mura S, (7 authors), Ohkawa Y. “Chromatin-bound CRM1 recruits SET-Nup214 and NPM1c onto HOX clusters causing aberrant HOX expression in leukemia cells.” *Elife* 8. Pii: e46667. (2019)

書籍 : 原田 哲仁, 大川 恭行 : 実験医学「クロマチン挿入標識法による単一細胞エピゲノム解析」(2019)

産業財産権 : 大川 恭行、原田哲仁 : 対象核酸の塩基配列を 1 細胞レベルで並列に検出する方法、出願番号 : 特願 2020-017027 [2020.2.4]、出願人 : 国立大学法人九州大学

○公募研究 : 塚本智史○

雑誌論文 (査読あり) :

1. Ibayashi M, Aizawa R, Mitsui J, *Tsukamoto S. Lipid droplet synthesis is associated with angiogenesis in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 108:492-503 (2023)
2. Ibayashi M, Aizawa R, Mitsui J, *Tsukamoto S. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 162: R99-R109 (2021)

A03 : インテグリティの理解

●計画研究 7 : 吉田松生●

雑誌論文 (査読あり、抜粋 5 件ほか原著論文 11 件、英文総説 1 件) :

1. Nakagawa T, (11 authors) *Yoshida S and *T. Nagasawa: A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis. *Cell Reports* 37, 109875 (2021)
2. Y. Nakamura, D.J. Jörg, Y. Kon, B.D. Simons and *Yoshida S.: Transient suppression of transplanted spermatogonial stem cell differentiation restores fertility in mice. *Cell Stem Cell* 28, 1443-1456 (2021)
3. Rezende-Melo CA, (7 authors), Yoshida S., Meistrich ML, and *Chiarini-Garcia H: Spermatogonial asynchrony in Tex14 mutant mice lacking intercellular bridges. *Reproduction* 160: 205-215 (2020)
4. Kitadate Y, (20 authors), *B.D. Simons and *Yoshida S.: Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. *Cell Stem Cell* 24, 79-92 (2019)
5. Nakamura Y., Nakane Y and *Tsudzuki M: Developmental stages of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*). *Anim Sci J* 90, 35-48 (2019)

学会発表 (抜粋 2 件、ほか 16 件) :

1. Yoshida S: Dynamics of sperm stem cell self-renewal in the mouse testis. EMBO The Company of Biologists Workshop "Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology" April 26-19 2022
2. Yoshida S: Towards a Better Understanding of Spermatogenic Stem Cells. The Society for the Study of Reproduction 51st Annual Conference, New Orleans, USA, July 10-13, 2018. (state-of-the-art plenary lecture) 書籍 (抜粋 2 件、ほか 1 件) :

1. *Yoshida S: Mouse Spermatogenesis Reflects the Unity and Diversity of Tissue Stem Cell Niche Systems. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, (2020)
2. *Yoshida S: Heterogeneous, dynamic, and stochastic nature of mammalian spermatogenic stem cells. **Curr Top Dev Biol** 135, 245-285 (2019)

一般向けのアウトリーチ活動 (抜粋 2 件、ほか 12 件) :

1. 吉田松生 : 生き物研究ミニトーク「命をつなぐ生殖細胞の謎」基礎生物学研究所 2022 年 10 月 1 日
2. 中村隼明 「トビがタカを産む研究」, 広島市立基町高校 広島、2019 年 7 月 10 日

●計画研究 8 : 小林悟●

雑誌論文 (査読あり、抜粋 7 件ほか原著論文 7 件) :

1. Asaoka M, (6 authors), *Kobayashi S. Offspring production from cryopreserved primordial germ cells in *Drosophila*. **Communications Biology**, 4, 1159. (2021)
2. Ota R, Hayashi M, Morita S, Miura H, and *Kobayashi S. Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. **Scientific Reports**, 11, 4890. (2021)
3. Ota R and *Kobayashi S. Myc plays an important role in *Drosophila* PM-hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage. **Communications Biology**, 3, 185. (2020)
4. Morita S, Ota R, Hayashi M and *Kobayashi S. Repression of G1/S transition by transient inhibition of miR-10404 expression in *Drosophila* primordial germ cells. **iScience**, 23, 100950. (2020)
5. Nakamura S, (8 authors), Kobayashi S, and *Mukai M. A truncated form of a transcription factor Mamo activates *vasa* in *Drosophila* embryos. **Communications biology**, 2: 422. (2019)
6. Kutsukake M, (5 authors), Kobayashi S, and *Fukatsu T. Exaggeration and co-option of innate immunity for social defence. **PNAS**, 116, 8950-8959. (2019)
7. *Asaoka M, (2 authors), *Kobayashi S. Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the *Drosophila* germline. **PLoS Genetics**, 15, e1008090 (2019)

