

領域略称名：配偶子産生制御

領域番号：3504

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

「動物における配偶子産生システムの制御」

平成25年度～平成29年度

平成27年6月

領域代表者 筑波大学・生命領域学際研究センター・教授・小林 悟

# 目 次

## 研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要	4
2. 研究の進展状況	6
3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況	10
4. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	12
5. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	15
6. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	22
7. 若手研究者の育成に関する取組状況	24
8. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	25
9. 総括班評価者による評価	26
10. 今後の研究領域の推進方策	28

## 研究組織

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関 部局 職	構成員数
X00	25114001 動物における配偶子産生システムの制御	平成25年度～ 平成29年度	小林 悟	筑波大学・生命領域学際研究センター・教授	8
A01 計	25114002 ショウジョウバエPGCの形成を制御する遺伝子ネットワークの解明	平成25年度～ 平成29年度	小林 悟	筑波大学・生命領域学際研究センター・教授	7
A01 計	25114003 マウスPGCの形成を制御する分子ネットワークの解明	平成25年度～ 平成29年度	松居靖久	東北大学・加齢医学研究所・教授	7
A01 計	25114004 マウス配偶子産生におけるGSCの制御機構の解明	平成25年度～ 平成29年度	吉田松生	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授	4
A01 計	25114005 サケ科魚類の進化に伴うGSC制御機構の変化	平成25年度～ 平成29年度	吉崎 悟朗	東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授	1
A02 計	25114006 in vitro におけるPGC産生および分化のための新規培養系開発	平成25年度～ 平成29年度	林 克彦	九州大学・医学研究院・教授	1
A02 計	25114007 in vitro において継続的に精子を産生する新規培養系の開発	平成25年度～ 平成29年度	小川毅彦	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授	3
A02 計	25114008 in vitro において卵を産生する新規技術の開発	平成25年度～ 平成29年度	尾畑やよい	東京農業大学・応用生物化学部・准教授	2
計画研究 計8件					
A01 公	26114501 FGF-Wntシグナル経路を介したプラナリア有性化による配偶子産生制御機構の解明	平成26年度～ 平成27年度	小林一也	弘前大学・農学生命科学部・准教授	4
A01 公	26114502 生殖細胞の増殖制御に関与するWnt-Piw1シグナル系の解明	平成26年度～ 平成27年度	山元大輔	東北大学・生命科学研究科・教授	2
A01 公	26114504 哺乳類の進化的に保存された精原幹細胞ニッチの分子基盤の解明	平成26年度～ 平成27年度	金井克晃	東京大学大学院・農学生命科学研究科・准教授	1
A01 公	26114505 哺乳類生殖細胞におけるRNP顆粒の形成機構と機能	平成26年度～ 平成27年度	鈴木 敦	横浜国立大学・工学研究院・准教授	1
A01 公	26114506 体外精子形成を目指した生殖細胞間架橋関連因子の同定および細胞連結増殖への影響解析	平成26年度～ 平成27年度	岩森督子	九州大学・医学研究院・助教	1

A01 公	26114508 ショウジョウバエ生殖細胞の形成・分化を制御する新規因子の探索と分子機能解析	平成26年度～ 平成27年度	中村 輝	熊本大学・発生医学研究所・教授	2
A01 公	26114509 ミツバチの生殖機能制御機構の解析	平成26年度～ 平成27年度	鎌倉昌樹	富山県立大学・工学部／講師	1
A01 公	26114512 RNA制御による原始卵胞維持機構の解明	平成26年度～ 平成27年度	加藤 譲	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教	1
A01 公	26114513 カタユレイボヤPGC形成に関わる遺伝子発現制御機構の解析	平成26年度～ 平成27年度	倉林麻貴 (白江麻貴)	名古屋大学・大学院理学研究科附属臨海実験所・特任助教	1
A02 公	26114510 ヒト卵子再生と卵胞完全体外培養による新たな不妊治療法の開発	平成26年度～ 平成27年度	河村和弘	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授	1
公募研究 計 10 件					

# 研究領域全体に係る事項

## 1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、応募時までの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

### 【研究の背景と目的】

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

### 研究項目 A01: 配偶子産生システムの制御機構を知る

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

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

一方、マウスにおいて松居は、胚細胞由来のES細胞株や自身が樹立したEG細胞株などの多能性細胞からPGCが形成される機構を精力的に解析してきた。最近、松居は、多能性細胞からのPGC形成を負に制御するMax遺伝子（ヒストンメチル化修飾制御因子）を見出した。これは、多能性細胞からPGC形成を細胞自律的に制御する遺伝子として初めての例である。逆にPGCから多能性細胞への転換を正に制御するAkt（シグナル伝達因子）や負に制御するDnd1（RNA代謝制御因子）も見出した。そこで、松居は、② PGCと多能性幹細胞との違いを生み出している遺伝子ネットワークをMaxやAktなどの機能を中心に解明する。さらに、小林、松居が中心となり、③ Ovo、MaxやAktの機能、さらに、それらの下流遺伝子の機能を動物種間で比較することにより、PGC形成を制御する共通遺伝子ネットワークを明らかにする。

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

ことから、ニッチの役割はGSC自律的な機構に作用して、GSCの数を適正に保つことと考えられる。そこで、⑤ 上記の遺伝子ネットワークに対するニッチシグナル (FGF5 等) の制御を明らかにする。

GSCの自己複製と分化を制御すれば、配偶子産生の量と期間を調節できる。この柔軟性は動物の配偶子生産にとって重要な特性である。サケ科魚類には、生涯に一回のみ配偶子を産生し死を迎える種(サケ型:ヤマメなど)と複数年にわたり配偶子産生を繰り返す種(マス型:ニジマスなど)がある。吉崎は、サケ科魚類でGSCを移植する実験系を独自に確立し、魚類で初めてGSCの存在を機能的に証明した。興味深いことに、マス型魚種ではGSCは配偶子へと分化すると同時に翌年の繁殖期に向けてGSCを維持する一方、サケ型魚種ではGSCは自己複製することなく分化することを発見した。さらに、ニジマス(マス型)のGSCをヤマメ(サケ型)宿主へ異種間移植したところ、本来は配偶子産生の後に死亡する宿主個体が生残り、翌年も配偶子産生を継続した。これは、サケ型の環境下であってもマス型GSCが自律的に自己複製と分化のバランスをとることを意味している。そこで、吉田のマウスGSC維持に関わる遺伝子やシグナル分子の情報を参考に、⑥ この細胞自律的なGSC制御に関わる遺伝子群を明らかにし、その機構の種間の違い(進化的な変化)を解明する。また、上記の結果が示唆する⑦ 「GSCの性質が宿主の寿命を支配する」という、まったく新しい概念の検討を行う。

### 研究項目 A02 「in vitro で配偶子産生を再現する」

**PGCの形成を再現する** 林は、in vitroにおいてマウスの雄あるいは雌由来の多能性細胞からPGC様細胞を作出することに成功した。この培養技術により、これまで胚あたり数十個しか存在しない発生初期のPGCを数十万個オーダーで容易に取得できるようになった。この革新的な技術を活かし、⑧ 小林や松居が明らかにする遺伝子の機能を生化学的あるいはゲノムワイドに解析する。一方で、PGC様細胞は、移植された生体の精巣あるいは卵巣内で精子や卵に分化するが、体内の環境以外ではPGC様細胞をGSC(雄)や卵母細胞(雌)に分化させることは実現していない。そこで、性差を生み出す生殖巣との共培養や、小林のショウジョウバエにおける性決定ネットワークの成果を基に、⑨ 性差を有するPGCの形成を再現できる培養系の構築を目指す。

**配偶子の産生を再現する** 小川は、GSCのみを含むマウス幼若精巣の組織片を培養し、精子に分化させることに世界に先駆け成功した。しかし、この培養系では、GSCを維持できず長期にわたり精子産生を継続できない。そこで、小川は、精子産生を継続する液性因子の探索や、吉田のGSC維持に関わる遺伝子やシグナル分子の情報を基に、⑩ GSCからの精子産生を長期間維持できる培養系を構築する。一方、尾畑は、未熟卵母細胞を含む胎仔卵巣をin vitro培養することにより、低効率ながら成熟核を有する卵母細胞を得ることに成功した。この核を除核した成熟卵へ移植することで移植核由来の子を得ることができる。しかし、核移植や生体移植を介さずにin vitroで胎仔由来の卵母細胞から卵を得ることは誰も成し得ていない。そこで、尾畑は、卵母細胞の成熟に関わる遺伝子の探索や、林の成果を基盤に、⑪ 卵母細胞の成熟を効率よく進める培養系の開発を行う。

**研究の展開** 多能性細胞から精子や卵の産生までの全過程をin vitroで再現することは、生殖細胞を扱う多くの研究者の積年の課題であった。林が多能性細胞からGSCや卵母細胞を、小川がGSCから精子を、尾畑が卵母細胞から卵を作ることにより、多能性細胞から精子や卵に至る全てのプロセスをin vitroで行う培養系の開発を目指す。このin vitro培養系は、A01における配偶子産生制御機構の新たな研究の展開を押し進めるための革新的な技術基盤となるとともに、⑫ ヒトや有用動物を含む多くの脊椎動物において多能性細胞から配偶子を産生できる新規培養系に発展し、畜産、水産や生殖医療等の応用面で革新的な技術となる。

### 【当該領域の発展と学術水準の向上を牽引する】

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

## 2. 研究の進展状況 [設定目的に照らし、研究項目又は計画研究ごとに整理する] (3ページ程度)

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在までにどこまで研究が進展しているのか記述してください。また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究ごとに記述してください。

本研究領域では、「研究領域の目的及び概要」に記した研究が順調に進展しているが、当初予想した以上のスピードで成果が得られた研究課題がある。この特筆すべき研究成果の一つは、研究項目A02の計画研究7においてPGCから成熟卵を産生するための新規*in vitro*系を構築し、世界で初めてマウスを誕生させることに成功したことである。これにより、生体内で進行するために容易に解析できなかった卵形成/卵成熟を制御するメカニズムの解明が加速されるとともに、応用面においても波及効果は計り知れない。実際に、計画研究7と計画研究5が連携し、この技術を応用することにより、*in vitro*においてマウスの多能性幹細胞(ES細胞)からPGCを経て、卵子を産生し、それに由来する受精卵からES細胞を樹立することに成功した。これは、世界に先駆け雌の生殖系列サイクルをすべて*in vitro*で再構築出来たことを意味する。

第2に、研究項目A01とA02との密な連携により、生殖細胞の形成に必須な*ovo*遺伝子の働きが、ショウジョウバエ(計画研究1)だけでなくマウス(計画研究5)においても明らかになったことである。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ことにより、胚や個体など*in vivo*で行われてきた研究に技術革新をもたらす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。この系を用いることにより、ショウジョウバエとマウスに共通する遺伝子機能の探索/解析を迅速かつ効率的に行うことが可能となり、生殖細胞形成の共通原理の解明が加速すると考えられる。

さらに、異分野間(生物学と物理学)の国際共同研究によって、マウスGSCの精巢内におけるダイナミクスを支配する原理が導かれたこと(計画研究3)は特筆に値する。この成果は、GSC維持の頑強性を保証する機構を初めて明らかにした点で大きな意義を持つと共に、GSC維持に関わる遺伝子ネットワークを解明する大きな基盤となる。

以下に、前項「研究領域の目的及び概要」中で番号を付した 2重下線 で示した主要研究に関して、進展状況を記す。

### 【研究項目 A01: 配偶子産生システムの制御機構を知る】

#### 《PGCの形成機構を知る》

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

成果①-1(小林 G)Ovoの機能阻害を行ったPGCをセルソーターで単離し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を正常のPGCと比較する解析を行った。その結果、正常発生過程においてPGCで高発現する遺伝子の7割程度がOvoにより活性化されること、逆にPGCにおいて発現が低下している遺伝子のうち同じく7割程度がOvoにより発現抑制されていることが明らかとなった。このことは、OvoがPGCの運命決定における遺伝子発現制御に中心的な役割を果たすことを強く示唆している(論文作成中)。

成果①-2(小林 G、向)Ovoと同様に生殖質中の母性因子として知られるMamoのZnフィンガードメインをもつ断片化タンパク質(MZD)を胚で強制発現すると、特定の体細胞中で生殖細胞特異的遺伝子である*vasa*の発現が誘導される。免疫沈降実験(ChIP)等により、*vasa*のイントロン中にMZD結合部位があること、その領域は*vasa*の発現に必要であること、Mamoがヒストンアセチル化(H3K27ac)を触媒する酵素と共同して*vasa*遺伝子の発現を活性化することが明らかになった。これらの結果は、Mamoがエピジェネティックな制御を介して*vasa*遺伝子の発現を活性化することを示唆する(向:論文未発表)。さらに、MZD強制発現により、遺伝子発現が増加する*vasa*以外の遺伝子も明らかになりつつある。

成果①-3(小林 G)カイク雌生殖細胞由来のBmN4細胞を生殖系列のモデル系として、*ovo*や*mamo*を含む生殖系列特異的遺伝子の活性化に関わる遺伝子を同定し、それら遺伝子のネットワークを解析している。

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

成果②-1(松居 G)Maxが多能性幹細胞でPGC特異的遺伝子の発現を抑制する分子機構を明らかにする

ために、ES 細胞で Max と相互作用する複数の分子をプロテオーム解析により同定した。また、Max が、マウス胚においても同様の働きをしているかを明らかにする目的で、Max をノックダウン/ノックアウトし胚盤胞まで発生させ、PGC 特異的遺伝子等の発現を定量 PCR により解析する系も立ち上げつつある。

