

| |
|------------------------|
| 領域略称名：生殖系列 領域番号：529 |
|------------------------|

平成25年度科学研究費補助金
「特定領域研究」に係る事後評価報告書

「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」

(領域設定期間)

平成19年度～平成24年度

平成25年 6月

領域代表者 九州大学・生体防御医学研究所・教授・佐々木裕之

目 次

| | |
|--|----|
| 1. 研究領域の目的及び概要 | 3 |
| 2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況 | 5 |
| 3. 研究領域の設定目的の達成度 | 7 |
| 4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況 | 10 |
| 5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況 | 11 |
| 6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む） | 12 |
| 7. 総括班評価者による評価 | 13 |
| 8. 主な研究成果（発明及び特許を含む） | 15 |
| 9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等） | 18 |
| 10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度 | 24 |

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、これ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。

【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的改変を目指した。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標とした。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。

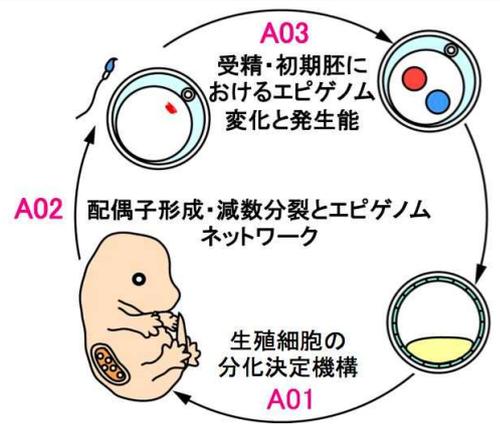
最終年度前年度応募を行なった理由は、(1) 世界のトップに躍り出た前特定領域の好循環を途切れることなく継続し、生産性の高い共同研究を維持する必要があること、(2) 参加する計画研究代表者の研究費の大部分が本特定領域に依存しており、核移植などの特殊技能を持つ研究員や研究支援者の確保のために予算の持続供給が不可欠であること (逆に、雇用の中断は貴重な人材を失うことに繋がり致命的である) などであり、これらの妥当性が認められて採択に至ったと理解している。

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、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

【研究組織と研究項目との関係】

研究領域には総括班において全体のスムーズな運営を図るとともに、哺乳類の生殖細胞系列の世代サイクルの全体カバーできる研究体制を整えた。すなわち、生殖細胞系列の世代サイクルを時系列に沿って3つに分け、研究項目 A01 生殖系列の分化決定機構、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、および研究項目 A03 受精・初期胚におけるエピゲノム変化と発生能を設定し、合計 15 の計画研究を推進した。計画研究では哺乳類のうちで生殖細胞の研究が最も進んでいるマウスを対象とし、我が国を代表する研究者を結集した。また、計画研究でカバーしきれない部分を補い、かつ優れた若手研究者を支援推進するためにおよそ 25 の公募研究を前半 2 年間と後半 2 年間にそれぞれ採択し推進した。公募研究にはマウス以外のモデル生物を対象とする研究者を加え、さらに応用面への発展性を考慮して産業動物を対象とする農学研究者や臨床サンプルにアクセスのある医学研究者の参加も得た。



【総括班：平成 19-24 年度】

領域内総括班員（所属は各研究項目を参照）：佐々木裕之（領域代表者）；松居靖久（事務担当）；阿部訓也（広報担当）；小倉淳郎（企画担当）；中辻憲夫（企画担当）；仲野徹（企画担当）
評価担当総括班員（領域外）：小原雄治（国立遺伝学研究所・特任教授）；相賀裕美子（国立遺伝学研究所・教授）；田賀哲也（東京医科歯科大学・教授）；高木信夫（北海道大学・名誉教授）；角田幸雄（近畿大学・教授）；諸橋憲一郎（九州大学・教授）

【計画研究：平成 20-24 年度】

研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構

松居靖久（東北大学・教授）・野瀬俊明（慶應義塾大学・特任教授）「始原生殖細胞の分化運命決定を制御する遺伝子ネットワーク」；中辻憲夫（京都大学・教授）・中馬新一郎（京都大学・助教）「マウス生殖系列細胞における生殖顆粒構造の分子機能解析」；斎藤通紀（京都大学・教授）「生殖細胞エピゲノム獲得機構の解明とその再構成」；小倉淳郎（理化学研究所・室長）・幸田尚（東京医科歯科大学・准教授）「核移植技術を用いた生殖系列の全能性獲得機構の解明」；阿部訓也（理化学研究所・チームリーダー）・杉本道彦（理化学研究所・開発研究員）「マウス多能性胚細胞・生殖細胞の発生プログラム制御に関する研究」