学会発表 (抜粋1件、ほか招待講演7件、学会発表58件) : 小林悟 : 次代に生命をつなぐ生殖細胞の作られる仕組み 大隅基礎科学創発セミナー東京2018年4月

書籍 (抜粋 1 件、ほか総説 2、分担図書 2) : Hayashi Y and Kobayashi S. Regulatory mechanism of the germline stem cell niche in *Drosophila melanogaster*. **Reproductive and Developmental Strategies**, Springer, p19-35. (2018)

一般向けのアウトリーチ活動 (抜粋 1 件、ほか 13 件) :

1. 小林悟 : 茨城県立竹園高等学校 先端科学講座「動物における生殖細胞形成メカニズム」2018 年 12 月

●計画研究 9 : 栗本一基●

雑誌論文 (査読あり、抜粋 2 件ほか原著論文 6 件、英文総説 1 件) :

1. Richard Albert J, (11 authors), Kurimoto K, Greenberg MVC., Lorincz M, *Kobayashi, H., 2023. Conservation and divergence of canonical and non-canonical imprinting in murids. **Genome Biol** 24, 48.
2. Nagaoka S, Nakaki F, (9 authors), Kurimoto K, Hayashi K, Nakamura T, Yamamoto T, and *Saitou M. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. **Science**, 367, eaaw4115 (2020)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 3 件) : 栗本一基、始原生殖細胞の発生とエピゲノムリプログラミング、第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 98 回日本生理学会大会、演題 SY09-2 (招待講演) (2021 年)

○公募研究 : 加藤譲○

雑誌論文 (査読あり) :

1. *Kato Y, Saga Y. Antagonism between DDX6 and PI3K-AKT signaling is an oocyte-intrinsic mechanism controlling primordial follicle growth. **Biology of Reproduction** in press (2023)
2. *Kato Y, (5 authors), *Saga Y. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. **EMBO Reports**, 20:e48251, (2019)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 2 件) : 加藤譲 : 原始卵胞の形成と維持に関わる RNA 制御機構、遺伝研研究集会「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」、三島 (2019)、招待講演

ホームページ : 遺伝研 HP https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/10/research-highlights_ja/rh20191031.html

○公募研究 : 金井克晃○

雑誌論文 (査読あり、抜粋 2 件ほか原著論文 10 件) :

1. Uchida A, (12 authors), *Kanai Y. SOX17-positive rete testis epithelium is required for Sertoli valve formation and normal spermiogenesis in the male mouse. **Nat Commun**. 13(1):7860.(2022)
2. Imura-Kishi K, (8 authors), *Kanai Y. Low retinoic acid levels mediate regionalization of Sertoli Valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules. **Sci Rep**.11(1): 1110.(2021)

学会発表 (抜粋 1 件、ほか 25 件) : Uchida A and Kanai Y: Non-Cell Autonomous Regionalization of Sertoli Valve Niche in the Terminal Segment of the Seminiferous Tubules of Mouse Testes. "Germinal Stem Cell Biology" Gordon Research Conference, Hong Kong (2019)

書籍 (抜粋 1 件、ほか 4 件) : 金井克晃 : 繁殖生物学 [改訂版] 日本繁殖生物学会編 interzoo (2020)

○公募研究：小林一也○

雑誌論文（査読あり）：Sekii K, (7 authors), *Shigenobu S, *Kobayashi K. Transcriptomic analysis reveals differences in the regulation of amino acid metabolism in asexual and sexual planarians. *Sci Rep* 9:6132. (2019)

書籍：Sekii K, Kobayashi K. : Sex-inducing substances terminate dormancy in planarian postembryonic reproductive development, In: Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology, Volume 1: *Phyla Other Than Arthropoda*, Apple Academic Press, p25-61. (2020)

○公募研究：林陽平○

雑誌論文（査読あり、抜粋 1 件ほか 2 件）：Hayashi Y, (8 authors), *Matsui Y. Proteomic and metabolomic analyses uncover sex-specific regulatory pathways in mouse fetal germline differentiation. *Biol Reprod*. 103: 717-735. (2020)

学会発表（抜粋 1 件、ほか 4 件）：Hayashi Y: Regulation of metabolic signaling in mouse primordial germ cell development, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Metabolic Signaling (2019)

○公募研究：丹羽隆介○

雑誌論文（査読あり、抜粋 2 件ほか原著論文 3 件、英語総説 1 件）：

1. Kurogi Y, (9 authors), *Niwa R. Female reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster* is regulated by DH31-producing neurons projecting into the *corpus allatum*. *Development in press* (2023)

2. Hoshino R, (3 authors), *Niwa R. Circulating fructose regulates a germline stem cell increase via gustatory receptor-mediated gut hormone secretion in mated *Drosophila*. *Sci Adv* 9:eadd5551 (2023)

学会発表（抜粋 1 件、ほか 29 件）：Niwa R. Neuroendocrine control of female germline stem cell increase in *Drosophila melanogaster*. Brain-body interactions virtual seminar series, (2021)（国際学会招待講演）

一般向けのアウトリーチ活動：丹羽 隆介:土浦日本大学中等教育学校 出前授業/研究室見学 2019.9.17、9.26.