**成果②-2(松居 G)** PGC 形成を制御するヒストン修飾関連因子の候補を、培養下で ES 細胞から PGC 様細胞を誘導する培養系を利用した RNAi スクリーニングにより同定した。

**成果②-3(松居 G)** 抑制的ヒストン修飾が Akt シグナルや Dnd1 の下流で、PGC が多能性幹細胞へ変化することを制御していることが示唆された。

**③ Ovo、Max や Akt の機能、さらに、それらの下流遺伝子の機能を動物種間で比較することにより、PGC 形成を制御する共通遺伝子ネットワークを明らかにする。**

**成果③-1(小林 G)** Ovo のマウスにおける発現および機能解析を、連携研究者の阿部 (論文作成中) および、計画研究 5 の研究代表者の林と連携して行っている。これまでの阿部との共同研究により、3 つのマウス ovo ホモログのうち、少なくとも 1 つ (ovo2) がマウス PGC で発現し、PGC の発生に必要であることが明らかとなっている (論文作成中)。

**成果③-2(松居 G)** マウスにおいて多能性幹細胞と PGC の違いを生み出す遺伝子 (ネットワーク) の普遍性を明らかにするため、下記の動物で比較解析を行った。ゼブラフィッシュでは、Max ノックダウンにより発生が停止するため解析が難しいことがわかったが、初期胚から多能性幹細胞を樹立することができ、Max の働きを調べる準備ができた。またプラナリアでも多能性幹細胞から PGC (生殖系列) が形成されるが、Max が生殖細胞特異的遺伝子の発現抑制に関与する可能性が示唆された。さらに、ニワトリの多能性幹細胞を含む胚盤葉において Max ノックダウンを行ったところ、マウスとは異なり Max は細胞非自律的な機構により生殖細胞遺伝子の発現抑制に関わっている可能性が示唆された。

## 《GSC の自己複製と配偶子産生の制御機構を知る》

**④ GSC の自己複製と分化を制御する細胞自律的な遺伝子ネットワークを明らかにする。**

**成果④-1(吉田 G)** 精巣内の精子幹細胞 (GFR  $\alpha$  1+細胞) の挙動を、生体内ライブイメージングとパルス標識によって詳細に解析し、数理解析により分析したところ、幹細胞の「不完全分裂」と「断片化」の頻度、および、「組織が許容する幹細胞の数 (= 密度)」というわずか 3 つのパラメータによって、幹細胞ダイナミクスが支配されていることを明らかにした (*Cell Stem Cell* 2014)。これは、海外 (英国) の物理学者との異分野間の国際共同研究である。

**成果④-2(吉田 G)** 幹細胞活性を持つ未分化型精原細胞は、GFR  $\alpha$  1+と Ngn3+の 2 群に分けられ、前者に比べて後者は分化へ方向づけられているが、これは可逆的である。しかし、レチノイン酸 (RA) の作用によって Kit+の分化型精原細胞になると、不可逆的に精子へと分化する。分担者の大保らは、エピジェネティックの状態の変化を解析した結果、GFR  $\alpha$  1+細胞と Ngn3+細胞の間ではゲノム修飾は大きな差を認めないが、Kit+細胞では大きく異なることを発見し、可逆性の喪失に伴うこの変化を epigenetic checkpoint と名付けた (*Development* 2013)。さらに吉田らは、Ngn3+細胞が RA 受容体を発現することで、RA に反応して分化する一方、GFR  $\alpha$  1+細胞は RA 受容体を発現しないために未分化状態を維持することを発見した。 (*Development* 2015)。以上の研究により、可逆的な状態ではエピジェネティック状態は類似しており、転写制御因子その他の因子の寄与が大きい一方、分化の不可逆点ではエピジェネティックな制御が重要な役割を果たす、という概念を提出した。

**成果④-3(吉田 G)** GFR  $\alpha$  1+細胞と Ngn3+細胞の 2 群の未分化型精原細胞のトランスクリプトームを比較することで、自己複製と分化にそれぞれ関わる候補遺伝子セットが明らかになりつつある。

**⑤ 上記の遺伝子ネットワークに対するニッチシグナル (FGF5 等) の制御を明らかにする。**

**成果⑤-1(吉田 G)** マウス精巣には、特定のニッチ構造が認められず、幹細胞の数をどのように決めるかは謎であった。本研究によって、GSC が集まる血管近傍に新たに見出された特殊なタイプの細胞が組織に分泌する FGF5 の量が、幹細胞数を定めることを明らかにした。さらに、明瞭なニッチ領域の空間的広がり幹細胞の数を定める、という従来の考え方で説明できない幹細胞数を制御する新規のメカニズムの提案に至った (投稿準備中)。

**⑥ この細胞自律的な GSC 制御に関わる遺伝子群を明らかにし、その機構の種間の違い (進化的な変化) を**



## 解明する。

成果⑥-1(吉崎 G) 一回繁殖のサケ型と複数年にわたり繁殖を繰り返すマス型における GSC の制御機構の変化を明らかにするため、サケ型種であるヒメマスとマス型種であるニジマスを用い、精巣内の A 型精原細胞 (ASG ; GSC を高濃度で含むと予想される集団) の挙動を解析した。その結果、精巣あたりの ASG 数は繁殖期の 4 ヶ月前の段階で 600-800 万細胞と両種ではほぼ同様であったが、その後ヒメマスで特異的に減少し排精 1 ヶ月後では、すべての ASG が消失した。ASG の減少が細胞自律的に制御されているかを明らかにするため、ニジマスの ASG を三倍体の不妊ヒメマス宿主に移植した。その結果、ヒメマス宿主精巣内で機能的なニジマス精子のみが生産された。このヒメマス宿主精巣におけるニジマス ASG 挙動を解析したところ、ヒメマスの ASG で見られたような細胞数の減少は全く認められず、排精 1 ヶ月後においても 700 万程度の ASG が残存していた。本結果はヒメマス精巣内でニジマス ASG が自律的にその挙動を制御していることを強く示唆している。さらに、ASG の制御機構の違いを明らかにするため、両種の ASG のトランスクリプトーム変化を小林 G と共同で解析中である。さらに、この解析結果を、成果④-3 (吉田 G) で得られたマウス GSC サブタイプのトランスクリプトームと比較する予定である。

## ⑦「GSC の性質が宿主の寿命を支配する」という、まったく新しい概念の検討を行う。

成果⑦-1(吉崎 G) 生殖腺内での GSC の生残と個体の寿命の関係を明らかにする目的で、三倍体ヤマメにニジマスとヤマメの ASG を移植した個体を作成し、現在これら個体の寿命を調査すべく完全に同一条件での飼育実験を遂行中である。

## **【研究項目 A02:in vitro で配偶子産生を再現する】**

### **《PGC の形成を再現する》**

#### ⑧ 小林や松居が明らかにする遺伝子の機能を生化学的あるいはゲノムワイドに解析する。

成果⑧-1(林 G) 体外培養系を利用して、in vivo では細胞数が少なく解析が難しい PGC の維持機構について A01 と協力して解析を行い、種間で保存された普遍的な遺伝子ネットワークの同定を行う。小林 G との共同研究により、ショウジョバエ Ovo のマウスホモログである Ovol 遺伝子の PGCs における機能について体外培養系を用いて解析している。現在までに、Ovo のマウスホモログである Ovol1, 2, 3 のうち Ovol1 および 2 が PGCs の初期分化段階で発現していること、さらに Ovol2 遺伝子は Ovol2a, 2b, 2c の isoform があるが、これらのうち Ovol2a と 2b が初期 PGC において発現していることを明らかにした。それぞれのノックアウト ES 細胞を用いた解析により、Ovol2 が PGC の分化過程に必要な知見を得ている。今後 Ovo 下流遺伝子についてもショウジョウバエとの相同性を明らかにする予定である。

#### ⑨ 性差を有する PGC の形成を再現できる培養系の構築を目指す。

この項目に関しては、尾畑 G との連携研究により重要な成果が得られているため後述する。

### **《配偶子の産生を再現する》**

#### ⑩ GSC からの精子産生を長期間維持できる培養系を構築する。

成果⑩-1(小川 G) マイクロ流体システムを導入し、培養液を常時流し続けることで物質供給を効率化することを計った。デバイスの素材である PDMS (Polydimethyl-siloxane) は酸素透過性に優れており、精巣組織へは十分な酸素供給が得られる仕組みになっている。作成したマイクロ流体デバイスにマウス精巣組織片を留置して、流路に培養液を流しながら培養を行うことにより、精子形成を組織全体にわたって効率よく誘導することに成功し、さらに 6 か月以上に亘って精子形成が維持され、精子産生を効率よく持続させることに成功した。6 か月目に採取された精子を用いた顕微授精でも健康な産仔が得られた。今回開発されたマイクロ流体デバイスは精巣組織の形態と機能を長期間に亘って維持することができ、生体内環境により近い微小環境を再現できていることを示すことができた(論文作成中)。

#### ⑪ 卵母細胞の成熟を効率よく進める培養系の開発を行う。

成果⑪-1(尾畑 G) PGC のみを含むマウス胎仔卵巣から機能的な卵を作成する in vitro 培養系を開発する

ことを目的として研究を行ってきた。研究分担者と密に連携することにより 50 種以上の培養条件を検討した結果、PGC から成熟卵を産生するための新規 *in vitro* 系を構築し、世界で初めてマウスを誕生させることに成功した（投稿中・特許出願準備中）。非常に困難を極めると予想された当初計画の目標が、予想より遥かに短い期間で達成できた。今後は、多様な動物種への応用を踏まえ、成体マウスの卵巣内に潜在する原始／一次卵胞から成熟卵を産生する新規 *in vitro* 系を構築する。

成果⑩-2(尾畑 G) 卵成熟マーカーの中からインプリンティングに寄与する因子を探索し、インプリンティングを効率良く誘導できる *in vitro* 系の構築を目指した。これまでに、インプリンティングに不可欠な DNA メチル化酵素 DNMT3A と DNMT3L を過剰発現する Tg マウスの卵母細胞では、DNA メチル化インプリンティングが早期に誘導されることが明らかとなった (*Hum Mol Genet* 2014 ; *Reproduction* 2014)。しかし、このメチル化は受精後の胚発生過程で失われインプリンティング遺伝子の発現を制御できずに胚性致死をもたらした。機能的なインプリンティングには DNA メチル化以外のエピジェネティック修飾が必要ながわかった。一方、⑩-1 の *in vitro* 由来卵においてインプリンティングは効率よく確立していたことから、今後は、機能的なインプリンティングに不可欠なエピジェネティック因子を、構築された *in vitro* 系を用いて、探査・同定する。

### ⑨ 性差を有する PGC の形成を再現できる培養系の構築を目指す。

成果⑨-1(林 G) マウスの多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)を出発点として *in vitro* における配偶子産生系を確立することを目指し、ES 細胞から分化誘導した PGC を胎仔卵巣の体細胞との長期共培養を行った。その結果、生体への移植を行うことなく、*in vitro* で卵子を作製することに成功した。これらの卵子は生体由来の精子と体外受精でき、子宮に移植することで健常な産仔をえることが出来た。さらに、これらの受精卵から得られた胚盤胞から ES 細胞を樹立することに成功しており、雌の生殖系列サイクルをすべて *in vitro* で再構築することに成功した。

### ⑫ ヒトや有用動物を含む多くの脊椎動物において多能性細胞から配偶子を産生できる新規培養系に発展し、畜産、水産や生殖医療等の応用面で革新的な技術となる。

成果⑫-1(小川 G) 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。器官培養下で精子形成を促進・維持する物質の検索を行った結果、KSR や AlbuMAX を用いることなく、化学組成の明らかな試薬を基礎培地に添加するだけで、マウス精子形成を誘導することに成功している（未発表）。この条件が明らかになったことで、ヒトを含む様々な哺乳動物の精子形成を誘導できる培養液組成の解明と最適な培養液の開発が進行すると考えている。

成果⑫-1(尾畑 G) マウスで構築された *in vitro* 系を家畜へ応用する研究は、平成 27 年度以降に進める。

### 3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況（2ページ程度）

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

本新学術領域研究の採択時の審査所見は、以下の通りである。

本研究領域は、動物の配偶子産生システム制御機構を、動物種を超えて細胞自律的に機能する共通メカニズムに注目し、*in vitro*系で配偶子産生過程を再現することによって解明を目指す提案である。動物の配偶子産生システムの解明は、生命の根幹をなす重要な課題であるだけでなく、生殖医療、水産、畜産の応用面への貢献も期待されるもので、社会的にも波及効果が大きく、新学術領域研究としてふさわしい。研究計画について、① 魚類やハエ、マウスなどを用いた*in vivo*解析系と*in vitro*解析系の連携によって、始原生殖細胞の形成や配偶子の産生システムに焦点を絞って検証していくという計画は成果が期待できる。一方で、② ネットワーク解析については通常のカスケード解析に留まる可能性もあるので、遺伝子間の相互作用の全体像を明らかにするために、数理生物学的解析を加える必要があると思われる。また、領域の目標達成のためには、③ エビジェネティックな視点からの研究についても公募研究などで強化すべきであるとの意見もあった。研究組織については、それぞれの研究計画は明確で、役割分担や研究者間の連携などよく計画されている。一方で、④ 研究支援体制を連携研究者に依存している点や、⑤ 若手研究者育成に関する具体的な計画に乏しい点については、今後、具体的な改善策を検討すべきである。また、⑥ 一部の計画研究代表者については、他の大型研究課題との研究内容の切り分けに留意することが必要である。

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

所見①にも強調されているように、*in vitro*系を解析系として用いて、動物種を超えた配偶子産生の共通メカニズムを明らかにすることが本領域の特徴の一つである。本計画研究では、ショウジョウバエでPGC形成に重要な役割を担うOvoのマウスにおける機能解析に、計画研究5で開発した多能性細胞からPGC様細胞を*in vitro*で分化させる系を用いており、簡便かつ迅速に顕著な成果が得られている。ショウジョウバエでの*in vivo*の解析とマウスにおける*in vitro*の解析系を併用することにより、動物に共通するメカニズムの解明が加速される。この様な解析系を計画研究間の連携によりうまく立ち上げることができた点で評価できる。