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

眞貝洋一（理化学研究所・主任研究員）・立花 誠（京都大学・准教授）「ヒストンメチル化ダイナミクスの制御と生殖系列での機能」；篠原隆司（京都大学・教授）「精子幹細胞における品質管理機構の解析」；仲野徹（大阪大学・教授）「精子形成におけるエピジェネティック制御と small RNA」；佐々木裕之（九州大学・教授）・秦健一郎（国立成育医療センター研究所・部長）「配偶子形成とゲノム刷り込みのエピゲノム制御機構」；河野友宏（東京農業大学・教授）「ゲノム刷り込みによる生殖系列の機能調節と発生制御」；古関明彦（理化学研究所・グループディレクター）・柴原慶一（国立遺伝学研究所・准教授）「精子形成過程における性染色体不活性化のエピジェネティック制御メカニズム」

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

田中智（東京大学・准教授）・大鐘潤（明治大学・講師）「マウス初期胚発生におけるエピゲノム形成と細胞分化」；青木不学（東京大学・教授）「卵および初期胚における遺伝子発現リプログラミングの調節機構」；岡部勝（大阪大学微生物病研究所・教授）・蓮輪英毅（大阪大学微生物病研究所・助教）・磯谷綾子（大阪大学微生物病研究所・准教授）「受精のメカニズムと受精前後における生殖細胞のエピゲノム調節」；若山照彦（山梨大学生命環境学部・教授）「卵子による核の初期化機構の解明およびその促進方法の開発」

【公募研究：平成 21-22 年度】

研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構

浅野雅秀（金沢大学・教授）；多田高（京都大学・准教授）；田中聡（熊本大学・助教）；高田達之（立命館大

学・教授) ; 関 由行 (関西学院大学・専任講師)

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

西森克彦 (東北大学・教授) ; 神武洋二郎 (近畿大学・准教授) ; 山口政光 (京都工芸繊維大学・教授) ; 篠原美紀 (大阪大学・准教授) ; 島田昌之 (広島大学・准教授) ; 村上浩士 (中央大学・教授) ; 田久保圭誉 (慶應義塾大学・専任講師) ; 齋藤都暁 (慶應義塾大学・准教授) ; 倉橋浩樹 (藤田保健衛生大学・教授) ; 酒井則良 (国立遺伝学研究所・准教授) ; 鏡雅代 (国立成育医療センター研究所・室長)

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

澤井健 (岩手大学・准教授) ; 有馬隆博 (東北大学・教授) ; 馬場忠 (筑波大学・教授) (採択後、辞退した) ; 栗原裕基 (東京大学・教授) ; 小野竜一 (東京医科歯科大学・助教) ; 柗卓志 (京都大学・特定拠点教授) ; 中西友子 (鳥取大学・助教) ; 東田裕一 (九州大学・准教授) ; 加藤容子 (近畿大学・教授) ; 田中宏光 (長崎国際大学・准教授)

【公募研究 : 平成 23-24 年度】

研究項目 A01 : 生殖系列の分化決定機構

栗原裕基 (東京大学・教授) ; 浅野雅秀 (金沢大学・教授) ; 多田高 (京都大学・准教授) ; 田中聡 (熊本大学・助教) ; 関由行 (関西学院大学・専任講師)

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

小谷友也 (北海道大学・准教授) ; 河村和弘 (聖マリアンナ医科大学・教授) ; 柏原真一 (筑波大学・准教授) ; 石黒啓一郎 (東京大学・助教) ; 鈴木敦 (横浜国立大学・准教授) ; 山口政光 (京都工芸繊維大学・教授) ; 倉橋浩樹 (藤田保健衛生大学・教授) ; 酒井則良 (国立遺伝学研究所・准教授) ; 李智博 (神戸大学・特命助教)

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

澤井健 (岩手大学・准教授) ; 有馬隆博 (東北大学・教授) ; 村野健作 (筑波大学・研究員) ; 服部浩一 (東京大学・特任准教授) ; 小野竜一 (東京医科歯科大学・助教) ; 堀家慎一 (金沢大学・准教授) ; 中村肇伸 (長浜バイオ大学・講師) ; 中西友子 (鳥取大学・助教) ; 加藤容子 (近畿大学・教授) ; 田中宏光 (長崎国際大学・准教授) ; 大串素雅子 (京都大学・特任助教) ; 高田修治 (国立成育医療センター研究所・部長)