○公募研究：高瀬比菜子○

学会発表：Takase HM. Wnt signaling-mediated differentiation of pre-granulosa cell is critical for primordial follicle activation. The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2019).

一般向けのアウトリーチ活動：高瀬比菜子：BDR Times |いきもんタイムズ 2020 年 5 月

○公募研究：重信秀治○

雑誌論文（査読あり）：Sekii K, (7 authors), *Shigenobu S, *Kobayashi K. Transcriptomic analysis reveals differences in the regulation of amino acid metabolism in asexual and sexual planarians. *Sci. Rep.* 9 :6132. (2019)

学会発表（抜粋 1 件、ほか 1 件）：Shigenobu S: Genomic Revelations of a Mutualism: Aphids and the Endosymbiont. The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium (2019)

○公募研究：水野 聖哉○ ホームページ：<https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

○公募研究：石川 香○

雑誌論文（査読あり）：

1. *Ishikawa K, (5 authors), *Nakada K. Pearson syndrome-like anemia induced by accumulation of mutant mtDNA and anemia with imbalanced white blood cell lineages induced by Drp1 deletion in a murine model. *Pharmacol Res.* 185, 106467, (2022)

2. Tani H, Ishikawa K, (8 authors), *Nakada K. Aberrant RNA processing contributes to the pathogenesis of mitochondrial diseases in trans-mitochondrial mouse model carrying mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) with a pathogenic A2748G mutation. *Nucleic Acids Res.* 9, 9382-9396, (2022)

学会発表（抜粋 1 件、ほか 1 件）：Kaori Ishikawa, Diversification of mitochondrial disease pathologies through nuclear-mitochondrial crosstalk. *The 45th MBSJ* Nov 30-Dec 22022/11/30-12/2. Chiba

○公募研究：嶋 雄一○ ホームページ：<https://www.med.kurume-u.ac.jp/med/anat2/message.html>

○公募研究：河野 望○

雑誌論文（査読あり、抜粋 2 件、ほか 10 件）：

1. Shimanaka Y, (6 authors), *Kono N: Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry enables simultaneous measurement of all phosphoinositide regioisomers. *Commun Chem* 5:61, (2022)

2. Iwata T, Ishino Y, Aoki J, *Kono N: Advances in phosphoinositide profiling by mass spectrometry. *Med Mass Spectrom* 6:93-100, (2022)

○公募研究：鈴木 淳○

雑誌論文（査読あり、抜粋 1 件、ほか 1 件）：Maruoka M, (6 authors), *Suzuki J. Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Mol Cell* 81:1397-1410, (2021)

一般向けのアウトリーチ活動：鈴木 淳：尼崎北高等学校 100 周年記念事業 基調講演 2021 年 10 月 2 日

○公募研究：浄住 大慈○

雑誌論文（査読あり、抜粋 1 件、ほか 1 件）：Kiyozumi D. The molecular mechanisms of mammalian sperm maturation regulated by NELL2-ROS1 lumicrine signaling. *J Biochem.* 172:341-346, (2022)

○公募研究：前澤 創○

雑誌論文（査読あり、抜粋 2 件、ほか 10 件）：Tatara M, Ikeda T, Namekawa SH, *Maezawa S: ATAC-Seq Analysis of Accessible Chromatin: From Experimental Steps to Data Analysis. *Methods Mol Biol* 2577:65-81, (2023)

学会発表（抜粋 1 件、ほか 2 件）：前澤創 生命の連続性を担う生殖細胞のエピゲノム形成機構,第 114 回日本繁殖生物学会大会, 京都, 2021 年 9 月 21-24 日

8 研究組織の連携体制

研究領域全体を通じ、本研究領域内の研究項目間、計画研究及び公募研究間の連携体制について、図表などを用いて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

本新学術領域研究では、3つの研究項目（A01、A02、A03）を設定し、9名の計画研究代表者、5名の研究分担者、25名の公募研究代表者で構成されている。研究者間の連携体制を下表にまとめる。