所見②にあるように、トランスクリプトームに関する大量データ解析や数理生物学的解析が本研究領域の遂行に重要であると考えている。実際に、遺伝子ネットワークを明らかにする上で、小林Gの連携研究者の佐藤が開発した新たな数理生物学的手法(PLoS Pathg 2010)を用いて遺伝子ネットワークを解析中である。また、研究協力者の重信とも大量トランスクリプトームデータ解析に関する共同研究が進んでいる。佐藤および重信との共同研究は小林G内にとどまらず、本領域の中で活発に行われている（これまで計8件）。さらに、本領域外の海外研究者との共同研究により、数理生物学的解析を積極的に取り込むことも行っている。例えば、吉田Gでは、幹細胞のダイナミクスとその制御機構の解明を目指して、細胞の挙動の数理統計解析について、当分野の世界的第一人者であるBenjamin Simons博士(英国ケンブリッジ大学・物理学)との共同研究を行っている。これにより、40年来の定説に代わるモデルを提案するに至り、注目されている(*Cell Stem Cell* 2014)。また、細胞外シグナルや細胞内遺伝子ネットワークの解析も進め、*in vivo*の観察/実験と、*in silico*の数理生物学的解析をうまくカップルさせた研究も進行中である(投稿準備中)。以上のように、遺伝子ネットワークの数理生物学的解析に向かって、着実に近づいている。

所見④に関して、実際に、小林Gの連携研究者である佐藤、および研究協力者の重信が、領域内の研究グループごとに個別に対応し、解析手法の助言や数理的解析に関する共同研究を実践的かつ効果的に行う方法を取っている。この方法は、講習会などと比較して、個々の共同研究を進める上でも、新たな解析手法を習得させ若手研究者を育成する上でも効果的である。そのため、この2名は、計画研究の一部

の研究テーマを担う分担者の立場ではなく、連携研究者あるいは研究協力者の立場で柔軟に共同研究に対応できるような体制をとっている。

**所見③**に関して、下記のように、ショウジョウバエやマウスにおいてエピジェネティックな制御がPGCの形成やGSCの制御に重要な役割を持つことが明らかとなりつつある。このように計画研究において十分な研究内容が確保されており、残念ながら公募研究ではそれを凌駕する提案がなかった。本研究領域では、エピジェネティックな制御を遺伝子発現制御機構の一つとして捉えつつも、それだけに注目することなく、広く配偶子産生制御機構を解明することを目指す。本研究領域におけるエピジェネティックな視点からの研究の代表例を以下に挙げる。

まず、**計画研究1**では、ショウジョウバエPGC中での遺伝子発現に関わるMamoの機能解析からヒストン修飾を介したエピジェネティックな制御の重要性が明らかになっている。Mamoの下流遺伝子とともにMamoの相互作用因子（エピジェネティックな制御に関わる因子）にも注目して解析を進めることで、エピジェネティックな視点からもPGC 特異的な遺伝子ネットワークの解析を進めている。**計画研究2**においても、マウスPGC形成を制御するエピジェネティック制御分子のスクリーニングを行い、候補分子を得ている。**計画研究3**では、「幹細胞分化の可逆性、不可逆性」という細胞レベルでの重要な現象を、「エピジェネティックなクロマチン制御」により説明できるという重要な成果を得た。具体的には、精子幹細胞集団において、GFR $\alpha$ 1陽性細胞とNgn3陽性細胞の間の転換は可逆的であり、これに対応して、これら細胞間のエピジェネティック状態は類似している。一方、Kit陽性細胞に転換する分化の不可逆点においては、脱分化が起こらないような高い障壁がエピジェネティックな変化により生み出されていることが明らかとなった (*Development* 2013, *Development* 2015)。最後に、ほ乳類の卵形成過程では、ゲノムインプリンティングの確立が不可欠であるが、**計画研究7**では機能的な卵をin vitroで産生する研究の一環として、卵のエピジェネティクスに関する研究で成果を挙げている。

**所見⑤**のように、若手研究者育成に関する具体的な計画に乏しいと指摘を受けた。具体的には若手研究者集会開催の支援、共同研究により若手研究者が数理生物学的な解析手法を取得するのを支援する、海外派遣支援、などを現在までおこなってきた。しかし、若手／女性研究者が現在置かれている状況は厳しく、優秀な若手研究者を育成するためには安定したポストの確保や獲得が必須である。このため、少なくとも本研究領域内でポストクサ等確保することに努めた。また、人的流動性を高める努力も行ってきた（詳細は若手研究者の育成に係る取組状況を参照）。

**所見⑥**に関して、該当するのは計画研究2代表者の松居と計画研究5代表者の林である。松居のCREST研究プロジェクトでは、主に生殖細胞の分化過程におけるエピジェネティック制御が次世代に及ぼす影響に主眼を置いた研究を行っており、マウスおよび他の動物種における生殖細胞形成を制御する分子ネットワークを解明する本研究とは研究内容が明確に切り分けられている。林に関しては、これまで所属していた研究室ではERATO研究プロジェクトが進行していたが、in vitroにおけるマウスの卵子産生系の構築については本新学術領域研究で行うという切り分けがなされた。また林は、申請時とは所属を変え、新たに独立した研究室を主宰することにより、明確に研究内容を切り分けた。

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

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果（発明及び特許を含む）について、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

##### 【研究項目 A01: 配偶子産生システムの制御機構を知る】

研究項目 A01 では、①雌雄性を有する PGC の形成機構を知ること、②GSC の自己複製と配偶子産生の制御機構を知ること为目标としている。さらに、A02 の研究者との共同研究等により、③それぞれの研究者がこれまで用いてきた実験動物以外にも解析の対象を広げ動物間での共通原理の理解を目指す。また、トランスクリプトーム解析の技術支援などに関する領域内共同研究も行っている。これまでに、それぞれの制御機構を遺伝子ネットワークの視点から理解する上で重要な研究基盤の確立（おもに①）および幹細胞の挙動に関する細胞ダイナミクスの記載（おもに②）が得られている。また、公募研究は、個々の研究において重要な成果あるいは研究基盤の確立につながる成果を得ており、③の視点において、計画研究の成果と関連する成果が得られると期待できる。下記の成果の番号は上記の番号と対応し、どの程度目的に近づいたかをカッコ内に記載した。

**計画・成果①③（研究目的達成のための重要な成果）（研究基盤確立）**（領域内共同研究）：母性転写因子 *Ovo* の下流遺伝子をショウジョウバエで同定するとともに、マウスにおける *Ovo* の機能解析を連携研究者および計画研究 5 と共同して明らかにした（論文作成中）。また、カイコ培養細胞において生殖細胞特異的な遺伝子の活性化に必要な転写因子を網羅し、遺伝子ネットワークを明らかにする基盤を作った（計画研究 1；論文未発表）。

**計画・成果①（研究基盤確立）**（領域内共同研究）：母性転写因子 *Mamo* の *vasa* 遺伝子に対する作用機構の解析を進めた結果、*Mamo* が *vasa* 遺伝子イントロン中の新規シスエレメントに直接作用すること、*Mamo* がシスエレメントのヒストンアセチル化(H3K27ac)を促進すること、*Mamo* がヒストンアセチル化(H3K27ac)を触媒する酵素と共同して *vasa* 遺伝子の発現を活性化することが明らかになった。これらの結果は、*Mamo* がエピジェネティックな制御を介して *vasa* 遺伝子の発現を活性化することを強く示唆する（計画研究 1）。

**計画・成果①（研究目的達成のための重要な成果）**：マウス PGC の多能性幹細胞(EG 細胞)への変化の制御を明らかにするために、細胞内情報伝達分子 Akt の役割を調べ、この分子が LIF や bFGF などのサイトカインのシグナル系と協同的に作用し、PGC の細胞死の抑制等を介して、EG 細胞への変化を促進することが明らかになった。またマウス PGC そのものは細胞分化多能性を有しないことも明らかになった（計画研究 2）。

**計画・成果②（研究目的達成のための重要な成果）**：サケ科魚類の進化に伴う GSC の制御機構を明らかにするため、まず、典型的な一回繁殖種であるヒメマスと多回繁殖種であるニジマス、さらにニジマスの生殖細胞を移植した三倍体ヒメマス宿主を用い、精巣内の A 型精原細胞 (ASG ; GSC を高濃度で含むと予想される集団) の挙動を解析した。その結果、精巣あたりの ASG 数は繁殖期にむけヒメマスでのみ減少し、排精 1 ヶ月後には完全に消失した。一方、ニジマスとヒメマス宿主中のニジマス ASG は繁殖期前後でその数は維持された。本結果は一回繁殖種では、繁殖期後に ASG を維持するシステムが存在しないこと、さらにこの制御は ASG 自律的になされていることを示唆している（計画研究 4）。

**計画・成果①（研究目的達成のための重要な成果）**：生殖能力を有する成虫への変態を制御する新たな受容体として、チラミン受容体 (Oct $\beta$ 3R) を同定した。これは、配偶子形成開始のシグナル系の理解に重要な結果である（計画研究 1; Ohhara et al., *PNAS* 2015）。

**計画・成果②（研究目的達成のための重要な成果）**（領域内共同研究）：マウス精子幹細胞の自己複製と分化の制御機構を解明するために、分化誘導因子レチノイン酸(RA)との関係を解析した結果、未分化型精原細胞の中に、RA 受容体を発現し RA に反応して分化するものと、RA 受容体の発現を欠くために未分化に留まるものがあることを発見した。このことによって、分化シグナル (RA) に対する幹細胞の反応性が不均一になることで自己複製と分化のバランスを取ることが出来るという新しいメカニズムを初めて示した（計画研究 3; Ikami et al., *Development* 2015）。

**計画・成果②（研究目的達成のための重要な成果）**（国際共同研究・異分野融合研究）：マウス精子幹細胞の精巣内ダイナミクスを解明するために、精子幹細胞の生体内ライブイメージングおよび分化運命解析を行

い、その結果を数理統計学的に解析した。その結果、精子幹細胞は、不完全分裂と断片化をストカスティックに繰り返すことで、単独で存在する状態(As 細胞)と合胞体の間を行き来していることが明らかとなった。これは、1971年に提唱された、As 細胞のみが幹細胞であるとする定説に代わる新しいモデルを提唱するものであり、研究領域に大きなインパクトを与えた(計画研究 3; Hara et al., *Cell Stem Cell* 2014)。

**計画・成果② (研究目的達成のための重要な成果)**: マウス精子幹細胞が分化の不可逆点を越える時に、DNA メチル基転移酵素タンパク質の発現レベル、および、抑制性ヒストン修飾とそれを介する酵素のタンパク質の発現レベルが大きく変化することを発見し、「エピジェネティックチェックポイント」と名付けた。これは、分化の可逆性、不可逆性とゲノム修飾の関係を明確に示した研究として特筆される(計画研究 3; Shirakara et al., *Development* 2013)。

**公募・成果①③ (研究基盤確立)**: RNA-seqによるカタユレイボヤ PGC の遺伝子発現の網羅的解析を行うため、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたノックインによる PGC マーキングを試みた。PGC 関連遺伝子ホモログを標的とする TALEN とレポーター遺伝子を含むターゲット DNA を共注入し相同組み換えを促すことで、PGC にレポーター遺伝子が発現することが明らかとなった。これは、カタユレイボヤにおける初めてのノックイン成功例であり、同時にホヤ PGC において外来遺伝子を発現させた初めての例である。現在、マウスの生殖細胞形成に関与する遺伝子のホモログを標的とする TALEN を作成し、ホヤ胚における機能解析を行いつつある(倉林 G)。

**公募・成果② (研究基盤確立)**(領域内共同研究): 精子形成に必須である生殖細胞間架橋(ICB)の役割を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。ICB は精巣内でステージによって変化しているため、異なる週令マウス精巣から ICB を濃縮精製しプロテオミクス解析を行い、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、吉田 G が取得した、切断される ICB を有する未分化な精原細胞のソート画分のマイクロアレイデータを比較参考資料として、ICB の制御因子の候補を抽出に利用した。さらに、ICB と細胞質に局在する移行性タンパク質を探索した。このような移行性 ICB タンパク質の動的な挙動解析や相互作用、機能を明らかにすることにより、ICB を介した低分子輸送の有無を解明する。(岩森 G)。

**公募・成果① (研究基盤確立)**: ショウジョウバエ卵巣において、生殖幹細胞により生み出されるシストブラストの分化制御には、それを取り巻くエスコート細胞における Wnt シグナル活性化が重要な役割を果たす。これまで、Wnt シグナルの要となる  $\beta$  カテニンの機能を解明すべく、シストブラストの分化(生殖細胞間連絡路、ring canal の成長)を解析した結果、150 番チロシン残基の Btk29A キナーゼによるリン酸化がシストブラストの分化に必須であることが明らかとなった。従来、不明な点の多かった  $\beta$  カテニンのチロシンリン酸化の重要性が明確となり、本研究の基盤となる発見となった(山元 G)。

**公募・成果② (研究基盤確立)**: ミツバチの巣から女王蜂を除いた後働き蜂は卵巣を再発達させるがその機構は明らかになっていない。非侵襲的に生物個体の形態を測定できる Micro-CT を用いることで、ミツバチ個体の卵巣の形態を経時的かつ詳細に解析できることを可能とした。これによって、働き蜂の卵巣が再発達する過程を正確に追跡出来るようになった(鎌倉 G)。

**公募・成果②③ (研究基盤確立)**: プラナリア有性化因子を同定するために、有性化因子が局在している卵黄腺のメタボローム解析を行い、卵黄腺に特異的あるいは多量に含まれている低分子化合物を 20 種同定した。これらの化合物の中から 6 種を無性個体に給餌したところ、4 種に卵巣誘導活性が認められた。有性状態の獲得には卵巣の成熟が重要であることから、これらの卵巣誘導因子により完全有性化が引き起こされると考えられる(小林 G)。