【各研究項目の連携状況】

領域内の研究組織の連携については、計画研究の原著論文の 31% が領域内共同研究によるものであったことから、特定領域研究の意義を十分に実現したと考えている。(「8. 主な研究成果」及び「9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況」において領域内の共同研究による成果に●を付した。) また、そのうち 2 分の 1 が研究項目を越えた領域内共同研究であったことから、各研究項目の連携状況も極めて良好であったといえる。本領域を企画した際に、計画研究の対象を哺乳類(とくにマウス)に絞ったことで、リソースや技術を共有しやすい場が提供され、生殖細胞の世代サイクルを俯瞰しやすくなったと考えられる。実際、ノックアウトマウスや遺伝子導入マウスの共有、核移植などの発生工学技術の供与、次世代シーケンサーを用いた網羅的小分子 RNA 解析やエピゲノム解析などで共同研究が盛んであった。また、公募研究には酵母、魚類、ショウジョウバエの研究者を加えて幅広く生殖細胞とエピゲノムの研究を推進したが、全班員の原著論文でも 22% が領域内共同研究であった。

3. 研究領域の設定目的の達成度（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、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の必要性に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

【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制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

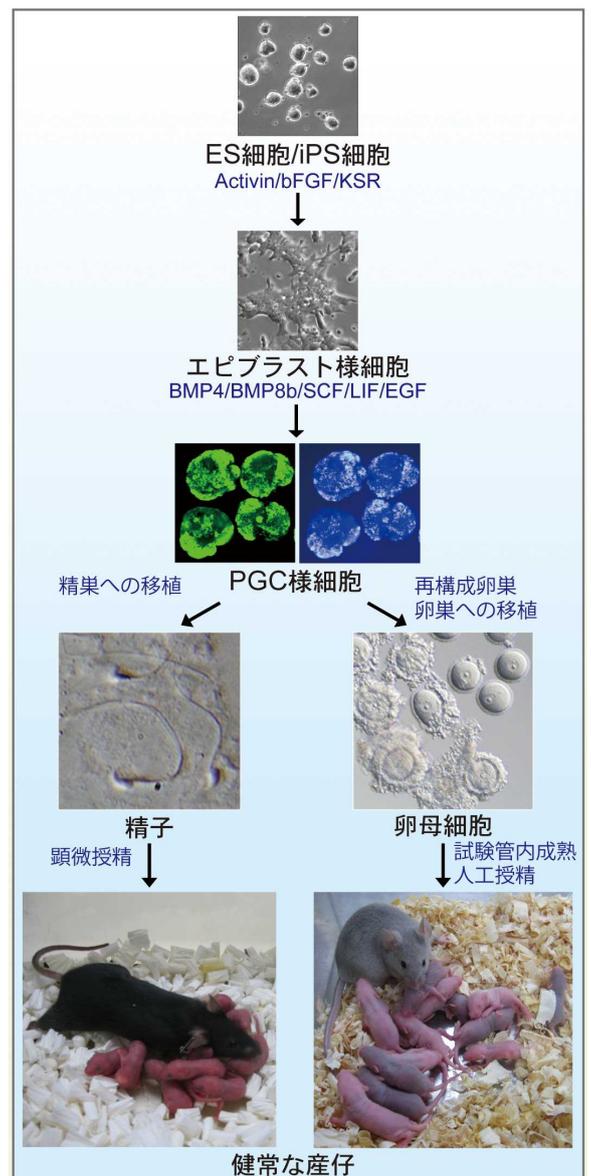
1) 斎藤通紀らはマウスの始原生殖細胞 (PGC) 形成を誘導する最上流因子 Blimp1 が体細胞プログラムを抑制し、生殖細胞プログラムを誘導すること (*Genes Dev* 2008)、PGC 形成に必須のもうひとつの転写制御因子 Prdm14 が多能性遺伝子やエピゲノム再プログラム化に必要な遺伝子を誘導すること (*Nat Genet* 2008)、また、無血清培地でエpiプラストから PGC を誘導するシグナル原理を解明した (*Cell* 2009)。また、松居靖久らはマウス PGC において、核内低分子リボヌクレオ蛋白質の構成成分 Larp7 がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p15 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) 斎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、斎藤は 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「8. 主な研究成果 (発明及び特許を含む)」で述べる。

4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1 ページ程度）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