| 研究領域の連携体制 | | 技術・情報・材料の提供 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------|-------------|------|-----|-----|-----|------|-----|----|----|-----|------|----|------|----|----|------|----|----|----|-----|------|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|--|--|
| | | A01 | | | | | | | | | | A02 | | | | | A03 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 計画研究 | | | | | 公募研究 | | | | | 計画研究 | | 公募研究 | | | 計画研究 | | | | | 公募研究 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 技術・情報・材料の取得 | A01 | 計画研究 | 林克 | 小川 | 尾畑 | 小林俊 | 平尾 | 吉崎 | 木村 | 鈴木 | 原 | 諸白 | 齊藤 | 北島 | 八幡 | 阿部 | 松本 | 大川 | 塚本 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | |
| | | 分担 | 林克 | 小川 | 尾畑 | 小林俊 | 平尾 | 吉崎 | 木村 | 鈴木 | 原 | 諸白 | 齊藤 | 北島 | 八幡 | 阿部 | 松本 | 大川 | 塚本 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | |
| | | 公募研究 | 林克 | 小川 | 尾畑 | 小林俊 | 平尾 | 吉崎 | 木村 | 鈴木 | 原 | 諸白 | 齊藤 | 北島 | 八幡 | 阿部 | 松本 | 大川 | 塚本 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | |
| | | A02 | 計画研究 | 北島 | 八幡 | 阿部 | 松本 | 大川 | 塚本 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | |
| | | | 公募研究 | 北島 | 八幡 | 阿部 | 松本 | 大川 | 塚本 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | |
| | | | 計画研究 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 公募研究 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 計画研究 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | A03 | 計画研究 | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 分担 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 公募研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 計画研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 公募研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 計画研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 公募研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 計画研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 公募研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 計画研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 公募研究 | | 吉田 | 小林悟 | 栗本 | 中村 | 小林一 | 丹羽 | 金井 | 林陽 | 加藤 | 重信 | 高瀬 | 石川 | 水野 | 河野 | 鈴木 | 淨住 | 前澤 | 嶋 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

技術 特殊な培養技術、ライブイメージング、CRIF解析、マイクロデバイスなどの独自の高い技術の供与
 情報 未発表の研究成果などの情報の供与
 材料 解析に用いる細胞や生物の系統等の材料の供与

本領域研究における連携の基盤はA01をハブとしてA02との技術開発、A03との情報交換、材料提供にある。A01では、研究者間での培養条件や培養デバイスなどの情報の共有を行うとともに、A02に材料および情報を提供する。A02では、独自の技術開発を行うとともに、A01およびA03の研究材料の測定・解析を行う。A03では、独自の研究で得られた情報や技術に関連するA01の研究班に提供するとともに、A02とも連携して生殖細胞の発生過程を新たな視点から解析する。第二期の公募班との共同研究はCovid19の影響を受けて、当初の予定より進まなかったことが反省点として挙げられる。

●これまでの連携により、得られている特筆すべき成果。

1. 林班(A01 計画)-北島班(A02 計画)：染色体の不安定性の解析の情報をもとに性染色体の改変と卵母細胞の分化誘導を行った (*Nature* 2023)。
2. 小林俊班(A01 計画)-栗本班(A03 計画)：ラット 始原生殖細胞の単一細胞遺伝子発現解析 (*Development*, 2020) およびラット ES 細胞からの始原生殖細胞の分化誘導系を確立した (*Science* 2022)。
3. 吉田班(A03 計画)-小川班(A01 計画)：*in vitro* gametogenesis を利用して様々な温度で精子形成を試し、温度依存性の精子形成障害の詳細を明らかにした (*Communications Biology* 2022)。
4. 林班(A01 計画)-北島班(A02 計画)：新たに開発された方法で作製した *in vitro* 卵をイメージングし、染色体の異常分配の実態を明らかにした (*Nature* 2021)。
5. 吉田班(A03 計画)-金井班(A03 公募)-小林悟班(A03 計画)：精巣内ビーズ移植法の技術提供により FGF シグナルの精子幹細胞の動態解析に協力した (*Cell Stem Cell*, 2019)。
6. 小川班(A01 計画)-金井班(A03 公募)：ラットのセルトリ細胞を Amh-Treck システムでセルトリ細胞を除去したマウス精巣に移植して、それらが機能的であることを証明した (*Biol. Reprod.* 2021)
7. 小林一班(A03 公募) -重信班(A03 公募)：プラナリア の RNA-seq 及びゲノム解読を共同で推進した。 (*Sci. Rep.* 2019)
8. 尾畑班(A01 計画)-八幡班(A02 計画)：*in vitro* 由来卵子を CRIF 法で解析して発生能と相関するパターンを発見した (論文作成中)。

9 研究費の使用状況

研究領域全体を通じ、研究費の使用状況や効果的使用の工夫、設備等（本研究領域内で共用する設備・装置の購入・開発・運用、実験資料・資材の提供など）の活用状況について、総括班研究課題の活動状況と併せて具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。また、領域設定期間最終年度の繰越しが承認された計画研究（総括班・国際活動支援班を含む。）がある場合は、その内容を記述すること。