**公募・成果② (研究目的達成のための重要な成果)**(A02 と共同研究の可能性): マウスにおける原始卵胞形成機構の理解を目指し、卵巣において卵細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質(仮に A とする)変異体を用いて組織学的解析を行った。その結果、遺伝子 A 変異体では出生直後から卵母細胞が急激に死滅すること、また、正常な原始卵胞が形成されないことが明らかとなった。原始卵胞形成に異常が見られる変異体は本研究の遺伝子 A 以外に転写因子 Figla が報告されているのみである。そのため、本研究から得られる成果は原始卵胞形成の分子機構の理解に大きく貢献することが期待できる。また、原始卵胞の形成は卵形成の最も初期の発生プロセスであり、遺伝子 A を介した原始卵胞形成の分子機構の解明は領域の目指す in vitro による配偶子産生に貢献することが期待できる(加藤 G)。

**公募・成果②③ (研究目的達成のための重要な成果)**(国際共同研究): ショウジョウバエ生殖質形成因子をコードする *oskar* mRNA の翻訳抑制因子である Bruno タンパク質について解析を進めた結果、Bruno がリン酸化による制御を受けることを明らかにした。さらに、*oskar* mRNA の翻訳活性化には Bruno の機能を阻害することが必要であることを明確にした(中村 G; Kim et al., *PLoS Genet.* 2015)。

**公募・成果②③ (研究目的達成のための重要な成果)**: ほ乳類の曲精細管の基部に位置する弁様構造(セルトリバルブ; SV と命名)内の精子幹細胞(SSC)ニッチ(SV ニッチ)を発見した。この SV ニッチは、ショウジョウバエの SSC ニッチの構造と極めて類似しており、全ての曲精細管の基部に存在し、この部位の SSC の高い増殖

活性により、恒常的に SSC が維持されることが判明した。また、SV ニッチを構成するセルトリバルブ細胞は、恒常的にニッチ因子を分泌する成体セルトリ前駆細胞であることが判明し、SV ニッチが無脊椎動物から進化的に保存された SSC ニッチであることが強く示唆された。(金井 G; Aiyama et al., *Stem Cells* 2015)。

**公募・成果① (研究目的達成のための重要な成果)**: マウス PGC の雄性分化において、NANOS2 と NANOS3 の役割について解析した結果、NANOS2 と NANOS3 はともに CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体に結合するが、NANOS2 は CNOT1 を介すのに対して NANOS3 は CNOT8 を介すことを明らかにした。これまでに NANOS2 と NANOS3 には異なる機能と重複する機能を持つことが知られていたが、本研究によってその分子的な基盤の一端を明らかにした (鈴木 G; Suzuki A, et al., *Biology Open* 2014)

#### 【研究項目 A02: in vitro で配偶子産生を再現する】

研究項目 A02では、①性差を有する PGC を体細胞の力を借りずに in vitro で作出すること、②そのような PGC から卵子形成を in vitro で進行させること、③精子形成に関しても精子幹細胞から長期にわたり精子形成を継続可能な in vitro 系を構築することを目標としていた。さらに、これら in vitro 系を用いて、④生殖医療の基盤となる基礎研究を展開するとともに、⑤A01 の研究の in vitro 解析系として用いる。下記の成果の番号は上記の番号と対応し、どの程度目的に近づいたかをカッコ内に記載した。今後は、in vitro 系をより効率の良いものにするとともに、応用を見据えた基礎研究や、A01 の研究の解析系として活用することにより配偶子形成機構解明を目指す。

**計画・成果② (研究目的早期達成)**: PGC から卵を産生する in vitro 系を構築するため、種々の培養条件を検討した。その結果、卵胞形成、卵胞成長、インプリンティング、減数分裂など卵形成の全過程を in vitro で再現し、この in vitro 由来卵から受精後、正常な産仔を 89 匹誕生させることに成功した。PGC から卵を産生する in vitro 系が世界で初めて構築できた (計画研究 7; 論文投稿中・特許出願準備中)。

**計画・成果③ (研究目的達成のための重要な成果)**: 新しいマイクロ流体デバイスを開発し、そのデバイス内でのマウス精巣組織培養により、精子形成効率の改善と、長期間(6 ヶ月間)に亘る精子形成の持続に成功した (計画研究 6: 論文作成中)。

**計画・成果① (研究目的達成のための重要な成果) 領域内共同研究**: 体外培養における配偶子産生系を確立するために、ES 細胞から分化誘導した PGC を胎仔卵巣の体細胞と長期共培養した。その結果、体細胞の力を借りるが ES 細胞から機能的な卵子を作製することに世界で初めて成功した (計画研究 5)。

**計画・成果① (研究基盤確立)**: ES/iPS 細胞から分化誘導した PGC を成体雌卵巣への移植により機能的な卵子にさせる方法を確立した。このことにより体外培養による卵子産生系の確立のための基盤が構築された (計画研究 5; Hayashi and Saitou, *Nature Protoc.* 2013)。

**計画・成果③④ (研究基盤確立)**: ゲノム編集技術である TALEN および CRISPR/Cas9 を用いて培養精子幹細胞の遺伝子改変に成功した。(計画研究 6; Sato et al., *Stem Cell Reports* 2015)

**公募・成果④ (研究基盤確立)**: 無排卵・無月経となった早発閉経患者の卵巣から卵子を再生するために、患者の卵巣間質細胞を Collagenase による細胞分散し分子生物学的に検証を行ったところ、生殖系列細胞に類似した機能を有する細胞が発生することが明らかになった。これは、早発閉経患者の卵巣間質細胞中に、休眠した未知の生殖系列細胞が存在することを示す (河村 G)。

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

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果の公表の状況（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に\*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。また、別添の「(2) 発表論文」の融合研究論文として整理した論文については、冒頭に◎を付してください。

### 【領域全体としてのとりくみ】

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

#### 【主催・共催シンポジウム】

「in vitro における生殖細胞形成研究の最新トピックス」第108回日本繁殖生物学会 2015.9.19 宮崎大学 木花キャンパス

「Mechanism and Reconstitution of in vitro/ex vivo Germ Cell Development」第36回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 2015.7.22 東京 虎ノ門ヒルズフォーラム

「Mechanisms regulating gamete formation 生殖細胞の産生制御機構」第60回日本生殖医学会学術講演会 2015.4.27 パシフィコ横浜

「A Contact Point Between Pluripotency and Germness」第47回日本発生生物学会年会 2014.5.28-30 名古屋 WINC AICHI

「ニッチの謎を議論する: 免疫器官と生殖器官から見た微小環境の実態、制御、生理的意義」新学術領域研究「免疫四次元ダイナミクス(領域代表: 高濱洋介)」との合同シンポジウム 2014.6.18-19 京都 国際高等研究所

### 【研究項目 A01】 配偶子産生システムの制御機構を知る

#### 計画研究1: 小林 悟／向 正則

【論文】(全て査読あり(査読あり論文9報)、他査読なし論文1報、計11報)

T. Nishimura, T. Sato, Y. Yamamoto, I. Watakabe, Y. Ohkawa, M. Suyama, S. Kobayashi, and \*M. Tanaka: foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science* (2015) *in press*

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)

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) (領域内共同研究)

\*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 (2015)

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. Scharl, 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) (領域内共同研究)

M. Hayashi, M. Sato, Y. Nagasaka, S. Sadaie, S. Kobayashi and \*G. Yoshizaki: Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. *Biol Reprod* 91, 23 (2014) (領域内共同研究)

R. S M 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, \*M. Mukai: Binding of Drosophila maternal Mamo protein to chromatin and specific DNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 438, 156-160 (2013)

Y. Sato, M. Mukai, J. Ueda, M. Muraki, T. J. Stasevich, N. Horikoshi, T. Kujirai, H. Kita, T. Kimura, S. Hira, Y. Okada, Y. Hayashi-Takanaka, C. Obuse, H. Kurumizaka, A. Kawahara, K. Yamagata, N. Nozaki, and \*H. Kimura: Genetically encoded system to track histone acetylation in vivo. *Sci Rep* 3, 2436 (2013)

【学会発表】(他招待講演6件(計8件)、学会発表16件)

小林悟:「生殖細胞の特質とその形成機構」日本生殖医療学会 横浜 2015.4.27 招待講演

S. Kobayashi: germline formation by maternal factors in Drosophila embryos. 47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, WINC Aichi, Nagoya 2014.5.30 招待講演

【情報発信】 ホームページ: <http://skob.tara.tsukuba.ac.jp/top/>

一般講演: 2015.3.22 小林悟: 第18回自然科学研究機構シンポジウム 生き物たちの驚きの能力に迫る「不死の生殖細胞の不思議に迫る」学術総合センター 200名

2014.12.5 小林悟: 旭丘高等学校理科特別講座講演会「次世代に命をつなぐ生殖細胞の不思議」50名

2014.7.24 小林悟: あいち理数教育推進事業「知の探究講座」講演「生殖細胞に魅せられた研究-これまでを振り返って思うこと-」150名

2014.7.12 小林悟: 茗溪会愛知支部主催講演会「次世代に命をつなぐ生殖細胞の不思議」150名 他、出前授業1件

報道: 基礎生物学研究所の挑戦 シリーズ5「生命の系譜 ハエで解明」2013.12.1 朝日新聞

プレスリリース: 幼虫から生殖能力を有する成虫への変化を制御する新たな仕組みをショウジョウバエで発見 2015.01.22 基礎生物学研究所

#### 計画研究2: 松居靖久／酒井則良

【論文】(全て査読あり(査読あり論文11報)、他査読なし論文2報、計13報)

\*Yagi, S., Ito, S., Hirabayashi, K., Moriishi, K. Matsui, Y., Moriya, K., Koike, K., Matsuura, Y., Shiota, K. Novel sex-dependent differentially methylated regions are demethylated in adult male mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) *in press*

Yamaguchi, Y. L., Satomi S. Tanaka, S. S., Kumagai, M., Yuka Fujimoto, Y., Terabayashi, T., Matsui, Y. and \*Nishinakamura, Y. Sall4 is essential for mouse primordial germ cell specification by suppressing somatic cell program genes. *Stem Cells* 33, 289-300 (2015)

\*Matsui, Y. and Mochizuki, K. A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 81, 160-170 (2014)



- Hayakawa, N., Ogoh, H., Sumiyoshi, M., Matsui, Y., Nishikawa, S., Miyamoto, K., Maede, Y., Kiyonari, H., Suzuki, M. and \*Watanabe, T. The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation. *Biochem Biophys Res Commun* 453, 748-753 (2014)
- \*Matsui, Y., Takehara, A., Tokitake, Y., Ikeda, M., Obara, Y., Morita-Fujimura, Y., Kimura, T., and Nakano, T. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. *Development* 141, 4457-4467 (2014)
- Saito, K., Sakai, C., Kawasaki, T., \*Sakai, N. Telomere distribution pattern and synapsis initiation during spermatogenesis in zebrafish. *Dev Dyn* 243, 1448-1456 (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. Scharl, 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) (領域内共同研究)
- \*Leitch, H.G., Okamura, D., Durcova-Hills, G., Stewart, C.L., Gardner, R.L., Matsui, Y., Papaioannou, V.E. On the fate of primordial germ cells injected into early mouse embryos. *Dev Biol* 385, 155-159 (2013)
- Shinya, M., Kobayashi, K., Masuda, A., Tokumoto, M., Ozaki, Y., Saito, K., Kawasaki, T., Sado, Y., \*Sakai, N. Properties of gene knockdown system by vector-based siRNA in zebrafish. *Dev Growth Differ* 55, 755-765 (2013)
- Higaki, S., Koyama, Y., Shirai, E., Yokota, T., Fujioka, Y., Sakai, N., \*Takada, T. Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoro (Gnathopogon caeruleus). *Fish Physiol Biochem* 39 701-711 (2013)
- Higaki, S., Koyama, Y., Shimada, M., Ono, Y., Tooyama, I., Fujioka, Y., Sakai, N., Ikeuchi, T., \*Takada, T. Response to fish specific reproductive and endocrine disrupting chemicals of a Sertoli cell line expressing endogenous nuclear receptors from an endemic cyprinid *Gnathopogon caeruleus*. *Gen Comp Endocrinol* 191, 65-73 (2013)
- 【学会発表】(全て招待講演(招待講演計4件)、他学会発表10件)
- 松居靖久「始原生殖細胞の分化と再プログラム化の分子機構」第60回日本生殖医学会学術講演会 シンポジウム「生殖細胞の産生制御機構」横浜 2015.4.27
- 松居靖久「多能性幹細胞と生殖細胞を隔てるエピジェネティック障壁」日本遺伝学会第86回大会 ワークショップ「マウス遺伝学が牽引する最先端生命科学」長浜 2014.9.19
- Yasuhisa Matsui and Ikuma Maeda, 'Epigenetic barrier between pluripotency and germness in mice', 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Symposium 'A contact point between pluripotency and germness' Nagoya, May 30, 2014.
- Sakai, N. Culture of male germ cells: toward a germ cell-mediated gene transfer system in zebrafish. Nancy Hopkins Reunion Symposium. Cambridge, USA, May 10, 2013
- 【産業財産権など】 魚体内での他家組織の継代維持法. 発明者:酒井則良、河崎敏広 権利者:大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 種類:特許 出願番号:特願 2014-163587 出願年月日:2014.8.11 国内特許

【情報発信】 ホームページ: <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/crcbr/>

プレスリリース: <http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/info/news/20141104/index.html>

一般向け著書: 酒井則良 生殖系幹細胞の謎 遺伝子が語る生命38億年の謎(国立遺伝学研究所編)悠書館 第19章 (2014)