【計画研究における組織変更について】

本領域の研究推進中に、古関明彦（研究項目 A02、計画研究、課題名「精子形成過程における性染色体不活性化のエピジェネティック制御メカニズム」）の研究分担者である柴原慶一（国立遺伝学研究所・准教授）が研究職を辞して離脱した。当初の研究目標は設定期間の前半 3 年間でほぼ達成していたため、後半の研究計画調書を作成する際に柴原を分担者から除き、相当する研究経費を古関から削減した。

一方、削減した経費は若手の育成に充てることとし、小倉淳郎（研究項目 A01、計画研究、課題名「核移植技術を用いた生殖系列の全能性獲得機構の解明」）との共同研究（Inoue et al. *Science* 2010）で重要な働きをした幸田尚（東京医科歯科大学・准教授）を小倉の研究分担者に加え、相当する経費を手当てした。幸田はその後、培養下の胚や生殖補助技術を用いて作出した胚のエピゲノム異常を発見するなどの成果を上げており、育成の効果があつたと判断している。

【中間評価コメントへの対応について】

中間評価ヒヤリングでは最高の評価結果 A（現行のまま推進すればよい）をいただいたが、「本領域が医学への貢献を目指す」と謳っている以上、**ヒトでの生殖医療への応用**を目指す観点からの取り組みが望まれる」という意見があつた。本領域では当初よりヒトを対象とする公募研究を推進していたところではあるが、中間評価以降はこの体制をさらに充実させ、最終的に 5 名が臨床サンプルを対象とする研究を行った。その成果として、倉橋浩樹（藤田保健衛生大学）、田中宏光（長崎国際大学）は不妊の原因となる遺伝子変異や SNP を同定し、鏡雅代（国立成育医療センター研究所）はヒト 14 番染色体のインプリント異常症の発生機序を解明し、有馬隆博（東北大学）は体外受精児と男性不妊患者の精子におけるインプリント異常に関する研究で世界をリードした。河村和弘（聖マリアンナ医科大学）は自ら開発した休眠原始卵胞活性化技術をヒトで最適化し、倫理委員会の承認と患者の同意のもと、早発卵巣機能不全患者の不妊治療に対する臨床応用を行い、卵胞発育に成功し成熟した卵子を得る成果を上げた。

また、同じく中間評価ヒヤリングにおいて、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」については、進捗状況にやや遅れが見られるとの指摘があつた。実際、生化学的解析に耐えるだけの材料が得難いこと、解析手法が限られるなどの問題点があつたが、青木不学が受精後の全能性獲得にヒストン変異体による再プログラム化が重要な役割を果たすことを報告し、若山照彦が培地に添加する薬品を変更することにより核移植による初期化効率の改善に成功するなどの成果が生まれた。また、公募研究を前半の 9 件から後半 12 件に増やして研究を推進したところ、中村肇伸（長浜バイオ大学）が雌性ゲノムを受精後の再プログラム化から保護する機構を解明するなどの成果があつた。

以上、中間評価ヒヤリングにおいて指摘された問題点については対応できたと考えている。

5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

研究領域内での若手研究者育成への取組及び参画した若手研究者の研究終了後の動向等を記述してください。

【若手研究者育成への取組：生殖サイクル若手勉強会】

本領域に参画した若手研究者（ポスドクから准教授クラス）の自主企画により毎年1回合宿形式の生殖サイクル若手勉強会を支援し、総括班からスーパibaバーザを派遣した。参加者による口頭発表・ポスター発表があり、参加者全員による投票でベストプレゼンテーション賞を決定した。また、領域外のシニアの先生による特別講演、領域代表者や計画研究代表者による論文の書き方やプレゼンに関する教育講演、学術調査官による研究費の動向に関する講演などが行なわれた。尚、2008年は本領域とは独立した若手研究者の集いである生殖研究ワークショップに本領域の若手が参加し、総括班がこれを支援した。

1. 2008年8月7-9日、第3回生殖研究ワークショップ（世話人：宮戸健二（国立成育医療センター研究所）、佐藤賢一（京都産業大学）、山縣一夫（理化学研究所））、東京大学三崎臨海実験所（三浦）：参加者52名（演題42件）
2. 2009年8月27-29日、特定領域生殖サイクル若手勉強会2009（世話人：立花誠、中馬新一郎）、御殿場高原ホテル（御殿場）：参加者52名（演題38件）
3. 2010年7月21-23日、特定領域生殖サイクル若手勉強会2010（世話人：井上貴美子、本多新、市浦寛相、杉本道彦）、つくばグランドホテル（つくば）：参加者49名
4. 2011年7月13-15日、特定領域生殖サイクル若手勉強会2011（世話人：木村透、城本悠助、伊川正人、藤原祥高）、大阪アカデミア（大阪）：参加者78名（演題100件）
5. 2012年7月25-27日、特定領域生殖サイクル若手勉強会2012（世話人：望月研太郎、前田郁麻）、秋保リゾートホテルクレセント（仙台）：参加者65名（演題91件）

