

平成25年度 特定領域研究 事後評価結果（所見）

研究領域名

生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク

研究期間

平成19年度～平成24年度

領域代表者

佐々木 裕之（九州大学・生体防御医学研究所・教授）

研究領域の概要

生殖細胞系列は次世代へゲノムを伝達する重要な役割を果たす。この為、初期胚における体細胞系列と生殖系列への運命決定、雌雄生殖系列の特徴づけ、減数分裂と卵子・精子形成、受精と胚発生の開始というサイクルが連綿と繰り返される。このサイクルを通してゲノムのエピジェネティックな修飾状態（エピゲノム）は大きく変動し、これが再プログラム化と深く結びついて生殖系列や受精卵の発生能を調節することが分かってきた。本特定領域研究は、生殖系列のサイクル及び発生能の再プログラム化を調節する遺伝子やエピゲノムの制御ネットワークを解明し、生殖医療や発生工学技術への基盤提供を図る。

領域代表者からの報告

1. 研究領域の目的及び意義

【領域設定の目的】

生殖細胞系列は生物個体をかたち作るさまざまな細胞のなかで唯一次世代へ遺伝情報を伝達する。そのため各世代において、体細胞系列と生殖系列への運命決定、雌雄生殖細胞の特徴づけ、減数分裂と卵子・精子形成、受精と胚発生の開始が起き、このサイクルが連綿と繰り返される。本特定領域研究は、哺乳類の生命の糸を紡ぐ世代サイクルの分子基盤である(1)生殖系列のエピゲノムの制御ネットワークを解明し、(2)培養下での生殖細胞分化系の確立、(3)発生能を司る再プログラム化の実体解明を行い、生殖系列の世代サイクルを包括的に理解することを目的とした。以上をもって、クローン技術をはじめとする発生工学技術及び生殖補助医療の改善への基礎的知見の集積を図った。

【学術的背景】

本領域が発足する以前の我が国の哺乳動物の生殖細胞系列に関する研究は、特定領域研究(B)「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」(平成11-14年度、領域代表者：中辻憲夫)及び特定領域研究「生殖細胞の発生プログラム・再プログラム化とエピジェネティクス」(平成15-19年度、領域代表者：中辻憲夫)によって推進されてきた。その間、我が国の生殖細胞研究は長足の進歩を遂げ、とくに後者の特定領域研究においては、生殖系列の初期運命決定因子Blimp1の発見により長年ブラックボックスであった始原生殖細胞(PGC)の分化過程を分子のことで記述できるようになった。すなわち哺乳類の生殖系列サイクルの全貌を分子的に見通すことが可能になった。また、そのサイクルのほぼ全てのステップでエピジェネティクス制御因子が重要な働きを果たすこと、エピゲノムの再プログラム化が発生能の鍵となることが明らかになった。これはエピジェネティクスの内容を含む論文数の急激な増大として表れた。さらに、DNAメチル化とヒストン修飾の連動、生殖細胞の小分子RNAによるDNAメチル化の誘導が発見される等、新たな制御ネットワークの存在が浮き彫りになりつつあった。そこで本領域では、(1)生殖系列のエピゲノム制御ネットワークの解明を新たな共通テーマとして掲げ、その成果を生かしつつ(2)培養下での生殖細胞分化系の確立、(3)発生能を司る再プログラム化の実体解明を行い、生殖系列の世代サイクルを包括的に理解することを目指した。

【具体的な研究項目】

上記の目的を達成するため、生殖系列の世代サイクルを時系列により3つに区切り、それらを各研究項目として設定した。これら全ての研究項目を通して生殖系列のエピゲノムはダイナミックに変動し、これが生殖系列サイクルを駆動する遺伝子群の発現と発生能の再プログラム化を規定すると考えた。(3つの目的と3つの研究項目は1対1に対応するものではないことに留意。ひとつの目的に対し複数の研究項目がオーバーラップしながら貢献した。)