酒井則良 動物の生殖細胞と体細胞(第2章-6), 受精(第3章-3) 遺伝子図鑑(国立遺伝学研究所編) 悠書館 (2013)

### 計画研究 3: 吉田松生／大保和之／原健士朗

【論文】(全て査読あり(査読あり論文7報)、他査読なし論文2報、総計9報)

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) (領域内共同研究)

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

\*S. Yoshida: From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis *WIREs Developmental Biology* (2015) in press

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

【学会発表】(すべて招待講演 他、招待講演16件(計21件)、学会発表39件、総計60件)

吉田松生: 配偶子を作り続ける幹細胞の制御機構

大保和之: エピジェネティクスの視点から見た精原幹細胞分化 第60回日本生殖医学会シンポジウム 『生殖細胞の産生制御機構』 横浜 2015.4.27

S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells: their in vivo identity and dynamics. EMBL Conference on Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine 2014, Germany, October 9-12, 2014

S. Yoshida: A single-cell-resolution analysis of the sperm stem cell dynamics in the mouse testis. The World Congress of Reproductive Biology 2014, Edinburgh, UK, September 2-4, 2014

S. Yoshida: Towards the understanding of the sperm stem cell niche in the mouse testis. IV Workshop on Male Reproductive Biology, São Paulo, Brazil, November 27, 2013

【受賞】 原健士朗 第4回自然科学研究機構 若手研究者賞, (学会発表賞1件) **Poster Award**, K. Ikami, R. Sugimoto, M. Tokue and S. Yoshida: Two subpopulations with different retinoic acid responsiveness support the stem cell function of mouse spermatogenesis. EMBO Conference "Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine", Heidelberg, Germany, October 9-12, 2014

【情報発信】 ホームページ: (吉田) <http://www.nibb.ac.jp/germcell/> (大保) <http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/> (原) <http://www.agri.tohoku.ac.jp/seisyoku/member.html>

一般向け著書(翻訳): 吉田松生: Scott F. Gilbert 著 ギルバート発生生物学 (2013) 阿形清和, 高橋淑子 監訳 (メディカル・サイ

報道: 精子生成の仕組み解明 2015.4.29 中日新聞

精子幹細胞の未知の性質 マウスを使って明らかに 2014.5.16 科学新聞 他、新聞報道 4 件

プレスリリース: 精子幹細胞が尽きることなく精子を作り続けるメカニズム 2015.4.28 基礎生物学研究所

精子幹細胞の知られざる性質が明らかに 2014.5.2 基礎生物学研究所

## 計画研究 4: 吉崎悟朗

【論文】(全て査読あり ほか 1 報、計 17 報)

- I. Bar, A. Smith, E. Bubner, G. Yoshizaki, Y. Takeuchi, R. Yazawa, B. N. Chen, S. Cummins, \*A. Elizur: Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of Southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. **Reproduction, Fertility and Development** (2015) *in press*
- R. Yazawa, Y. Takeuchi, K. Satoh, Y. Machida, K. Amezawa, N. Kabeya, Y. Shimada, \*G. Yoshizaki: Eastern little tuna, *Euthynnus affinis* (Cantor, 1849) mature and reproduce within 1 year of rearing in land-based tanks. **Aquaculture Research** (2015) *in press*
- T. Okutsu, S. Shikina, T. Sakamoto, M. Mochizuki, and \*G. Yoshizaki: Production of YY super male using spermatogonial transplantation into female recipients. **Aquaculture** (2015) *in press*
- J.A. Fernandez, E.J. Bubner, Y. Takeuchi, \*G. Yoshizaki, T. Wang, S.F. Cummins, A. Elizur: Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. **Gen Comp Endocrinol** 213, 16-23 (2015)
- R. Yazawa, Y. Takeuchi, K. Amezawa, K. Sato, G. Iwata, N. Kabeya, \*G. Yoshizaki: GnRHa-induced spawning of the Eastern little tuna (*Euthynnus affinis*) in a 70-m<sup>3</sup> land-based tank. **Aquaculture** 442, 58-58 (2015)
- S. Boonanutanasarn, A. Jangprai, \*G. Yoshizaki: Characterization of proopiomelanocortin in the snakeskin gourami (*Trichopodus pectoralis*) and its expression in relation to food intake. **Domest Anim Endocrinol** 50, 1-13 (2015)
- N. Kabeya, Y. Takeuchi, R. Yazawa, Y. Haga, S. Satoh, \*G. Yoshizaki: Transgenic modification of the n-3 HUFA biosynthetic pathway in nibe croaker larvae: improved DPA (docosapentaenoic acid; 22:5n-3) production. **Aquacult Res** (2015) *in press*
- S. Kume, N. Katayama, K. Ichida, S. Hattori-Ihara, K. Nagasawa, \*G. Yoshizaki: Transgene manipulation in rainbow trout using Cre recombinase. **Fish Sci** 80, 767-773 (2014)
- M. Hayashi, M. Sato, Y. Nagasaka, S. Sadaie, S. Kobayashi and \*G. Yoshizaki: Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. **Biol Reprod** 91, 23 (2014) (領域内共同研究)
- W. Makkapan, \*G. Yoshizaki, M. Tashiro and W. Chotigeat: Expression profile of ribosomal protein L10a throughout gonadal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol Biochem** 40, 1069-1081 (2014)
- S. Nakajima, M. Hayashi, T. Kouguchi, K. Yamaguchi, M. Miwa and \*G. Yoshizaki: Expression patterns of gdnf and gfralpha1 in rainbow trout testis. **Gene Expr 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, 218-224 (2014)
- N. Kabeya, Y. Takeuchi, Y. Yamamoto, R. Yazawa, Y. Haga, S. Satoh, \*G. Yoshizaki: Modification of the n-3 HUFA biosynthetic pathway by transgenesis in a marine teleost, nibe croaker. **J Biotechnol** 172, 46-54 (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*. **Mar Biotechnol (NY)** 16, 309-320 (2013)
- R. Yazawa, Y. Takeuchi, T. Morita, M. Ishida and \*G. Yoshizaki: The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. **Mol Reprod Dev** 80, 871-880 (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*). **Mol Reprod Dev** 80, 763-773 (2013)
- SMSN. Lacerda, GMJ. Costa, PHA. Campos-Junior, TM. Segatelli, R. Yazawa, Y. Takeuchi, T. Morita, \*G. Yoshizaki, LR. França: Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiol Biochem** 39, 3-11 (2013)

【学会発表】(全て招待講演 他、招待講演 7 件(計 11 件) 他、学会発表 35 件、総計 46 件)

- G. Yoshizaki: "Mass production of sterile fish: how can we produce gametes from sterile fish?" The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Taipei, Taiwan, May 5, 2014
- G. Yoshizaki: "Transplantation of salmon germ cells into rainbow trout recipients: Can iteroparous trout repeatedly produce gametes derived from semelparous salmon?" 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Faro, Portugal, May 27, 2014
- G. Yoshizaki: "Production of donor-derived eggs and sperm by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka". 2nd Strategic Meeting for Medaka Research, Seville, Spain, April 11, 2014
- G. Yoshizaki: "Development of surrogate broodstock technology". SATREPS Annual Meeting 2014, Bangkok, Thailand, April 26, 2014

【受賞】(他、学会発表賞 3 件、計 5 件)

- 日本水産学会賞 吉崎悟朗 「代理親魚技法の構築とその応用に関する研究」日本水産学会春季大会. 東京. 2015.3.29
- 日本動物遺伝育種学会会長特別賞 片山直人, 久米佐知, ハットリ-伊原祥子, 定家咲子, 吉崎悟朗. ニジマス生殖細胞における高効率な遺伝子編集システムの開発 (ポスター発表). 日本動物遺伝育種学会第 14 回大会. 東京. 2013.10.12

【産業財産権など】濃縮された生着能をもつ未分化生殖細胞を用いた生殖細胞系列への分化誘導方法 国際出願番号 PCT/JP2015/001690 発明者: 林誠, 定家咲子, 吉崎悟朗, 矢澤良輔 出願人: 東京海洋大学 国際出願日: 2015.3.25 優先日: 2014.9.16

【情報発信】 ホームページ: <http://www2.kaiyodai.ac.jp/~goro/>

一般向け著書: 吉崎悟朗: サバからマグロが生まれる!? 岩波書店, 東京 (2014)

一般講演その他 (他高等学校出前授業 3 件、計 7 件)

吉崎悟朗: 日本の漁業の未来 マグロをサバに産ませる, 日本技術士会 CPD 中央講座 2015.2.21 東京

吉崎悟朗: サバからマグロは生まれるか? 「読売テクノ・フォーラム 2014 年度 秋のシンポジウム ゴールド・メダル賞 創設 20 周年を記念する講演会 科学の力で、世界を元気に」 2014.11.26 東京

吉崎悟朗: 未来の養殖～サバからマグロは生まれるか, 日本分子生物学会公開プレゼンテーション 2013.12.6 神戸

吉崎悟朗: 高校生対象の講義ライブ「生命工学のちからでクニマスを守る」夢ナビライブ 2014 2014.7.8 東京

報道: 2015.2.28 TBS ラジオ「東京エレクトロプレゼンツ 夢☆夢 Engine!」 「サバからマグロが生まれる! ?」

2015.2.8 NHK「サイエンス ZERO」 「絶滅動物」がよみがえる?」

2013.8.31 日本テレビ系「ウェークアップ! ぷらす」, 「マグロを食べないで!」の真相

2014.11.20 abcNEWS, Surrogate sushi: Japan biotech for bluefin tuna (他新聞報道等 6 件)

## 公募研究： 小林一也

【論文】(査読あり論文2報)

\*D. Okano, S. Ishida, S. Ishiguro, K. Kobayashi: Light and electron microscopic studies of intestinal epithelium in *Notoplana humilis* (Plathminthes, Polycladida): The contribution of mesodermal/gastrodermal neoblasts to intestinal regeneration. *Cell Tissue Res. in press*  
T. Maezawa, H. Tanaka, N. Nakagawa, M. Ono, M. Aoki, M. Matsumoto, T. Ishida, K. Horiike, \*K. Kobayashi: Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. *Mech Dev* 132, 69-78 (2014)

【学会発表】(他招待講演1件(計2件)、学会発表8件)

小林一也: プラナリアの生殖様式転換機構: 有性化因子による無性生殖から有性生殖への誘導について 第60回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 盛岡 2014.10.18 招待講演

Ishikawa, M., Maezawa, T., Kobayashi, K. "Tryptophan enhances the reproductive organs-specific expression level of an amino acid transporter homolog, *Dr-slc38A9* in the sexual worms of *Dugesia ryukyuensis*." The 1<sup>st</sup> Asian PlanNet Meeting, Hong Kong, May 9, 2014

【シンポジウム企画】松本緑・小林一也: 生殖戦略—無性生殖と有性生殖の生殖様式転換システム 日本動物学会 第86回新潟大会 2015.9.8(予定)

## 公募研究： 山元大輔

【論文】(全て査読あり(査読あり論文計7報)、他査読なし1報、総計8報)

K. I. Kimura, C. Sato, K. Yamamoto and \*D. Yamamoto: From the back or front: the courtship position is a matter of smell and sight in *Drosophila melanogaster* males. *J Neurogenet* 29, 18-22 (2015)

S. Kimura, Y. Sakakibara, K. Sato, M. Ote, H. Ito, M. Koganezawa and \*D. Yamamoto: The *Drosophila* Lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. *J Neurogenet* 29, 8-17 (2015)

S. Takayanagi, G. Toba, T. Lukacovich, M. Ote, K. Sato and \*D. Yamamoto: A fruitless upstream region that defines the species specificity in the male-specific muscle patterning in *Drosophila*. *J Neurogenet* 29, 23-29 (2015)

S. Kohatsu and \*D. Yamamoto: Visually induced initiation of *Drosophila* innate courtship-like following pursuit is mediated by central excitatory state. *Nat Commun* 6, 6457 (2015)

N. Hamada-Kawaguchi, Y. Nishida and \*D. Yamamoto: Btk29A-Mediated Tyrosine Phosphorylation of Armadillo/ $\beta$ -Catenin Promotes Ring Canal Growth in *Drosophila* Oogenesis. *PLoS One* 10, e0121484 (2015)

【著書】(他1報、計3報)

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

K. Sato and \*D. Yamamoto: An epigenetic switch of the brain sex as a basis of gendered behavior in *Drosophila*. *Adv Genet* 86, 45-63 Ed. Elsevier, Waltham, USA, 314pp. (Academic Press, London) (2014)

【学会発表】(他招待講演1件(招待講演計3件)、他学会発表28件、総計31件)

\*D. Yamamoto: Central regulation of male courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. Neural Circuits Controlling Sexual Behavior Symposium. Janelia farm research campus, Ashburn, GA, USA, 2014.11.9-12 招待講演

\*D. Yamamoto: Molecular neuroethology of *Drosophila* courtship: from the gene to behavior. Seminar at Ludwig Maximilian University, Munich, Germany, 2014.9.19-30 招待講演

【情報発信】ホームページ: [http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto_lab/)

一般講演: \*山元大輔: フェロモンと性行動—ハエとヒトは同じか、第15回アロマ・サイエンス・フォーラム2014. 東京. 2014.12.12.

一般向け著書: R.E. Kandel et al. (編), \*山元大輔 (訳): 第58章神経系の性分化. *カンデル 神経科学, メディカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京. 1696pp. (2014)

\*山元大輔: (2014) 広辞苑を3倍楽しむ. 岩波書店編集部(編), 岩波書店

\*山元大輔: 目覚めよ、パパの本能! 「産後夫婦のセックスレスは誰のせい?」 *AERA with Baby* No. 38, p. 124-125, 2014.10.15 発行, 朝日新聞出版

\*山元大輔: 職場のレインボーダイバーシティ. マイノリティは人類が強靱に生き残るカギ! ? *シティリビング* No.1530, 第3面, 2014.11.7 発行, サンケイリビング新聞

報道: 双子の遺伝子「エピジェネティクスが2人の運命を分ける」』書評, 公明新聞, 2014.10.27、読書欄

日経バイオテク 「オス同士の求愛行動は遺伝子と環境要因が関係、ショウジョウバエの実験で解明」

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20150309/183034/>

The Scientist (Y. Kate and \*D. Yamamoto: Unraveling the Female Fruit Fly Mating Circuit.)