【若手研究者のポスト獲得などの動向】

上述の生殖サイクル若手勉強会の世話人及びベストプレゼン賞受賞者の合計18名（准教授、助教、ポスドク、又は大学院生）のうち、研究期間中又は研究終了後に正式ポスト又は上のポストへ昇任した者が7名（うち2名は教授へ）。同じ18名の中で日本学術振興会受賞者が1名、文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞者が2名、次世代最先端研究開発プログラム採択者が1名であった。よって、生殖サイクル若手勉強会にはそれなりの効果があったと捉えており、自主開催の経験が将来の糧になることを期待している。

また、本領域に参画した40歳以下の若手研究者（大学院生を含む）の研究期間中及び研究終了後のポストの獲得または昇任した例は合計29件であった。また、同じく40歳以下の若手研究者が各学会の奨励賞を獲得した例が11件あった。

【若手研究者の受賞】

以下に、すでに研究代表者であった者も含めて若手研究者の受賞例を挙げる。

日本学術振興会賞

伊川正人（岡部勝研究室）

文部科学大臣表彰若手科学者賞

齋藤通紀（研究代表者）、大日向康秀（齋藤通紀研究室）、井上貴美子（小倉淳郎研究室）、中村肇伸（研究代表者）

次世代最先端研究開発プログラム採択

齋藤都暁（研究代表者）、立花誠（真貝洋一研究室）、東田裕一（研究代表者）

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

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及び支援班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

【総括班】

総括班経費の主な使途は、領域代表者（佐々木裕之）と事務担当者（松居靖久）の研究室の非常勤職員各 1 名（研究支援員）の雇用費、公開シンポジウム・総括班などの会場費・会議費、領域外総括班員への旅費・滞在費、生殖サイクル若手勉強会の会場費と特別講演の講師の旅費・滞在費、成果取りまとめのための事務用品購入費・印刷費などにあてた。2010 年の国際シンポジウム開催時には合計 11 名の海外演者の旅費・滞在費を支出した。各種学会の依頼に応じてシンポジウムを共催・講演した場合には、領域代表者と海外招待演者の旅費・滞在費などを支出した。

【設備の有効活用】

本領域では支援研究課題の設定は行なわなかったため共通設備・装置の購入や運用の実績はない。個々の研究課題において各研究代表者が購入した 500 万円以上の設備・装置は以下のとおりである。

| 購入時期 | 物品名 | 仕様・型・性能等 | 数量 | 金額（円） | 設置研究機関 |
|--------|----------------------|-------------------------------|-----|------------|-----------------|
| H21 年度 | 共焦点スキャナユニット | 横河電機社製・CSU-X1-M | 1 式 | 8,904,000 | 大阪大学 (岡部勝) |
| H22 年度 | 共焦点レーザー走査型顕微鏡 | オリンパス社製・IV1000-D | 1 台 | 12,957,000 | 京都大学 (篠原隆司) |
| H23 年度 | 561nm レーザーアップグレードキット | 米国ベクトンディッキソン社製・FACS Aria II 用 | 1 式 | 8,478,750 | |
| H23 年度 | Miseq シーケンスシステム | 米国イルミナ社製 MS-J-001 | 1 式 | 15,792,000 | 九州大学 (佐々木裕之) |

以上のうち、岡部勝が購入した共焦点スキャナユニットは侵襲性を極力抑えた顕微鏡ユニットであり、初期胚や生殖細胞のライブイメージングに有効に使用され、多数の論文でデータが使用された。また、市民公開講座でもこの装置で撮影された画像が紹介された。篠原隆司が導入した共焦点レーザー走査型顕微鏡は常時稼働しており、同研究室の代表的な論文すべてで使用されている。また、同じく篠原がレーザーをアップグレードしたセルソーターは GS 細胞の研究に必須の装置であり、多くの共同研究に使用された。佐々木裕之が導入したパーソナル型次世代シーケンサー Miseq は、生殖細胞や生殖腺の小分子 RNA の網羅的シーケンス解析を飛躍的にスピードアップさせた。同研究室の仕事のみならず、仲野徹や中辻憲夫（中馬新一郎）との共同研究で使用され、有効活用されている。