まず、研究項目A01 生殖細胞の分化決定機構では、様々な手法を用いて生殖系列の運命決定因子を同定

し、それらがエピゲノムを制御する機構を解明し、試験管内での生殖細胞分化系の確立とその人為改変を目指した。また、RNA 代謝に関わることが知られており、かつ生殖細胞に特有の構造物である生殖顆粒の構成因子と機能を解明することを目指した。研究項目 A02 配偶子形成・減数分裂とエピゲノムネットワークでは、樹立された精子幹細胞株のエピゲノム変化を指標として、この細胞に内在する品質管理機構を明らかにし、DNA メチル化、ヒストンメチル化、小分子 RNA、ポリコム群蛋白質複合体がゲノム刷込み、減数分裂、配偶子形成を制御するネットワークを解明することを目指した。研究項目 A03 受精・初期胚におけるエピゲノム変化と発生能では、受精のメカニズムとその前後のエピゲノム変化を明らかにすると共に、卵や初期胚における再プログラム化因子・初期化因子の同定とクローン技術の改善を目指し、受精後の最初の細胞分化におけるエピゲノム変化を同定することとした。

以上を総合し、生殖系列の世代サイクルを回転させる機構と発生能を規定するエピゲノム制御のネットワークを解明することが本領域の目指すところであった。エピゲノムを共通の視点に据えたことで、前後の発生時期のエピゲノム動態への配慮が必要となり、研究項目を越えた視点の共有が可能になると考えた。これらの研究を遂行することで、発生工学技術の向上、不妊・流産の解明、生殖補助医療の改善へ向けて、科学的な知見の集積を図った。

【我が国の学術水準の向上・強化につながる点】

本領域の前身である特定領域研究「生殖細胞の発生プログラム・再プログラム化とエピジェネティクス」(平成 15-19 年度)では、社会的・学問的な要望に応じて核移植クローン動物の頻発異常、次世代へゲノムを伝達するためのエピジェネティクス制御を課題に取り入れ、多くの成果が生み出された。例えば、生殖系列への運命決定に関わる遺伝子 Blimp1 の発見、卵子由来ゲノムのみを持つ二母性マウス「かぐや」の作出、雌雄の生殖系列におけるゲノム刷込み機構の解明、精子幹 (GS) 細胞からの多能性細胞樹立など、学術的にも社会的にもインパクトのある成果が Nature、Cell などの国際誌に掲載され、日本は一躍この分野のトップクラスに躍り出た。本申請はこの機を逃さず本研究領域を格段に発展させるために企画・編成されたものである。つまり、公募要領に示された項目のうち「その領域全体の学術的水準が高く、研究の格段の発展が期待できる研究領域」に該当すると考えた。また、本領域の創出する研究成果は、核移植クローン技術等の発生工学、不妊・流産・先天異常の解明、生殖補助医療の向上、幹細胞生物学や再生医療への貢献等、学術的にも社会的にも幅広く波及効果を及ぼすと考えられた。よって、本申請は「その領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらす等、学術研究における先導的または基盤的意義を有する研究領域」に相当するものとして申請した。エピゲノム制御ネットワークの解明は、がんをはじめとする様々な疾患、老化、個体差、進化に関する研究への新たな基盤となるであろうことが期待された。

【持続性と発展性を考慮した編成】

本領域を編成するにあたり、特定領域研究「生殖細胞の発生プログラム・再プログラム化とエピジェネティクス」からの持続性と、若手を中心とする新たな研究展開の両方を考慮した。前領域の計画研究のうち特に重要でかつ成果を上げている研究課題 11 件を本領域に引き継ぎ、全領域の公募研究の中から特段に発展が期待される若手研究者の課題 2 件(研究代表者: 斎藤通紀、青木不学)を計画研究へ組み入れた。また、これまでの特定領域でカバーできなかったヒストンメチル化とポリコムに関する世界レベルの研究者による課題 2 件(研究代表者: 眞貝洋一、古関明彦)の参加を得、新たな共同研究や研究展開が期待できる編成とした。計画研究の研究代表者の所属学会は 21 に及び、学際的な編成が本領域の特徴となった。