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40410/title/Unraveling-the-Female-Fruit-Fly-Mating-Circuit/> (他2件)

## 公募研究： 金井克晃

【論文】(全て査読あり、計6報)

Y. Aiyama, N. Tsunekawa, K. Kishi, H. Kawasumi, H. Suzuki, M. Kanai-Azuma, M. Kurohmaru and \*Y. Kanai: Niche for GFR $\alpha$ 1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes. *Stem Cells* (2015) *in press*

M. Uemura, H. Igarashi, A. Ozawa, N. Tsunekawa, M. Kurohmaru, M. Kanai-Azuma and \*Y. Kanai: Fate mapping of gallbladder progenitors in posteroventral foregut endoderm of mouse early somite-stage embryos. *J Vet Med Sci* 77, 587-591 (2015)

M. Shinomura, K. Kishi, A. Tomita, H. Kawasumi, H. Kanezash, Y. Kuroda, N. Tsunekawa, A. Ozawa, Y. Aiyama, A. Yoneda, H. Suzuki, M. Saito, J.Y. Picard, K. Kohno, M. Kurohmaru, M. Kanai-Azuma and \*Y. Kanai : A novel AMH-Treck transgenic mouse

line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads. *Reproduction* 148, H1-9 (2014)

I. Nobuhisa, M. Osawa, M. Uemura, Y. Kishikawa, M. Anani, K. Harada, H. Takagi, K. Saito, M. Kanai-Azuma, Y. Kanai, A. Iwama A and \*T. Taga: Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. *Mol Cell Biol* 34, 1976-1990 (2014)

S. Rommelaere, V. Millet, T. P. Vu Manh, T. Gensollen, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, C. Bourges, B. Escalière, X. Du, Y. Xia, J. Imbert, B. Beutler, Y. Kanai, B. Malissen, M. Malissen, A. Tailleur, B. Staels, F. Galland and \*P. Naquet: Sox17 regulates liver lipid metabolism and adaptation to fasting. *PLoS One* 9, e104925 (2014)

M.S. Alam, S. Ohsako, Y. Kanai and \*M. Kurohmaru: Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochem* 116, 474-480 (2014)

【学会発表】(招待講演1件、他学会発表9件、総計11件)

金井克晃: “ほ乳類の性決定と性の可能性” 公開シンポジウム「脊椎動物の多様な性決定のしくみ」日本動物学会 第 67 回 関東支部大会 3.14.2015, 東京 招待講演

Yoshiakira Kanai: “Identification of the Sry-dependent and -independent molecular pathways in mouse testislogenesis”. The 7th international symposium on vertebrate sex determination. Hawaii, USA, April 13-17, 2015.

【情報発信】ホームページ: <http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/kaibo/>

### 公募研究: 鈴木敦

【論文】(査読あり 1 報、他査読なし論文 1 報、計 2 報)

\*A. Suzuki, Y. Niimi, Y. \*Saga Y.: 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】(他2回、計3回)

Suzuki, Y. Niimi, Z. Zhou, K. Shinmyozu, M. Kiso, Y. Saga: “Mouse Dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells. Cold Spring Harbor, USA, October 8, 2014 口頭発表

【受賞】(学会発表賞 1 件) Best Papers 賞 新見夕姫, 相賀裕美子, 鈴木敦: “マウス始原生殖細胞における Deadend1 の機能解析” 日本遺伝学会 第 86 回大会

### 公募研究: 岩森督子

【論文】(査読あり論文 1 報)

Dániel Varga, Judit Herédi, Zita Kánvási, Gyengéné Ruzska Marian, Zsolt Kis, Etsuro Ono, Naoki Iwamori, Tokuko Iwamori, Hiroki Takakuwa, László Vécsei, József Toldi, Levente Gellért: Systemic L-Kynurenine sulfate administration disrupts object recognition memory, alters open field behavior and decreases c-Fos immunopositivity in C57Bl/6 mice. *Front Behavioral Neurosci* (2015) *in press*

【学会発表】(他 2 件、計 3 件)

岩森督子, 岩森巨樹, 小野悦郎, Martin Matzuk 精巣特異的 ES(Ectoplasmic specialization)に局在する新規タンパク質の同定 第 107 回 日本繁殖生物学会大会 帯広 北海道 2014.8.21-24

### 公募研究: 中村 輝

【論文】(査読あり論文 2 報)

\*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)

【情報発信】

ホームページ: [http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/germline\\_development/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/germline_development/) <https://www.facebook.com/NakamuraLab>  
一般向け著書(翻訳): 中村 輝 Scott F. Gilbert 著 ギルバート発生生物学 (2013) 阿形清和, 高橋淑子 監訳 (メディカル・サイエンス・インターナショナル) 第 6 章

一般講演その他: JST 日本・アジア青少年サイエンス交流事業(さくらサイエンス)によるラオス保健科学大学模擬実験、11 名 八代中学模擬授業、2014.6.13、80 名 八代中学模擬授業、2015.6.19、80 名(予定)

プレスリリース: <http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np80.html>

### 公募研究: 加藤 譲

【学会発表】(他 1 件、計 2 件)

Yuzuru Kato, Yumiko Saga: Nanos2 antagonizes Dazl to achieve sexual differentiation of male germ cells in mouse embryos Germ cells Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells, Cold Spring Harbor, USA, Oct. 8, 2014

【情報発信】ホームページ: <http://www.nig.ac.jp/labs/MamDev/home-j.html>

一般向け行事: 国立遺伝学研究所公開講演会 2014.11.1 東京 国立遺伝学研究所一般公開 2015.4.4 三島

### 公募研究: 倉林麻貴 (白江麻貴)

【学会発表】(招待講演 2 件、他学会発表 1 件、総計 3 件)

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 2014.9.11 招待講演

M. Shirae-Kurabayashi, T. Sakuma, Y. Sasakura, A. Nakamura, T. Yamamoto, H. Sawada. “Molecular analyses of the dual mechanism for germ cell specification in the ascidian, *Ciona intestinalis*.” X Meeting Spanish Society for Developmental Biology, Madrid, October 13-15, 2014 招待講演

【情報発信】ホームページ: <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~SugashimaMBL/>

一般向け行事: 国際先端マリンバイオロジー実習(大学学部生対象) 2014.7.14-16

ひらめき☆ときめきサイエンス(小学校 5 年～高校3年生対象)「磯の生物を採集し受精発生のしくみを探る」 2014. 8.24

菅島オープンキャンパス 2014.10.25 他、高等学校、大学院臨海実習 6 件

### 公募研究: 鎌倉昌樹

【論文】(査読あり論文 1 報)

K. Yasuda, Y. Iwanaga, K. Ogawa, H. Mano, S. Ueno, S. Kimoto, M. Ohta, M. Kamakura, S. Ikushiro and \*T. Sakaki Human hepatic metabolism of the anti-osteoporosis drug eldelcalcitol involves sterol C4-methyl oxidase. *Pharm. Res. Perspectives* 3, e00120 (2015)

【学会発表】(招待講演 1 件、他学会発表 2 件(計 4 件)、総計 5 件)

M. Kamakura: Royalactin induces queen differentiation in honeybees. International congress of international union for the study for social insects. Australia, July 17, 2014 招待講演

鎌倉昌樹 Hr38 regulates developmental time in honeybee and fruit fly 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 金沢 2014. 6.6

鎌倉昌樹 昆虫の発生期間の制御因子の同定 第 86 回日本遺伝学会大会 長浜 2014. 9.18

【情報発信】一般講演その他: 鎌倉昌樹: GE ヘルスケア・ジャパンはじめてのライフサイエンス基礎講座「ミツバチのカーブ分化誘

## 【研究項目 A02】 in vitro で配偶子産生を再現する

### 計画研究 5: 林 克彦

【論文】(全て査読あり、他査読あり論文 2 報(査読あり論文計 10 報))

K. Kurimoto, Y. Yabuta, K. Hayashi, H. Ohta, H. Kiyonari, T. Mitani, Y. Moritoki, K. Kohri, H. Kimura, T. Yamamoto, Y. Katou, K. Shirahige, \*M. Saitou: Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 16, 517-32 (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, 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, \*M. Saitou: A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 27, 516-529 (2013)

\*R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, \*D. Kitamura: DNase  $\gamma$  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, \*JT Lee: Tsix RNA and the Germline Factor, PRDM14, Link X Reactivation and Stem Cell Reprogramming. *Mol 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 Mol Biol* 1074, 175-183 (2013)

F. Nakaki, K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, Y. Yabuta, \*M. Saitou: Induction of the 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 Protoc* 8, 1513-1524 (2013)

【学会発表】(すべて招待講演 他、招待講演 9 件(計14件)、学会発表総計 14 件)

K. Hayashi Germ cell differentiation from stem cells in mice 17th World Congress on IVF, Sep. 7. 2013. Tuins, Tunisia

K. Hayashi Making oocyte and babies from stem cells. The congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction, Apr. 4. 2014. Brisbane

K. Hayashi Prospects of gamete production from pluripotent stem cells The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology, May 23 2014. Leeuwarden

K. Hayashi Generation of eggs from mouse embryonic stem cells. Society of Reproduction and Fertility, Sep. 1-2. 2014. Edingborough

K. Hayashi Propagating generations of healthy mice using manufactured oocytes. Ovarian club V. Feb. 1. 2015 Hong Kong

【情報発信】ホームページ: <http://www.hgs.med.kyushu-u.ac.jp/>

一般講演その他: 「iPS 細胞から考える生命(いのち)へのまなざし」上廣倫理研究部門開設記念シンポジウム 2013.7.26 京都大学  
「未知への挑戦～iPS 細胞の研究に携わって～」浦和西高等学校 80 周年記念式典 埼玉 2014.11.8

報道: ESから効率的に生殖細胞 京大・誘導遺伝子を発見 2014.8.5 京都新聞

他、朝日新聞、産経新聞、中日新聞、日刊工業新聞、日本経済新聞、毎日新聞、読売新聞 全て 2015.8.5

### 計画研究 6: 小川毅彦

【論文】(査読あり 6 報、他査読なし 3 報、総計 9 報)

T. Sato, K. Katagiri, K. Kojima, M. Komeya, M. Yao, \*T. Ogawa. In vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. *PLoS One* accepted for publication

\*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* July 18, (2015)

M. Komeya, \*T. Ogawa: Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. *Asian J Androl* [Epub ahead of print] May 18, (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 (2014)

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, 1-6 (2013)

【書籍】

T. Ogawa: In vitro production of functional sperm from neonatal mouse testes, Chapter 4 in “Stem Cells in Reproductive Medicine, 3<sup>rd</sup> edition” edited by Carlos Simon, Antonio Pellicer, & Renee Reijo Pera. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS 2013

【学会発表】(他招待講演 3 件(招待講演計 7 件)、その他学会発表 6 件、総計 13 件)

T. Ogawa: “In Vitro Spermatogenesis using Organ Culture Systems” IFFS/JSRM, Yokohama. Keynote Lecture, April 29, 2015

小川毅彦: 「ex vivo culture による体外精子形成」第 10 回日本生殖再生医学会 京都 記念講演 2015.3.22

T. Ogawa: “In vitro maturation of sperm”, 59th Annual meeting of Canadian Fertility and Andrology Society, Victoria, Canada. September 28, 2013 招待講演

T. Ogawa: “In vitro spermatogenesis using an organ culture method”. 10th International Congress of Andrology, Melbourne, Australia, February 25, 2013 招待講演

【受賞】第 10 回日本生殖再生医学会学術奨励賞 佐藤卓也「器官培養による成熟マウス精巢の in vitro 精子形成」京都 2015.3.22  
第 103 回日本泌尿器科学会総会賞 古目谷暢、横西哲広、佐藤卓也、片桐久美子、木村啓志、藤井輝夫、矢尾正祐、小川毅彦:「生体内環境を疑似的に再現した次世代型 in vitro 精子形成システムの開発」金沢 2015.4.18

【情報発信】ホームページ: <http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/proteome/ogawa/index.html>

一般向け行事: 理化学研究所・横浜市立大学 一般公開 2013.9.28, 2014.9.6 横浜市鶴見キャンパス

### 計画研究 7: 尾畑やよい／平尾雄二

【論文】(全て査読あり、査読あり論文計 7 報)

\*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. 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) **Outstanding Paper Award**
- \*Y. Hirao and T. Miyano: In vitro oocyte development in large animals. *J Mamm Ova Res* 31, 79-85 (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. 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)

#### 【書籍】

- 尾畑やよい「発生学とエピジェネティクス」哺乳動物の発生工学 佐藤英明・河野友宏・内藤邦彦・小倉淳郎編 朝倉書店 pp13-26 (2014)
- 宮野隆、平尾雄二「卵子の IVGMFC」哺乳動物の発生工学 佐藤英明・河野友宏・内藤邦彦・小倉淳郎編朝倉書店 pp27-39 (2014)
- 尾畑やよい「遺伝的性」繁殖生物学 日本繁殖生物学会編 株式会社インターズー出版 pp134-147 (2013)