【研究費の効果的使用】

個々の研究課題では通常の生物学的実験に必要な設備・装置が購入されたほか、幾つかの研究室で発生工学実験に必要な顕微鏡やマイクロマンピュレータが導入され、本領域の共同研究にとくに役立った。また、本領域が最終年度前年度申請で採択されたため、核移植技術などの特殊技能を有するポスドクやテクニカルスタッフを継続雇用できたことは、本領域が大きな研究成果を生み出す原動力になった。大変感謝している。

7. 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。

【総括班評価者（領域外）による評価体制】

小原雄治（国立遺伝学研究所・特任教授）；相賀裕美子（国立遺伝学研究所・教授）；田賀哲也（東京医科歯科大学・教授）；高木信夫（北海道大学・名誉教授）；角田幸雄（近畿大学・教授）；諸橋憲一郎（九州大学・教授）（所属・職位は本領域終了時）

【総括班評価者による評価コメント】

総括班評価者の先生には毎年総括班会議開催時に領域の運営と目的の達成度等についてコメントをいただいたほか、領域終了後、研究成果報告書と領域ホームページに掲載の資料等を参照してもらいつつ最終評価コメントをいただいた。以下にそのコメントを掲載する。

小原雄治先生（国立遺伝学研究所・特任教授）

本領域は生命継続の根源とも言える生殖細胞系列の世代サイクルの仕組みの解明をめざして組織された。生命科学の最重要課題のひとつであるこの課題に対して、この分野で我が国を代表する優れた研究者を結集したグループであり、当初よりその成功が期待されたが、領域代表者の優れたリーダーシップのもとに予想以上の成果が収められたと判断する。特に、当初目標のうち、試験管内での生殖細胞の誘導や雌雄の生殖細胞の特徴づけ、減数分裂におけるエピゲノムの役割、受精のメカニズムの解明に関して大きな成果があげられた。成果発表や情報発信も積極的であり、これらの成果をはじめ多数が国際的なトップジャーナルに掲載されたが、領域のメールニュースで頻繁に班員が入れ替わり立ち替わり優れた論文発表をしたことが速報されたことが印象的であった。国際的にエピゲノム研究が大発展する中でタイムリーな領域であり、領域内共同研究やシンポジウムなどにより分野の興隆やこの分野の若手育成に大いに貢献したと判断する。次へのさらに大きな発展を期待したい。

相賀裕美子先生（国立遺伝学研究所・教授）

まずこの5年間、日本の生殖細胞の研究を牽引してきたこの特定研究に敬意を表します。私自身が生殖細胞の研究を行っていることから、中辻班から佐々木班へと引き継がれた研究内容は、非常に大きなインパクトを持って私の研究姿勢にもよい影響を与えてくれた。特に佐々木班において、毎年行われた班会議で研究班及び公募班の班員発表における研究内容の充実度は著しく高く、どのような国際学会にも引けを取らない内容であった。また研究班内における密な情報交換の成果であろうが、多くの共同研究がいわゆる一流の国際誌に発表されている事実は、この特定班のメンバーの連携がうまく図られていた結果であり、佐々木さんのリーダーシップとマネジメントが高く評価できる。また若手の成長にも目を見張るものがあった。この研究班における研究成果が評価され、アカデミックポジションを得た、あるいは昇進人事が多く行われたことから、今後のこの分野のさらなる発展が予測できる。

田賀哲也先生（東京医科歯科大学・教授）

本特定領域研究は、次世代へ遺伝情報を伝えるという生命の基本原則を担う生殖細胞系列の営みに関して、受精から発生のごく初期、生殖細胞の起源、減数分裂、精子と卵子の形成というサイクルを、高所に立って俯瞰する視点で取り組み、傑出した成果を上げた。この「俯瞰」は領域代表者および事務局担当者がリーダーシップを発揮して運営を進めてきたことの賜であり、数々の「傑出した成果」を報じた論文の多くが領域内の研究者による共同研究の結果生まれたことの原動力でもあった。このような領域研究の活動を総括班評価担当者として例年目の当たりにしてきたことは、評価者自身たいへん有意義な経験であったし、当特定領域研究による多チャンネルの情報発信手法によって研究者コミュニティーや一般の方々もそれを共有できたと考える。