【最終年度前年度応募による採択について】

本研究領域は特定領域研究「生殖細胞の発生プログラム・再プログラム化とエピジェネティクス」(平成 15-19 年度)の後継特定領域として最終年度前年度応募により平成 19 年度に採択された。したがって、初年度は前特定領域とオーバーラップするかたちで、総括班による準備のみ(キックオフ国際シンポジウムなど)を行ない、平成 20 年度から各研究課題を開始した。

最終年度前年度応募を行なった理由は、(1) 世界のトップに躍り出た前特定領域の好循環を途切れることなく継続し、生産性の高い共同研究を維持する必要があること、(2) 参加する計画研究代表者の研究費の大部分が本特定領域に依存しており、核移植などの特殊技能を持つ研究員や研究支援者の確保のために予算の持続供給が不可欠であること(逆に、雇用の中断は貴重な人材を失うことに繋がり致命的である)などであり、これらの妥当性が認められて採択に至ったと理解している。

2. 研究の進展状況及び成果の概要

【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとしたか】

本領域では、生命の糸を紡ぐ世代サイクルの分子基盤である (1) 生殖系列のエピゲノムの制御ネットワ

ークを解明し、(2) 培養下での生殖細胞分化系の確立、(3) 発生能を司る再プログラム化の実体解明を行い、生殖系列の世代サイクルを包括的に理解することを目的とした。以上をもって、クローン技術をはじめとする発生工学技術及び生殖補助医療の改善への基礎的知見の集積を図った。以下、この3つの設定目的ごとの達成度合いについて、各研究項目での主要な成果(抜粋)をふくめて記載する。(目的と研究項目は1対1に対応するものではないことに留意。ひとつの目的に対し複数の研究項目が貢献している。)

【目的(1) 生殖系列のエピゲノムの制御ネットワークの解明】

目的の達成に係る主な研究成果

研究項目 A01: 生殖系列の分化決定機構

1) 中馬新一郎、中辻憲夫らはマウスの生殖顆粒に着目し、これが小分子 RNA とエピゲノムのネットワークを制御することを示した。すなわち、生殖顆粒の構成成分 Tudor ファミリー蛋白質の Tdrd1、9 は Piwi ファミリー蛋白質である Mili、Miwi2 と相互作用し、Piwi interacting RNA (piRNA) 経路と DNA メチル化を介してレトロトランスポゾンを抑圧すること (*Dev Cell* 2009)、Tdrd6、7 はクロマトイド小体のリボ核蛋白質の再構成と精子細胞の成熟に重要であることを示した (*Proc Natl Acad Sci USA* 2011)。

2) 浅野雅秀、古関明彦らはヘテロクロマチン蛋白質 HP1g が減数分裂初期に起きる傍セントロメア領域のヒストン H3K9 ジメチル化の制御を介して相同染色体の対合に寄与することを明らかにした (*Development* 2011)。つまり、ヒストン修飾とヘテロクロマチンが減数分裂の正常な進行に必要であることを示した。

3) 関由行、斎藤通紀らはマウス PGC においてゲノム DNA が脱メチル化(再プログラム化)される機構を調べ、DNA メチル化維持因子である Uhrf1 の発現が抑制され、かつ PGC が活発に増殖する(DNA 複製を繰り返す)ことでゲノム全体の脱メチル化を誘導することを見つけた。また、PGC 特異的に発現する転写制御因子 Prdm14 が 5-メチルシトシンの酸化および塩基除去修復を介して領域選択的脱メチル化を誘導することを明らかにした (*Development in press*)。