#### 【学会発表】(他招待講演 1 件 (招待講演計 5 件)、他学会発表 9 件、総計 14 件)

- 尾畑やよい、平尾雄二: *in vitro* における機能的卵母細胞の作出. 第 36 回日本炎症・再生医学会シンポジウム 東京 2015.7.21-22
- 尾畑やよい: *in vitro* における卵母細胞の成長・成熟. 第 60 回日本生殖医学会シンポジウム 横浜 2015.4.27-2
- 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 2013.8.8-9
- Y. Hirao: In vitro growing immature porcine oocytes. International Symposium on Cutting-Edge Reproductive Technologies and Perspectives for their Usage in Swine. Tainan, Taiwan, June 5, 2014

- 【シンポジウム企画】第 108 回日本繁殖生物学会シンポジウム「*In vitro* における生殖細胞形成研究の最新トピックス」企画:平尾雄二、吉崎悟朗、講演:小川毅彦、林克彦、尾畑やよい、松居靖久 宮崎大学 2015.9.17-20

#### 【情報発信】出張講義: 尾畑やよい「精子と卵子のはなし」埼玉県立和光国際高等学校 2014.11.7 35 人

- 尾畑やよい「卵子と精子と発生のはなし」2) 東京都立豊多摩高等学校 2013.7.9 20 人

### 公募研究: 河村和弘

#### 【論文】(すべて査読あり 4 報、他査読なし 5 報、計 9 報)

- N. Suzuki, N. Yoshioka, S. Takae, Y. Sugishita, M. Tamura, S. Hashimoto, Y. Morimoto, \*K. Kawamura: Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary. *Hum Reprod* 30, 608-615 (2015)
- AJ. Hsueh, K. Kawamura, Y. Cheng, BC. Fauser: Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev* 36, 1-24 (2015)
- Y. Cheng, Y. Feng, L. Jansson, Y. Sato, M. Deguchi, K. Kawamura, AJ. Hsueh: Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB J* fj.14: 267856 (2015)
- 河村和弘: 卵巣の老化と不妊治療: 卵胞活性化療法 (IVA: in vitro maturation) 基礎老化研究 39, 35-39 (2015)

#### 【学会発表】(他招待講演 10 件 (計 14 件)、他学会発表 13 件、総計 27 件)

- Kawamura K, "In vitro activation as a tool for treating infertility related to premature ovarian failure". The 7th World Congress on Mild Approaches in Assisted Reproduction. Sydney, Australia, September 10-12, 2014 招待講演
- Kawamura K, "New infertility treatments of patients with primary ovarian insufficiency (POI)". Ovarian Follicles from Basic Science to Clinical Application, Palo Alto, USA, November 9, 2014 招待講演
- Kawamura K, "New infertility treatments of patients with primary ovarian insufficiency". The 6th International IVI Congress-Reproductive Medicine and Beyond. Alicante, Spain, April 23-25, 2015 招待講演
- Kawamura K, "Treating infertile premature ovarian insufficiency (POI) patients: ovarian fragmentation followed by Akt stimulation treatment in vitro and autotransplantation (in vitro activation - IVA)". The 21th COGI Innovation in Reproductive Medicine. Frankfurt, May 14-16, 2015 招待講演

#### 【受賞】(学会発表賞 5 件) 第 55 回日本卵子学会 論文賞、第 32 回日本受精着床学会 世界体外受精会議記念賞、第 7 回 聖マリアンナ医科大学 前田賞、第 10 回 日本生殖再生医学会 学術奨励賞、第 56 回日本卵子学会 学術奨励賞

#### 【情報発信】ホームページ: <http://www.marianna-u.ac.jp/newobgyn/>

- 一般講演その他: 河村和弘, "女性 100 人に 1 人! 意外と知らない「早発閉経」~私と、家族のために、今知っておきたいこと~". 日本科学未来館サイエンストーク 東京 August 10, 2014

#### 報道: <育てよう! 科学魂> 生殖医療知ってほしい 東京新聞 2014.10.28

- <http://www.tokyo-np.co.jp/article/education/nie/CK2014102802000176.html>  
<http://www.miraikan.jst.go.jp/m/event/1407151617017.html>

## 6. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

本新学術領域研究では、2研究項目（A01とA02）を設定し、7名の計画研究代表者と10名の公募研究代表者がそれぞれの研究を推進している。これまでに、3回の領域会議を開催し、密な議論を行ってきた。その結果、下表にまとめたように、29件に上る研究連携が行なわれている。

表1. 計画研究／公募研究間の連携状況

計画研究／公募研究 代表者			情報／技術等の提供元																	
			計画研究						公募研究											
			項目A01				項目A02		項目A01						A02					
			小林 橋	松居	吉田	吉崎	林	小川	尾畑	小林 一也	山元	金井	鈴木	岩森	中村	加藤	倉林	鎌倉	河村	
情報 ／ 技術 等 の 提 供 先	計画 研究	項目 A01	小林 <sub>橋</sub>				情報						技術							
			松居	技術			技術		技術											
			吉田	技術			技術	技術					技術							
		吉崎	技術		情報															
		項目 A02	林	情報				技術												
			小川		情報			情報												
		尾畑				情報		技術												
公募 研究	項目 A01	小林 <sub>一也</sub>	技術	情報																
		山元												検体						
		金井				技術														
		鈴木			検体	検体														
		岩森				情報														
		中村																		
		加藤	技術											技術						
		倉林																		
		鎌倉	情報																	
		A02	河村					技術		技術										

技術：数理的解析等の技術の供与、セルソーターを用いて細胞を分取するなどの技術供与

情報：未発表の研究成果などの供与

検体：解析に用いる細胞や生物の系統等の検体の供与

本新学術領域がユニークである点の一つは、メカニズム探究型の基礎研究（主として【A01】）と応用志向型の研究（主として【A02】）の研究者が集まっていることである。両者はお互いに補いあうことで成果を挙げており、今後さらにそれは加速してゆくと考える。

その連携は、遺伝子ネットワーク解析のための細胞検体の授受や DNA シーケンシング・大量データの解析、数理生物学的手法の技術供与などが主体である。さらに、それに留まらず、多くの場合秘密にしてしまうような細胞培養技術の詳細に関しても共有し、時に実地指導にて伝え合い、お互いの研究の発展がなされているといったレベルにも至っている。

具体例としては、小林 G・松居 G（計画研究1と2）と林 G（計画研究5）との連携が挙げられる。小林 G は、*ovo* ホモログの機能をマウスにおいて明らかにすることを目指しているが、林 G と共同して、*ovo* をノックアウトした ES 細胞から PGC を分化させる *in vitro* 系において *ovo* ホモログの機能解析をおこなっている。通常は、ノックアウトマウスを用い、*in vivo* で解析するが、上記の *in vitro* 系を用いる方法だ

と解析にかかる労力や時間等を短縮することができる。また、*ovo* をノックアウトした時にどのような遺伝子発現の変化が引き起こされるかに関しても、この系を用いて解析する予定である。このような *in vitro* 系の利用により、*ovo* だけでなく他の転写因子の機能解析も容易に行える研究基盤ができた。

また、林 G は、松居 G が目指す生殖細胞系列での遺伝子ネットワーク解析用にこの *in vitro* の系を提供し、研究が進行しつつある。また、尾畑〈計画研究 7〉は、分担研究者の平尾と綿密な議論を積み重ね、平尾の卵培養に関するこれまでの実績と経験を自らの実験系に応用した結果、*in vitro* での PGC からの成熟卵産生に成功した。このような成果は、単独の研究者では達成しがたいことが共同研究によってなし得た顕著な例である。

さらに、この *in vitro* 系を開発した尾畑らと連携して、林は ES 細胞からの *in vitro* 卵産生に成功している。これら *in vitro* 系により、生体内で進行するために容易に解析できなかった卵形成／卵成熟を制御するメカニズムの解明が加速されるとともに、応用面においても波及効果は計り知れない。このようなブレークスルーの連鎖は当新学術領域ならではの成果だと自負する。

以上は、いずれも計画研究の代表者並びに分担研究者間での連携であり、表 1 から読み取れるように、研究者間の連携は、主として計画研究代表を中心に進んでいる。しかし、公募研究も 2 年目を迎え、研究連携は急速に進んでいる。特に、第 3 回の領域会議以降は公募研究の代表者との交流が一段と深まり、連携に弾みがついた感がある。例えば、岩森 G の生殖細胞間架橋 (ICB) に関する研究は、吉田ら〈計画研究 3〉が提案している精子幹細胞の振舞いと分子レベルで密接に関連し、両者の共同研究に発展している。また、河村〈公募研究 A02〉は産婦人科・臨床医という立場にあり、尾畑・林らの成果をヒト卵形成に応用すべく、いち早くその技術提供を受けており、今後の成果が期待される。

このように本領域では、2 つの研究項目である A01 と A02 の間、および計画研究と公募研究の間の連携が順調に進行している。非常に異なるバックグラウンドを持つ研究者が協力／連携し合い研究を遂行する研究体制が整い、かつ実際に進行しており、これら共同研究から得られた研究成果が論文発表されると期待される。現在までのところ領域内における連携による研究の成果として 3 報の論文が発表されている（研究成果の公表の状況を参照）。



## 7. 若手研究者の育成に係る取組状況（1ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

本研究領域では、若手／女性研究者育成に関して以下の取組を行ってきた。

### 1. 解析技術支援に若手研究者が深く関わる

本研究領域では、数理生物学的な解析を導入するため、このような解析手法を専門とする小林Gの佐藤および重信が共同研究を行い解析技術の支援を行ってきた。このような共同研究に若手研究者を積極的に参加させ、新たな解析技術獲得を行えるように配慮してきた。これにより、実験生物学と数理生物学のスキルを共に有する次世代の若手研究者を育成する。

### 2. 公募研究

若手／女性研究者のための特別な枠は設けていなかったが、業績はまだ少ないものの独創的かつ萌芽的な研究を行っている若手／女性研究者の研究課題を採択することができた。

### 3. 本領域に関わる若手研究者が発表できる領域会議

本研究領域では、領域会議を年2回開催し、そのうち1回（Formalな領域会議）は、計画／公募研究の研究代表者が研究成果を取りまとめて発表する場である。もう1回（Informalな領域会議）は、計画／公募研究に関わるスタッフ、ポスドク、大学院生などの若手研究者が自身の研究成果について発表する場としている。これにより、若手研究者の研究成果を共有するとともに、若手研究者間だけでなく、若手とシニア研究者間の議論も活発となり、スタッフやポスドクとしての移動など若手研究者の人的流動性を促進することができる。今後、Informal 領域会議において、flash talkやポスターなども検討している。

### 4. 若手研究会開催支援

計画研究や公募研究の研究代表者や分担者ととともに、関連分野の研究者、ポスドク、大学院生が参加する若手主体の研究会の開催支援を行ってきた。本研究領域の枠にとらわれない研究者の交流を促し、若手研究者の育成を目的としている。これまでに2回開催支援を行った。

### 5. 若手海外派遣

本申請領域の研究成果の発表と情報の収集のために、海外研究集会への派遣を行う。特に、大学院生やポスドクなど若手／女性研究者へのサポートに重点を置き、海外留学や海外との共同研究を促す助けとする。これまでに、2件の派遣を行った。

### 6. 女性研究者支援

女性研究者支援として、領域会議において要望に応じて託児サービスが受けられるよう環境を整えその費用を総括班から支出する体制をとった。これまでに1件の利用があり、潜在的には今後もさらに多くの利用が見込まれる。

### 7. 人的流動性の促進

優秀な若手研究者を育成するためには、上記のような取り組みとともに、ポストの確保や人的流動性が必須である。本研究領域内では、以下のように、ポストを確保するとともに、アカデミックポストへの就職など人的流動性を高めるように努めてきた。

まず、計画研究の経費で、特任助教等 4名、ポスドクや研究員等 11名のポストを確保し、若手が自身の研究を行える環境を整備した。人的流動性として、准教授であった計画研究5の代表者・林<sup>克彦</sup>が九州大学教授に、計画研究3の連携研究者・原助教が東北大学准教授に、公募研究に関わっていた恒川助教が日本大学教授に、計画研究4のポスドクであった林<sup>誠</sup>が筑波大学助教（計画研究1・連携研究者）に就いたことは特筆できる。また、7月より計画研究ポスドク1名が国立大学助教に就く予定である。さらに、大学院生7名が博士号を取得するとともに、セカンド・ポスドクも含め、6名が新たな領域内外のポスドクのポストを得た。うち1名はJSPSの RPD、1名はJSPS特別研究員である。さらに、3名が民間企業等の研究職を得ることができた。

## 8. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

### 設備などの活用状況

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

### 研究費の効果的な使用

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

次世代シーケンサーを用いた解析に関して、基礎生物学研究所・生物機能解析センターの次世代シーケンサー、あるいは外部委託（小林Gの佐藤が窓口となりミネソタ大学の解析センター等を利用することでコストを基礎生物学研究所並みに抑えることができる）により大規模データを取得し、小林Gの重信および佐藤が解析をサポートする体制をとっている。このような支援体制だと、研究者が所属機関の次世代シーケンサーを使わずに一箇所に集中してデータ取得を行うことにより、技術的に安定し失敗が無くかつ少ないマンパワーで対費用効果が高い良質な研究結果を出すことができる。これまでに、吉田G、松居G、吉崎G、加藤Gの4件の解析支援を行ったが（進行中のものも含める）、そのうち吉田G、吉崎G、松居Gでは、吉田がセンター長を務めている基礎生物学研究所・生物機能解析センターの次世代シーケンサーを用いた。基礎生物学研究所の機器利用はコストが低く、限られた予算の中で多くのゲノム修飾等を同定することができた。また、得られた結果は高品質で再現性が高いものであった。またその費用は総括班から支払われているため運用上手続きが簡素化され効率的であった。吉田G分担者大保の所属機関にも共用の次世代シーケンサーがあるが旧式でありコストが高く、より多くのリード数が必要な場合はコストが実験の限界となる。以上のように、一本化して解析支援を行う方式は、研究費の使用において、非常に効率的と言える。このような費用を総括班の非常に限られた予算から捻出するために、人件費などを大幅にカットし、解析支援のために物品費に回した。