総括班による研究支援活動— 本研究領域では総括班内に研究支援班を設置して、データサーバの共有と培養用マイクロデバイスの供給を行った。データサーバは栗本班により奈良県立医科大学内に設置され、すべての研究班の研究代表者にライセンスを配布した。研究者は一定の条件下でデータの閲覧が可能であり、新規性の高いデータを得ることができた。領域設定期間中のサーバーのハードディスク(60TB)の使用状況の推移は2019年度29%→2020年度51%→2021年度92%→2022年度62%となり、継続的に高い使用率となった。共用のサーバーを置いて領域内での実験の重複を防ぐことにより、研究費の効果的な使用に貢献した。培養用マイクロデバイスの開発は、各研究班の発案に応じて木村が打ち合わせを行い、各研究に適したデザインのマイクロデバイスを供給した。木村班は各研究班と継続的かつ双方向的な情報交換を重ねてマイクロデバイスの最適化を行った。領域機器や消耗品の購入を一元的に行うことにより安定かつ効率的な実験の遂行に貢献した。領域設定期間中において木村は計画班および公募班と述べ18件の共同研究を展開して、現在も継続中である。

このほか総括班ではシーケンス支援を設置しており、各研究班の進行状況に応じて研究費の柔軟かつ効果的な利用に努めた。特に小林俊班については、研究の進展が著しく多くのシーケンス解析を必要としたこと、計画研究班として配分されている研究費が比較的少額であったこと、栗本班とのシーケンス解析を行っていたことから、シーケンス支援を積極的に行った。その結果、小林俊班と栗本班は極めて優れた研究成果を挙げた(*Science* 2022; *Development* 2020)。

領域設定期間内における主な設備等の変更— 上記の総括班による研究支援活動に加えて、領域設定期間内の研究費の使用は概ね計画通りに進んだが、いくつかの変更があった。A02のCRIF解析については、当初の計画では筑波大学に設置された共焦点顕微鏡を各研究班が使用する予定であったが、輸送負荷による卵子発生能の低下など、研究の進行を著しく妨げる問題が生じた。そのため、研究費の前倒し申請により、CRIF解析仕様の共焦点レーザー顕微鏡を購入して、東京農業大学内に設置した。尾畑班はこの顕微鏡を用いて卵子のCRIF解析を行い、その画像を研究領域のデータサーバを通じてリアルタイムに八幡班と共有した。八幡班はそれらを即座に画像解析・機械学習に供して結果を伝えることにより、尾畑班が卵子の選別を進めた。このようなワークフローはバーチャルなオープンラボの実践であり、遠隔地においても共同作業が可能であることを示した。特に実験上の都合または新型コロナウイルスの感染などにより物理的な移動や輸送に制約がある場合は、このような手法は有効であった。

このほかは、林克班が購入予定であったフローサイトメーターを共焦点顕微鏡に変更した。この変更は研究の展開により共焦点顕微鏡の必要性が増したことに加え、所属機関に共通機器として高性能のフローサイトメーターが導入されたための処置であった。研究機器の重複を防ぎ、研究の推進のために効果的に研究費の執行を行ったと考えている。

新型コロナウイルス感染拡大の影響への対応— 当研究領域は新型コロナウイルスの感染拡大に大きく影響された研究領域の一つとして挙げられる。領域研究の開始後、各班の研究の進展や共同研究の推進が見込まれる2年目から新型コロナウイルスが感染拡大して、物流の停止、研究室への入室制限、研究集会のオンライン化が相次いだ。総括班および各研究班についても研究の推進方法に変更を余儀なくされ、特に総括班活動で予定されていた集会活動（領域会議の開催や学会への派遣）や国際支援活動は著しく制限された。一方で、集会活動がオンライン化したことにより旅費等に計上されていた予算を有効に活用するために、若手研究者の育成を目指したin-house grantを設置した。すなわち若手研究者が独自に発案した研究に対して、総括班の若手支援の理念のもとに研究費を支給するものである。若手研究者は研究計画書を作成して、それらを計画研究代表者が審査した。合計3件の研究提案に対して、所属する総括班に研究費を支給した。これらにより若手研究者が研究発案、申請書の作成、研究の実行などの経験値を獲得するに至った。国際支援班の活動も同様に多くの制限を受けたが、オンラインによる議論を活発に行ったほか、旅費として計上されていた予算を物品輸送などの費用に充てて、研究の遅延を防いだ。これらの努力により新型コロナウイルス感染拡大の影響を最小限にとどめようと尽力したが、総括班活動

として第二期の公募班との共同研究を円滑に進められなかったことは悔やまれる。第二期の公募班が領域研究に参加してから、対面で議論ができるまでに 2 年を要したため、その空白は簡単には埋めることは困難であった。今回の領域研究を端緒として、各研究班が独自に共同研究等を開始することが期待される。