研究項目 A02: 配偶子形成・減数分裂とエピゲノムネットワーク

4) 眞貝洋一らはマウスの胎児精巣でヒストン H3K9 メチル化酵素 Glp が転写後抑制を受け、その結果雄性生殖細胞では H3K9 ジメチル化のレベルが低く維持されていることを発見し (*Biol Reprod* 2013)、さらに G9a/Glp 複合体が H3K9 ジメチル化と間接的に DNA メチル化を誘導することで転写を抑圧することを発見した (*EMBO J* 2008)。すなわち、H3K9 ジメチル化と DNA メチル化の制御ネットワークが明らかとなった。

5) 篠原隆司らはヒストン H3K9 や H3K27 の修飾異常をもつマウスの精子幹(GS)細胞においてインプリント遺伝子の DNA メチル化異常が数世代にわたり発生すること (*Biol Reprod* 2009)、GS 細胞の遺伝的安定性に p53 が重要であること、エピジェネティックな安定性には Dnmt3a/b 分子が関与することを明らかにした (*Biol Reprod* 2009)。

6) 仲野徹らはマウス精巣において Piwi ファミリー蛋白質 Mili、Miwi2、及び生殖顆粒の構成因子である Mvh 蛋白質の機能解析を行ない、これらが雄性生殖細胞における piRNA の産生と、piRNA を介したレトロトランスポゾンの DNA メチル化に必須であることを見つけた (*Genes Dev* 2008, 2010)。上記の中馬新一郎の仕事と繋がっており、レトロトランスポゾンを抑制してゲノムへの変異の蓄積を防ぐ piRNA と DNA メチル化の制御ネットワークが明らかになった。

7) 佐々木裕之らはマウス卵子で内在性 small interfering RNA (siRNA) を発見し、これがレトロトランスポゾンや標的遺伝子を負に制御することを示した (*Nature* 2008)。ただし、DNA メチル化を誘導する piRNA とは異なり、標的 RNA の分解による制御のみであった。また、この siRNA の一部が偽遺伝子に由来し、相補的な mRNA を分解することも判明し、卵子のトランスクリプトームのユニークな制御ネットワークが浮き彫りになった。精巣における piRNA 合成に必要な新規因子としてフォスホリパーゼ/ヌクレアーゼファミリー蛋白質 MitoPLD を同定し、その変異が生殖顆粒の消失、ミトコンドリアの局在異常、精子形成不全を起こすことを明らかにした (*Dev Cell* 2011)。さらに、インプリント遺伝子 Rasgrf1 のメチル化刷込みに piRNA 経路と長鎖非コード RNA が関わることを発見した (*Science* 2011)。piRNA はレトロトランスポゾンのみならず発生関連遺伝子の DNA メチル化と発現制御に関与することが明らかになった。

研究項目 A03：受精・初期胚におけるエピゲノム変化と発生能

8) 中村肇伸、仲野徹らは受精直後のマウス胚において、PGC7 蛋白質がヒストン H3K9 ジメチル化を認識して雌性クロマチンに強固に結合し、雌性ゲノムの 5-メチルシトシンを Tet ファミリー蛋白質による水酸化から保護することを明らかにした (**Nature** 2012)。水酸化 5-メチルシトシン (5-ヒドロキシメチルシトシン) は受動的 (+能動的?) に脱メチル化されることが知られており、PGC7 は雌性ゲノムを脱メチル化から保護する役目を担うと考えられる。PGC7 は生殖細胞や初期胚にのみ存在する蛋白質なので、これらの細胞における H3K9 ジメチル化と DNA メチル化の緊密な関係が確認され、両者を繋ぐ因子のひとつが同定された。

成果のまとめ：生殖細胞系列においてヒストン修飾、小分子 RNA 生成、DNA メチル化の間を繋ぐ因子が次々と明らかになり、エピゲノムの制御ネットワークの全体像が見えてきた。とくに、多くの因子の機能がレトロトランスポゾン抑制に集約されることが判明し、変異の蓄積を防ぐことが生殖細胞の大きなテーマであることが見えた。一方、これらの因子の変異体の多くはパキテン期前後で精子形成を停止することから減数分裂の進行におけるエピゲノムの重要性が示唆された。