個別の成果は枚挙にいとまがないので割愛するが、生殖細胞系列のサイクルのそれぞれの局面について、エピゲノム機構や分化決定機構など分子基盤を含めて明らかにできたという点で、研究項目 A01、A02、A03 の設定は当初のもくろみ通り効果的であり、加えて、後半2年間分に加えられた陣容等の修正が適切であったと言える。

遺伝情報を次世代に伝えるのが生殖細胞系列の役割である如く、比較的大きな研究組織として取り組む特定領域研究も次の世代の研究者を育成する役割も担うべきである。当特定領域研究は、若手の自主勉強会で学術発表・討論の場を設けたり、研究費獲得あるいは論文執筆の修得機会を設けたりするなど、若手育成への配慮もなされてきた。それらが功を奏してというのは言い過ぎかもしれないが（おそらく班会議等での発表・討論を通じた切磋琢磨する当領域の雰囲気や日々の研究現場での育成に十分寄与したこともあるのであろうが）、文部科学大臣表彰若手科学者賞や日本学術振興会賞の受賞者がそれぞれ2名と1名おり、また当領域に参画し

た 40 歳以下の研究者が教員ポストを獲得したり昇進したりした事例は 29 件という調査結果があることから、若手研究者が領域内で育っていることは確かである。

総合的に判断して、当特定領域研究は極めて秀逸であり、当初目的を期待以上に達成したと評価する。

高木信夫先生（北海道大学・名誉教授）

領域代表者のリーダーシップと的確な班の構成により「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」研究を格段に発展させる計画は原著論文のリストからも、これ迄開催された 5 回の公開シンポジウムの内容からも十分達成されたものと判断しています。特に、共同研究により成果が加速度的に上がった様に思われます。時代錯誤かも知れませんが、このような時代にも若い研究者は研究を自力でやり遂げる喜びを味わっているのか少々気になります。公開シンポジウムにおけるポスターセッション、若手勉強会の開催と若い研究者への教育的配慮がなされている事に感銘を受けました。文献のみで知る高名な国外の科学者と直に接した福岡での国際シンポジウムは特に有意義であったと思います。この特定領域研究に関与した若手から将来指導的な立場に立つ人材が多数輩出すると確信しています。また、この領域研究に限りませんが、外国の優秀な頭脳を呼び込む試みは今後の科学研究の発展に必須になると思います。

角田幸雄先生（近畿大学・教授）

本領域は、生殖細胞系列の遺伝情報伝達機構を解明することに加えて、発生工学技術や生殖補助医療技術の改善を目的として計画された。本領域では、計画班員に加えて公募班員が、異なる研究手法を用いて各自の研究課題に集中して取り組んでいる。班員は、定期的に行われるシンポジウム、班会議や通信によって、新しい情報を共有しながら刺激を受け、その結果多くの班員は *Nature*, *Science*, *Cell*, *PNAS* などの主要国際学術誌に高く評価される論文を多数公表した。また、ES 細胞/iPS 細胞から精子や卵を誘導してマウスを作出することに成功し、体細胞クローンマウスの作出率を劇的に向上させるなど、絶対不妊症の治療や実用的体細胞クローン家畜作出技術の可能性を示唆する応用を目指した成果も上げている。さらに、本領域に参加した 40 歳以下の研究者の中で、教員ポストの獲得や昇進した例が 29 件に上るなど、勉強会の開催を通じて、若手研究者の育成でも大きな成果を上げている。以上のように、本領域は的確な運営により、当初の目標以上の成果を上げたと評価できる。

諸橋憲一郎先生（九州大学・教授）

本領域はエピジェネティック制御から生殖細胞の特性を明らかにすることを目的に発足した。折しも近年のエピジェネティック研究の急速な進展と時期を同じくして本領域が運営されたことは、時宜にかなった領域の立ち上げであった。このような中であって、我が国において本特定領域が果たした役割は大きい。特に、本領域からの成果には目を見張るものがあり、多数のインパクトのある論文が発表されている。特定領域研究は学術研究の拠点としての責任を果たすことが期待されているので、この点をもって本領域は高い評価を受けるべきである。また、本領域からは多数の若手研究者が新たにポジションを獲得また昇進するなど、さらには各種の賞を受賞していることを考えれば、本領域に優秀な若手研究者が結集したことが推測できると同時に、本領域が若手研究者の育成にも努力していると理解することができる。以上のように、本領域はこの 5 年に渡り特定領域研究の責務を十分に果たしたと評価する。