国際シンポジウムの開催-最終年(令和 4 年度)に国際シンポジウムを行った。このシンポジウムは類似の研究領域である佐々木裕之(九州大学)特別推進研究「多階層オミックスによる卵子の発生能制御分子ネットワークの解明」および小倉淳郎(理化学研究所)新学術領域「全能性プログラム:デコーディングからデザインへ」との共催とした。新型コロナウイルス感染対策として(特に中国は当初厳しい行動規制を行っていた)シンポジウムはハイブリッド開催とした。共催としたことにより、各研究班の負担を軽減しながらも多くの招待講演者と聴衆(対面参加:国外 12 名 [6 カ国]、国内 165 名、オンライン参加:国外 106 名 [22 カ国]、国内 131 名)に参加頂いた。シンポジウムではポスターセッションを設けて、海外の招待講演者と領域内の若手研究者が活発な議論を行った。シンポジウムは海外の招待講演者や参加者からも好評であり、情報および人的ネットワークの形成に貢献した。

10 当該学問分野及び関連学問分野への貢献の状況

研究領域全体を通じ、本研究領域の成果が当該学問分野や関連学問分野に与えたインパクトや波及効果などについて、「革新的・創造的な学術研究の発展」の観点から、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、応募時に「①既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成を目指すもの」、「②当該領域の各分野発展・飛躍的な展開を目指すもの」のどちらを選択したか、また、どの程度達成できたかを明確にすること。

本研究領域は「②当該領域の格段の発展・飛躍的な展開を目指すもの」として提案した。対象となる当該領域は生殖細胞を対象とした学術研究と生殖工学技術の開発である。

本研究領域は「in vitro gametogenesis を通常の細胞培養として普及するレベルにまで引き上げ、学術研究の推進や生殖工学技術の開発に資する技術として確立する」ことを目的に形成された。またそれを達成するための手段として、配偶子の発生能を予見する技術の開発や生体内の配偶子産生システムの理解を組み込んだ。領域研究設定期間内に本研究領域は①マウス多能性幹細胞のみを用いた卵子形成システムの再構築、②マウス・ラットの器官培養に適した化学合成培地の開発と配偶子形成に重要な因子の決定、③ラット、ウサギ、コモンマーモセット、ミナミ/キタシロサイのES細胞からの始原生殖細胞の誘導、を達成した。これらの成果は、領域研究が始まる前の in vitro gametogenesis の最前線が「マウス ES/iPS 細胞由来の始原生殖細胞と胎仔卵巣の体細胞との再凝集による卵子の作製」であったことを考慮すると、領域研究の設定期間中に、培養系の構築や他の動物への適用に関して格段の発展に値する成果を得られたと考えられる。これらの成果が当該領域に与えたインパクトは大きく、いずれもトップジャーナルやその姉妹誌に掲載されたばかりでなく、一般のメディアにも掲載された。PubMed 上での“in vitro gametogenesis”での検索ヒット数は領域が始まる 2018 年から急激に増加しており、本領域がこの学術領域を牽引していることがうかがわれる。近年の実験動物の使用規制の強化やヒトオルガノイド研究に代表されるような生体の代替研究の隆盛も追い風となり、生殖細胞研究における in vitro gametogenesis は存在感を高めており、実際に生殖細胞研究に関わる学術集会では研究手法として in vitro gametogenesis を取り入れている演題が多く認められる。また in vitro gametogenesis の一般社会への浸透も議論され始めており、領域代表者は米国科学アカデミーや英国王立学会が主催する会議に招待されて、in vitro gametogenesis の最前線について紹介する機会を得ている。

このように急速に世界に浸透し始めている in vitro gametogenesis を日本から発信できたことは、当該領域における日本の学術研究のアドバンテージを確保する上で極めて有意義であったと思われ、本領域研究の大きな波及効果と言える。

本研究領域では in vitro gametogenesis を用いて配偶子の発生能を予見する技術の開発を行った。実際に CRIF 解析で卵子の受性能と相関する青色~緑色の自家蛍光を再現よく認めた。領域設定期間中には、この自家蛍光の責任因子の同定までは至らなかったものの、非侵襲的な卵の性質の予測という新しい技術の先鞭をつけた。今後、計測機器の発展や微量サンプルの検出技術の向上に伴い、本法のようなアプローチが受精能を規定する分子メカニズムの解明に貢献するほか、卵の非侵襲的な診断に使われる可能性もある。本研究領域のイメージング技術の開発によって染色体分配のメカニズムとその責任分子が明らかになってきた。特筆すべきことは、これらの技術と知見の蓄積により、加齢卵において染色体分配に異常をきたすメカニズムについての解析が可能となってきている点である。これらは社会的にも注目度の高い生殖細胞の老化について定量的にアプローチする手段を提示している。今後の研究の進展により、加齢に伴う不妊の原因や治療法の開発に貢献することが期待される。