目的の達成度：目的を達成した。

【目的 (2) 培養下での生殖細胞分化系の確立】

目的の達成に係る主な研究成果

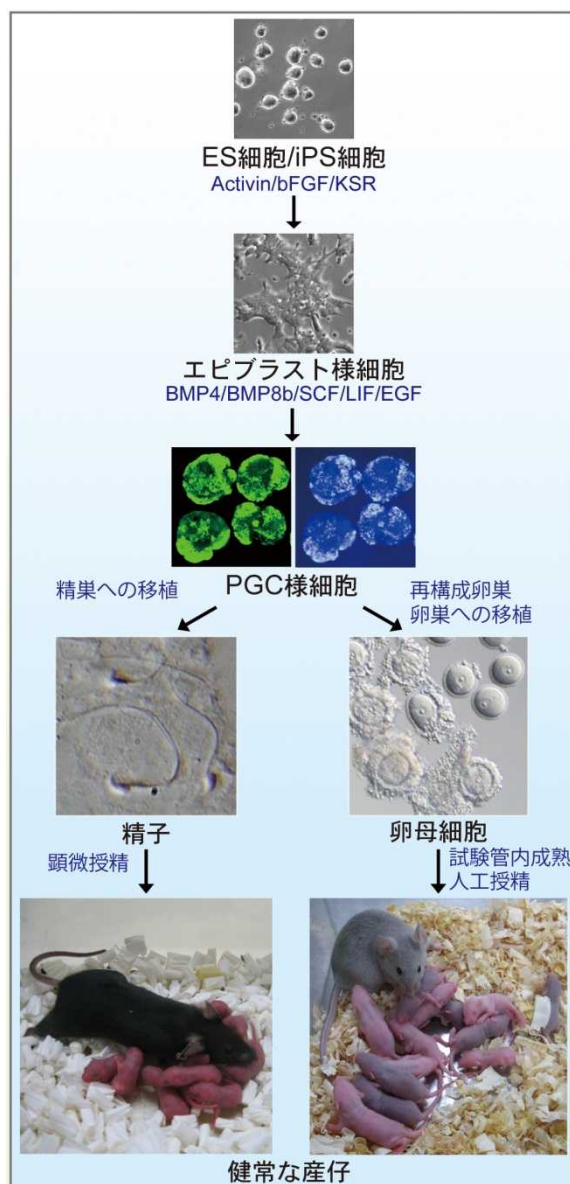
研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構

1) 齋藤通紀らはマウスの始原生殖細胞 (PGC) 形成を誘導する最上流因子 **Blimp1** が体細胞プログラムを抑制し、生殖細胞プログラムを誘導すること (**Genes Dev** 2008)、PGC 形成に必須のもうひとつの転写制御因子 **Prdm14** が多能性遺伝子やエピゲノム再プログラム化に必要な遺伝子を誘導すること (**Nat Genet** 2008)、また、無血清培地でエpiプラストから PGC を誘導するシグナル原理を解明した (**Cell** 2009)。また、松居靖久らはマウス PGC において、核内低分子リボヌクレオ蛋白質の構成成分 **Larp7** がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 **p15** を抑制し、これにより PGC の増殖を維持することを見つけた (**Genes Dev** 2012)