## 9. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

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

### 長濱嘉孝（愛媛大学・社会連携推進機構・特任教授）

本研究領域は、動物の配偶子産生システムの制御機構について、1) 動物種を超えて共通なメカニズムを明らかにするとともに、2) 配偶子を産生する新規培養系の開発をも目指すものである。動物が安定して子孫を残すためには配偶子の元となる始原生殖細胞（PGC）を作り出すこと、PGCに由来する配偶子幹細胞（GSC）の働きにより配偶子を継続して生産することが不可欠である。1) の計画研究は、領域代表者を筆頭として、PGCおよびGSCの分野ですでに十分な実績がある研究者で構成され、公募研究も含め有機的連携により領域研究がうまく進展している。これまでに、ショウジョウバエやマウスなどを用いた、PGC形成を制御する共通遺伝子に関する先駆的成果、マウス精巣における幹細胞の挙動に関する細胞ダイナミクスの新規記載など、順調に研究成果が上がっている。また、公募研究についても、個々の研究において重要な成果あるいは研究基盤の確立に繋がる成果を挙げており、今後、計画研究の成果と統合されることにより、動物における配偶子産生の共通原理の解明に大きく貢献が期待される。さらに、2) の新規培養系の開発に関する計画研究における研究の進展は特に目覚ましく、マウスを対象としてPGCから卵を産生する*in vitro*系を構築することに世界に先駆け成功した。この成果は当初計画より2年近く前倒しで達成させたことになり、きわめて高く評価される。この研究ではまた、未熟な卵巣組織片を凍結保存し、解凍後に*in vitro*卵産生が可能であることも確認しているという。これらの画期的成功は、本領域における、1) の研究進展に有益な実験系を提供するのみならず、畜産、水産業をはじめとして生殖医療などの新たな技術開発にも大きく貢献することが期待される。したがって、次回の公募研究の採択にあたっては、産業上で有用な動物を対象とした研究にも注目する必要がある。このように、本研究領域は、領域代表者の強力なリーダーシップのもとに、基礎と応用分野の研究者が分野横断的に連携することにより研究は順調に進展しており、今後そのスピードはさらに加速されるものと期待される。

### 山本正幸（基礎生物学研究所・所長）

本新学術領域研究は、配偶子産生システムの制御機構を解明することを目的としている。ショウジョウバエ、マウスを始めとする種々の動物での卵形成、精子形成の分子機構を解析してその共通原理を探り（研究項目A01）、また試験管内培養系で配偶子の産生を再現するという挑戦的な課題（研究項目A02）に取り組んでいる。前者の項目では、ショウジョウバエの始原生殖細胞（PGC）で細胞自律的に機能する転写因子Ovoのマウスホモログの解析を進めるなど、領域内の協力による成果が表れ始めている。またマウスの精子形成における幹細胞の同定では、単一の細胞を幹細胞とするこれまでの定説を覆し、相互の間を行き来するグループの細胞が幹細胞機能を担っていることを明らかにした。さらに後者の項目では、始原生殖細胞から受精能力のある成熟卵を体外培養により作出することに成功している。このような代表例以外にも、領域全体として研究は順調に進んでいると判断され、研究の進捗によって先端的な成果が得られることが十分期待される。ただし、精子幹細胞の例などを除いて、まだ論文発表に至らない研究結果も多く、得られた成果を学術的に確立されたものとするためにも、今後の論文発表は重要である。また、技術・情報・実験材料を介して研究課題間の連携・協力を促進しようとする取り組みが進められていることは高く評価できる。若手研究者の育成や、女性研究者の支援についても取り組まれているが、これらについてはさらなる充実を望みたい。

### 諸橋憲一郎（九州大学・医学研究院・教授）

本研究領域は、次世代を残すために必要な始原生殖細胞と、この細胞に由来する配偶子幹細胞の産生システムを明らかにし、ここで得られた成果をもとに実際に配偶子を産生する人為的な系の構築を目指している。領域を構成するメンバーは、既に十分な成果を挙げており、本領域研究を実施するにあたっての基盤は整っていると思われる。

#### 1、研究成果

Ovoの解析結果がまだ論文として発表されていないのは残念であるが、評価書を読む限り非常に興味深い展開となっている。我が国独自の発見であり、今後この領域からの成果の発信を期待したい。遺伝子ネットワークの総体を描くには相応の時間を要することは想像に難くないので、中間評価の時期にその成果を期待するものではないが、遺伝子ネットワークはトランスクリプトームの解析で明らかになるのであろうか。トランスクリプトームの変化は表現型として捉えるべきで、メカニズムの解析にはChIP-sequenceのデータが重層されることで必要ではないかと思われる。また、マイクロ流路を用いた*in vitro*の精子産生系、ならびに始原生殖細胞から成熟卵の*in vitro*構築系の確立は高く評価されるべき、興

味深い成果である。全体として今後の論文発表が楽しみであるとともに、領域研究の成果としての、新たなコンセプト発信に期待したい。

## 2、連携研究

基礎と応用が領域研究の後半に噛み合ってくる気配を感じる。

領域研究の最も重要な使命は、個々の研究の成果を超えた理解の深化であり、その上で新たなパラダイムを創出するようなコンセプトの発信であると思っている。これは単に連携（共同）研究を行うことで達成できるものではなく、領域研究に参画するメンバー間の信頼関係に基づく領域の成熟度が求められる。本領域は、領域代表のもとに成熟したグループが形成されつつあると感じる。

## 3、コメントへの対応

申請の審査を行う委員会からのコメントは重要であるものが多いと思われるが、全てを取り込んでしまうと、当初の領域の方向性が変わってくる場合もあるので、領域の目的の達成のために必要な指摘を精査して取り込むことが重要だと思われる。例えば、遺伝子ネットワークの解析に数理的解析を導入することのコメントが見受けられるが、ネットワークを描くために数理的解析を行うには変動するパラメーターの数が多すぎるのではないだろうか。慎重に対応すべきかもしれない。

## 4、若手支援も相応になされている。

### 阿形清和（京都大学大学院・理学研究科生物科学専攻・教授）

生殖細胞系列研究については、世界レベルで見た時、日本はほぼ独壇場とも言える状態を創出している。さらに、マウスで ES/iPS 細胞から機能的な精子や卵が作られるようになった状況下で組まれた本研究班は、研究開始時から高いハードルが設けられている形になっている。しかし、そんな状況下においても、単なる応用面に走るのではなく、地に足をつけて、細胞レベル・遺伝子レベルで生殖細胞研究のフロント研究を展開することを行っているのが本研究班の真骨頂と言える部分ではないだろうか。要は、急がば回れ方式で、サイエンティフィックに配偶子を産生するための遺伝子プログラムを明らかにすることで、将来的に確実に *in vitro* で機能的な生殖細胞を作ることを実現させる—ことを目指していると個人的には思っていた。しかし、そんな思いを吹っ飛ばすように、論文としては未発表であるが、班会議においてすでに *in vitro* で機能的な卵を作ること成功したという報告がなされた。驚きの結果であるが、PGC が分子レベルにおいてもきちっと性格づけられて作られている点がポイントとなって成功に至っている。すなわち、やはり科学的な裏付けがあつての成功という理解である。当面の成功に気を許すことなく、今後とも、きちっとしたサイエンスを展開してくれることを期待している。

### 岡野栄之（慶応義塾大学医学部生理学教室・教授）

新学術領域研究としては、個別研究として非常に質の高い研究成果が生み出されているものの、それだけではなく、領域代表者の強い指導力のもとで有機的共同研究や領域内での成果の共有等をさらに推進することで、「動物における配偶子産生システム」を統合的に理解するための鍵となる発見がなされるべきものと考えている。この点をしっかりアピール出来るような具体的な事例を示すことが重要であろう。例えば、本新学術領域の総力を上げて、性差を産み出す生殖巣との共培養や、小林のショウジョウバエにおける性差決定ネットワークの成果を基に、性差を有する PGC の形成を再現できる培養系の構築が可能になれば、素晴らしいものと考えている。今の所は、個別にしか研究の成果が上がっていないように見えるので、益々の共同体制の強化を期待したい。

### 今井 裕（京都大学大学院・農学研究科応用生物科学専攻・教授）

本研究班は、動物種を超えて生殖細胞の生産システムを支えている基本的な機構を明らかにし、最終的には体外での生殖細胞生産に結び付けようとする意欲的な研究であつて、そこから得られる成果は生物の普遍性を考える上で極めて興味深い。研究班を構成しているチームはやや総花的で、いまだ相互の研究交流によって得られた成果は必ずしも多くはないが、全体的には質量ともに多くの成果が上がってきており、今後横断的な研究交流によって、さらに研究成果が挙がると期待できる。

中間段階での主要な成果としては、マウスとショウジョウバエの始原生殖細胞の形成に係わる共通分子 (Ovo) が見出されたことで、今後それぞれの動物種でこの分子を中心としてシェアされる生殖細胞産生機構の解明が待たれる。また、マウス精巣内ニッチの幹細胞の自己増殖と持続的な精細胞形成を維持する為の機構を体内の系も取り入れながら進めた意欲的な研究が印象深い。もう一つのトピックスは、卵巣組織の体外培養による卵成熟の達成と、得られた成熟卵子からの個体生産を極めて高い効率で成功させたことである。これによって、卵成熟一連の過程を体外で再現できる実験系が構築されたことになり、本学術領域の大きな目標を達成する足がかりが得られたとあってよい。他の研究グループと研究交流によって、この実験系を利用した体外における卵成熟のメカニズムの解明を進める必要がある。

## 10. 今後の研究領域の推進方策（2ページ程度）

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

本領域研究は、計画研究や公募研究に関して進度に差こそあれ順調に進んでいると判断している。特にA02の計画研究における研究の進展は目覚しく、*in vitro*で配偶子産生を再現できる技術が現実のものとなっている。このような現状を踏まえると、領域研究を推進する上で問題点は特段見いだせない。しかし、この研究領域をより強化し、国内外での評価を一層高めるために、下記の点を考慮して今後の研究領域の運営を行う。

### 領域内共同研究による研究力の強化

本研究領域は、参加する研究者によって得られた独創的な研究成果に基づき、動物の配偶子産生システム制御機構を解明することを目的としてスタートした。したがって、様々な動物種を対象に、様々なアプローチで、様々なアウトプットを目的に研究を進めている研究者が有機的につながることで、質の高い共同研究グループを形成することができる。現在、研究領域内の共同研究を基盤として各研究が進められているが、後半の研究期間において共同研究をより強化し、それを軸として計画研究や公募研究の成果をまとめて「動物における配偶子産生の共通原理の解明」を達成できるよう努力する。

### 領域外との国際共同研究

上記のように本研究領域は様々なバックグラウンドを持つ異なる分野の研究者が連携することにより質の高い共同研究グループを形成している。これは、世界的に見ても注目されており、研究成果も国際コミュニティで高く評価されている。今後一層、質の高い研究成果を国際的に発信することで、国際社会における我が国の存在感を向上させたい。下記のように、現在も質の高い国際共同研究を行っているが、これをより一層押し進めて、国際共同研究を推進する。

計画研究3(吉田 G)が行っている国際共同研究では、基礎生物学研究所で取得したマウス生殖細胞に関する実験結果を、Benjamin Simons 教授（英国ケンブリッジ大学物理学）の研究室に送って解析し、お互いに議論しながら論文を執筆している。これをさらに進め、データを取得した研究者自らが Simons 研究室に滞在してデータ解析を行うなど、人的交流の一層の推進に努める。これは、本研究をより効率的かつ高いレベルで推進するのみならず、若手研究者の育成や国際ネットワークの構築のために大変有用である。

公募研究(河村 G):ヒト卵巣に存在する卵子幹細胞から卵子の分化誘導に初めて成功した Till J 博士を指導した教授である Hsueh AJ（米国 Stanford 大学）と、卵子幹細胞の存在を否定するスウェーデン Liu K（Gothenburg 大学）のもとで、河村 G が作成した早発閉経患者の卵巣から卵子を再生するためプロトコルを用いて再現実験のための共同研究を行い、その結果をプロトコルにフィードバックする。

公募研究(鎌倉 G):女王蜂、働き蜂の卵巣構造や生殖機能を明らかにするためには、成虫における RNAi 技術や人工授精技術が不可欠である。成虫の卵巣における dsRNA のインジェクション技術は de Graaf (Ghent University, Belgium) と、人工授精技術は高橋純一博士（京都産業大学）と連携を図って研究を進める。

公募研究(加藤 G)では、免疫染色画像を定量的に解析するため、画像解析のエキスパートである勝木健雄 (University of California, San Diego, Kavli Institute for Brain and Mind) と共同研究を行う予定である。

そのほか、現在のところ連携がされていない進化生物学（分子系統）のような知識をもった研究者との共同研究も視野に入れ、今後の一層の組織強化に努める。

#### **国際シンポジウムの開催**

最終年度に国際シンポジウムを開催する。本研究領域において得られた研究成果を内外の関連分野研究者に発信し、本申請領域終了後の研究の新たな方向を考える機会とする。

#### **公募研究**

現在の研究組織では、研究項目 A02：「in vitro で配偶子産生を再現する」の公募研究は河村 G のみである。次期の公募研究では、畜産や水産等の産業上で有用な動物を用いて、in vitro において配偶子産生を再現する培養系を開発／改良する研究、あるいは計画研究 5、6、7 と協力して、培養系を改良／開発できる研究を取り込むべきと考える。

#### **本研究領域における技術支援**

本研究領域では、数理生物学的な解析を導入するため、小林 G の佐藤および重信と共同研究を行い解析技術の支援を行ってきた。このような共同研究に若手研究者を積極的に参加させ、新たな解析技術獲得を行えるように配慮してきた。この支援に関して、領域内の要望が多く、今後とも継続する予定である。