最後に本研究領域では生体内の生殖細胞の発生について様々な視点から解析された。そのうち生殖細胞のレパトリーの変遷を明らかにしたことは特筆に値する。この変遷に関する生物学的な意義を見出すには更なる研究が必要であるが、これまでに生殖細胞レパトリーの変動についての大規模な解析例はなく、この成果は生殖細胞研究に飛躍的な展開をもたらすものと期待される。また今回ハエで認められたような生殖幹細胞の選択と内分泌・代謝による制御は、生殖細胞レパトリーの変動に影響を及ぼす因子として考慮すべきであり、期待通り先見的な成果が得られたと思われる。このようなレパトリーの変動や今回の領域研究で明らかになった生体での生殖細胞の動態は、今後の生殖細胞研究の発展に貢献するばかりでなく、in vitro gametogenesis に新しい評価基準を加えた点にも意義がある。

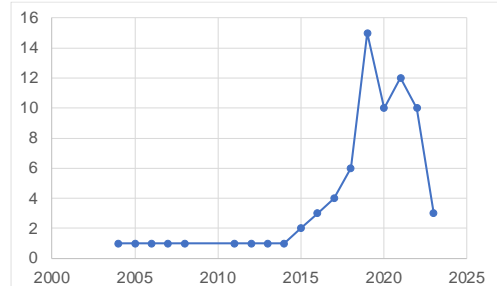


図: 過去 20 年(横軸)の“in vitro gametogenesis”の検索ヒット数(縦軸)の推移

11 若手研究者の育成に関する取組実績

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究遂行に携わった若手研究者（令和5年3月末現在で39歳以下。研究協力者やポスドク、途中で追加・削除した者を含む。）の育成に係る取組の実績について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

本研究領域では、若手研究者育成に関して以下の取組を行っている。

若手研究集会の開催

年に2回の領域会議のうち1回を若手自身が企画・進行を行う若手研究集会とした。この研究集会では、計画研究班と公募研究班に属する若手研究者（大学院生、ポスドク、若手スタッフ等）が自身の研究を発表した。第1回目の若手研究集会では、研究発表のほか、研究代表者が自身のキャリアパスにおける失敗談などを紹介する座談会を行った。その後、新型コロナウイルス感染拡大の影響を受けて、多少の予定変更があったが領域設定期間内に3回の若手研究集会を開催した。これに加えて、最終年の国際シンポジウムでは大学院生およびポスドクが口頭発表する若手発表枠を設けた。若手研究集会を通して、様々な情報交換が喚起されて、若手研究者のネットワーキングが涵養された。

若手研究者の国内外の研究集会への参加支援

研究推進のための情報収集、共同研究の遂行、または研究成果の発表のために、若手研究者を海外研究機関や海外研究集会へ積極的に派遣した。各研究班に加え、総括班はこれらの若手研究者の渡航を支援した。新型コロナウイルス感染拡大の影響により約3年間はこの活動に支障を生じたが、その間もオンラインの海外研究集会への参加を支援した。領域設定期間内中にこれまでに17件18名の派遣を行った。また国内学会への参加も奨励し、領域設定期間内に25名の若手研究者が優秀発表賞（日本分子生物学会、繁殖生物学会、畜産学会、日本家禽学会、細胞分裂研究会等）を受賞した。

若手研究者への研究支援

各研究班の研究の推進にあたり若手研究者への研究指導はもとより、培養技術や測定技術の習得のために若手研究者を積極的に他の研究班に派遣した。これらのほか、若手研究者が学術振興会特別研究員制度（DC、PD、RPD、海外特別研究員）や研究助成制度に申請する際の支援を積極的に行った。領域設定期間内中に学術振興会DC14件、PD5件、RPD2件、海外特別研究員2件、若手研究者が代表となった研究助成18件（JST さきがけ、創発研究、次世代研究者挑戦的研究プログラムを含む）が採択された。

若手研究基金の創設

新型コロナウイルス感染拡大の影響により国内外の学会参加が制限されたため、当初旅費等に計上されていた予算を若手研究基金として、若手の育成に充てた。若手が独自の発想に基づく研究提案を募集して、応募課題に対して計画班代表者が審査して支給を決定した。領域設定期間内中に3件の採択があり合計380万円が充てられた。

若手研究者のポジションの確保

本領域研究では研究経費での若手人材の確保（領域設定内延べ人数：ポスドク34名、リサーチアソシエイト39名）とともに若手研究者のアカデミックポストへの就職を積極的に斡旋して、領域設定期間中に以下の20件のポストを得るに至った。

12 総括班評価者による評価

研究領域全体を通じ、総括班評価者による評価体制（総括班評価者の氏名や所属等）や本研究領域に対する評価コメントについて、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