2) 齋藤通紀らはマウス多能性幹細胞から試験管内で雌雄 PGC を分化させ、これから産子を得ることに成功した (**Cell** 2009, 2011; **Science** 2012)。すなわち、ES 細胞や人工多能性 (iPS) 細胞をアクチビン、bFGF、KSR 存在下で培養してエpiプラスト様細胞を誘導し、これに **BMP4**、**BMP8b**、**SCF**、**LIF**、**EGF** を作用させて PGC 様細胞を誘導した。濃縮した雄の PGC 様細胞を精巣内へ移植したところ精子へと分化した。この精子を顕微授精に用いたところ、正常な産子を得ることに成功した。一方、雌の PGC 様細胞を卵巣内へ移植するか人工的に再構成した卵巣様組織で培養したところ、卵母細胞へと分化した。この細胞を試験管内で成熟させ人工授精を行ったところ、正常な産子を得た。すなわち、世界に先駆けて培養下での生殖細胞分化系の確立に成功したのみならず、機能的な配偶子へと分化させて、完全に培養下の細胞から産子を得るに至った。

(尚、齋藤は JST 戦略的創造研究推進事業 CREST、次いで ERATO に採択されたため、全ての成果を本領域に帰することはできないかも知れない。しかし同人は前身特定領域の公募研究代表者を経て本領域の計画研究代表者として参画し、領域終了時まで研究を遂行したことを申し添える。)

成果のまとめ：生殖系列の分化決定と維持に関わる因子が次々と明らかになり、試験管内での生殖細胞分化系が確立されたのに加えて、完全に培養下の細胞から正常産子を得ることに成功した。



目的の達成度：当初の予定を越えて目的を達成した。

【目的 (3) 発生能を司る再プログラム化の実体解明】

目的の達成に係る主な研究成果

研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構

1) 小倉淳郎、幸田尚らは未受精卵へ体細胞核を移植して作出するクローンマウス胚において Xist 遺伝子の異常な高発現による X 染色体遺伝子の発現抑制が生じていることを発見した (**Science** 2010)。Xist 遺伝子をノックアウトした体細胞核を移植に用いるとクローンマウスの作出効率が改善したことから、体細胞クローンの作出効率が低い原因のひとつは、Xist 遺伝子の再プログラム化異常にあることが分かった。また、実用的な方法として Xist のノックダウンを試み、クローンの作出効率を著しく改善した (**Proc Natl Acad Sci USA** 2011)。

研究項目 A03：受精・初期胚におけるエピゲノム変化と発生能

2) 青木不学らはクロマチン構造変化に大きな役割を果たすヒストン H2A と H3 のバリエーションの解析を行い、全能性を獲得する時期である受精直後、全能性を失っていく初期発生過程でこれらの変異体の大規模な置換が起きることを明らかにした (**Development** 2010; **PLoS Genet** 2011; **J Reprod Dev** 2012)。すなわち、体細胞を少数の転写制御因子で再プログラムする過程とは異なり、受精後に全能性を獲得する再プログラム化ではクロマチンタンパク質の大規模な置換が重要な役割を果たすことが示唆された。

3) 中村肇伸、仲野徹らは受精直後のマウス胚において、PGC7 蛋白質がヒストン H3K9 ジメチル化を認識して雌性クロマチンに強固に結合し、雌性ゲノムの 5-メチルシトシンを Tet ファミリー蛋白質による水酸化から保護することを明らかにした (**Nature** 2012)。水酸化された 5-メチルシトシン (5-ヒドロキシメチルシトシン) は受動的 (+能動的?) に脱メチル化されることが知られており、PGC7 は雌性ゲノムを再プログラム化から保護する役目を担うと考えられる。

4) 若山照彦らは卵子に存在する再プログラム化因子が単為発生胚のインプリント異常の修復も行い胎盤を形成できるようにすることを発見し (**Development** 2010)、核移植胚の発生率の低さはエピゲノム異常だけでなく核移植技術そのものにも原因があることを示した (**Biol Reprod** 2012)。また、培地に添加するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を変更することにより核移植技術を改善することに成功した。

成果のまとめ：卵子の細胞質に存在する再プログラム化因子としてヒストンバリエーションの役割が明らかになったほか、体細胞クローンのエピゲノム異常が作出効率の低さの原因であることが判明した。一方、再プログラム化抵抗性因子が同定され、その作用機序が明らかになった。

目的の達成度：目的を達成した。

【領域全体としての達成度のまとめ】

以上に述べたように、設定した3つの目的を全て達成し、とくに(2)培養下での生殖細胞分化系の確立については予想を遥かに越えて素晴らしい成果が生まれた。その結果、生殖系列の世代サイクルに関する包括的な理解が深まり、クローン技術をはじめとする発生工学技術及び生殖補助医療の改善への基礎的知見の集積を図ることができた。したがって全体としては設定した目的を十分に達成したと考えている。

尚、本項では当初に設定した(1)～(3)の目的にとくに合致した研究成果に絞って述べたが、これ以外にもインパクトの大きな基礎的な発見や発生工学技術及び生殖補助医療の改善に資する成果が生まれており、それらについては事後評価報告書「8. 主な研究成果 (発明及び特許を含む)」で述べる。

審査部会における所見

A+ (研究領域の設定目的に照らして、期待以上の成果があった)

1. 総合所見

本研究領域は、実績のある研究者が集結して、高いレベルの共同研究を行うことの相乗効果により研究がさらに加速しレベルアップする、という極めて理想的な循環が見られた。特定領域研究としての成功例である。特に、生殖系列分化制御と初期発生におけるエピジェネティック制御、マウスクローン作出効率の向上、多能性細胞からの生殖細胞誘導技術の確立などが本領域の成果として特筆される。これらの成果は、本研究領域が世界トップレベルの水準を維持していることを示しており、領域の設定目的に照らして期待以上の成果があったと評価できる。領域内共同研究論文の数は注目に値するものであり、連携が非常にうまくいった傍証である。また、基礎研究として非常にインパクトがある成果が多く、この成果の公表により他領域へも波及効果をもたらすことが期待される。

2. 評価に当たっての着目点ごとの所見

(a) 研究領域の設定目的の達成度

実績のある研究者が集まった研究領域であり、siRNA 発見と non coding RNA の機能解析、in vitro での機能的生殖細胞分化誘導、生殖細胞系譜のエピゲノム制御、リプログラミングの実態解明という目標に対して、当初の目標を超える格段の成果発展へと飛躍をしている。

(b) 研究成果

計画研究代表者がそれぞれ世界をリードする成果をあげ、質の高い論文発表をしており、この分野の日本のレベルの高さを強くアピールするに至っている。具体的には、生殖細胞の誘導、減数分裂によるエピゲノムの役割、受精メカニズム解明等に関して、目覚ましい成果があげられている。本研究領域に参画した研究者のなかから CREST、ERATO など大型の研究費を獲得していることは、本研究成果に対する高い評価の表れである。

(c) 研究組織

計画研究の原著論文の3割が領域内共同研究によるものであり、特定領域研究の意義を十分に実現したものといえる。各研究項目間の連携も極めて良好であったと考えられる。公募研究においても、種々の生物について幅広く生殖細胞とエピゲノム研究を推進し、全研究代表者の原著論文の2割が領域内共同研究から生まれているなど、学術的なチーム編成で異分野融合がなされたと言える。

(d) 研究費の使用

必要十分に使用されており、特に問題点はなかった。

(e) 当該学問分野、関連学問分野への貢献度

生殖細胞系列の分化決定機構、生殖細胞形成・減数分裂とエピゲノムネットワーク、受精・初期胚におけるエピゲノム変化と発生能の3つの学問分野において、大きく貢献している。今後、ヒトへの臨床応用が期待される。今後、欧米からの研究志願者が増えることで、真の意味で「世界の生殖細胞研究を牽引」する分野になることが多いに期待される。

(f) 若手研究者育成への貢献度

勉強会を開催して次世代の研究者の育成に積極的に取り組んだことは高く評価できる。若手研究者の受賞、あるいは研究期間終了後に研究者としてのポストを継続的に確保できた者も多く、本領域が若手研究者育成に貢献したことの傍証である。