後藤由季子（東京大学大学院薬学系研究科・教授）

A01, A02, A03 とともに分野を世界的にリードする顕著な業績を挙げており、十分に当初の目標を達成した。特筆すべきは、領域内の緊密で効果的な共同研究が行われた点である。染色体の不安定性の解析の情報をもとに性染色体の改変と卵母細胞の分化誘導を行った、ラット ES 細胞からの始原生殖細胞の分化誘導系を確立した、新たに開発された方法で作製した *in vitro* 卵をイメージングし、染色体の異常分配の実態を明らかにした、精巣内ビーズ移植法の技術提供により FGF シグナルの精子幹細胞の動態解析に協力した、などの目覚ましい業績を領域内共同研究から生み出した点は高く評価される。

斎藤通紀（京都大学大学院医学研究科・教授）

本新学術領域研究は、高い発生能を有する配偶子の形成機構を理解し、それを予見・再構成、配偶子形成過程を体外培養で再現する *in vitro* gametogenesis を革新的技術として確立することを目的とした。

領域代表者である林克彦博士の強力なリーダーシップのもと、中間報告の段階で大きな成果をあげ、その後も領域の研究がさらに発展した。中間報告以降の顕著な成果として、マウス多能性幹細胞からの胎仔卵巣体細胞様細胞の誘導、マウスオス個体に由来する細胞からの機能的な卵子の誘導、コモンマーマセット・キタシロサイ（林克班）・ラット・ウサギ（小林俊班）多能性幹細胞からの始原生殖細胞様細胞の誘導、化学合成培地によるマウス・ラット精巣器官培養系の開発（小川班）、マウス卵胞培養法の改善（尾畑班）、卵母細胞の受精能予測法の開発（八幡班）、卵子染色体分配機構の解明（北島班）、マウス精子幹細胞の動態の解明とその制御（吉田班）、ショウジョウバエ生殖系列のゲノムインテグリティ機構の解明（小林悟班）、凍結切片からの定量的な RNA-seq 法の開発（栗本班）、微量細胞エピゲノム解析法の開発（大川班）、を含む成果を挙げ、また、若手研究者の育成、公募研究の採択と連携も適切に遂行された。本領域発足当初の目的を十分に達成し（一部、それを上回る成果を挙げている）、本領域のさらなる発展の堅固な礎を形成したと評価出来る。

丹羽仁史（熊本大学発生医学研究所・教授）

本新学術領域研究は、コロナ禍の制約の中、決して従来の新学術領域研究のような緊密な連携による共同研究の推進を実施できる状況にはなかった。しかしながら、その様な制約の中で、最大限の努力により研究者の交流と研究ネットワーク構築に尽力されたことに、領域代表者には敬意を表したい。とりわけ、対面で開催された最終報告会では、多数の大学院生を含む若手研究者たちが出席し、活発な議論を交わっていたことに感銘を受けた。この元気があれば、まだまだ日本のサイエンスも未来があると思わせていただけた場面であった。今後も本研究班で構築された研究者ネットワークが日本のお家芸ともいえる生殖細胞研究をリードしていくことに期待したい。

諸橋憲一郎（九州大学大学院医学研究院・教授）

生殖生物学は、我が国が最も力を発揮・蓄積してきた研究分野であり、吉田、小林と続き、今回、林が代表として率いてきた領域研究が果たした役割は大きい。特に今回の領域の成果は秀逸で、この一連の領域研究が目指してきた *in vitro* gametogenesis は、本領域研究による卵子の *in vitro* 産生という画期的な成果によって達成された。In vitro の精子形成と合わせて、これらの業績は生殖生物学に大きな足跡を残すとともに、今後の研究の一つの評価基準を提供することとなった。本領域が推進された期間にはコロナ感染症の世界的拡大という未曾有の事態が発生し、領域研究の推進に甚大な影響を与えたことと思われるが、その様な中であって若手支援や国際活動には工夫を凝らし、目標の達成に向け種々の活動をおこなってきたことも高く評価したい。以上の観点から、本新学術領域研究は当初の目的を十分に達成したと評価するとともに、今後の生殖生物学の発展にさらなる貢献を期待する。

吉村崇（名古屋大学大学院生命農学研究科・教授）

本領域研究では、生体内の配偶子産生システムの理解のもと、高い配偶子インテグリティを担保する *in vitro gametogenesis* を革新的技術として確立することを目的として研究が展開された。中間評価において、マウス以外の種差に関する検証と、有機的な研究連携が留意事項としてあげられていたが、しっかり対応が行われ、A01 インテグリティの再構築、A02 インテグリティの予見、A03 インテグリティの理解、のいずれにおいても、卓越した研究成果が発表されている。我が国は生殖細胞の基礎研究と発生工学の分野で長年世界を牽引してきたが、本領域は *in vitro gametogenesis* を日本から世界に発信することに成功した。これによって我が国のレジリエンスがさらに向上し、当該分野が大きく発展した。新型コロナウイルス感染拡大の影響があったものの、若手研究者の育成にも貢献しており、当該分野の今後の発展も期待できる。