【国際シンポジウムの海外招待演者による評価コメント】

2010 年 11 月に開催した国際シンポジウムに招待した海外招待演者に本領域の研究レベルについてコメントを求めたところ、John Gurdon 先生（2012 年ノーベル医学生理学賞受賞者）や Azim Surani 先生から「日本が世界の生殖細胞研究を牽引している」との非常に高い評価を得た。

8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）【研究項目毎または計画研究毎に整理する】

（3 ページ程度）

特定領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・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。

公募研究については特に重要な研究成果のみを抜粋して掲載した。領域内の共同研究による成果には●を付し、共同研究者名を挙げた。

【研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構】

計画研究

1) 松居靖久・野瀬俊明

マウス胚性幹細胞（ES）細胞で転写因子 Max がヒストン H3K9 メチル化酵素と複合体を作り、生殖細胞に特異的な遺伝子を修飾して抑制することを明らかにした (*Nat Commun* 2013) (●阿部訓也との共同研究)。また、マウス始原生殖細胞（PGC）において、核内低分子リボヌクレオ蛋白質の構成成分である 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) (●阿部訓也との共同研究)。

2) 中辻憲夫・中馬新一郎

マウスの生殖顆粒の構成成分である Tudor ファミリー蛋白質の解析を進め、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) 経路を介してレトロトランスポソンの発現を抑制すること (*Dev Cell* 2009) (●野瀬俊明、秦健一郎、仲野徹、佐々木裕之との共同研究)、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) (●仲野徹との共同研究)。

3) 斎藤通紀

マウス胚における PGC の形成に伴うゲノムワイドな遺伝子発現動態の解明 (*Genes Dev* 2008)、PGC 形成及び ES 細胞の多能性維持における転写制御因子 Prdm14 の機能解明 (*Nat Genet* 2008; *Cell Stem Cell* 2013) (●関由行との共同研究)、PGC 形成を制御するシグナル原理の解明 (*Cell* 2009) (●若山照彦との共同研究)、多能性幹細胞を用いた雌雄 PGC 形成過程の試験管内再構成 (*Cell* 2011; *Science* 2012) (●大串素雅子との共同研究) を含む成果を得た。多能性幹細胞から雌雄 PGC を試験管内で誘導する方法については米国に特許出願した (出願番号：61/373,563；61/771,619)。尚、斎藤は本領域発足後、JST 戦略的創造研究推進事業 CREST (2009 年～) 次いで ERATO (2011 年～) に採択された。

4) 小倉淳郎・幸田尚

体細胞クローンマウス胚において Xist 遺伝子の異常発現による X 染色体遺伝子の発現抑制を発見した (*Science* 2010) (●澤井健、阿部訓也、杉本道彦との共同研究)。また、Xist をノックダウンすることでクローンの作出効率を著しく改善した (*Proc Natl Acad Sci USA* 2011) (●仲野徹、阿部訓也、杉本道彦との共同研究)。核移植による再構築胚を評価系として用いることで、受精時の大規模な再プログラム化で全能性が獲得されること、体細胞特異的な抑制性ヒストンメチル化は再プログラム化されないことを明らかにした。

5) 阿部訓也・杉本道彦

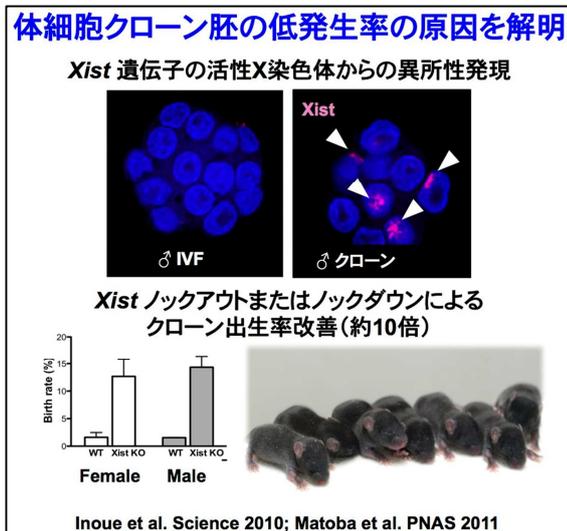
多能性細胞から生殖細胞に至る各段階で働く遺伝子群を網羅的に捉え、生殖細胞特異的な DNA 低メチル化領域を発見した。古典的な変異マウス系統の解析から、多能性胚細胞から原始外胚葉への発生プログラム転換に必須の遺伝子を同定し、報告した (*Cell Rep* 2012) (●小倉淳郎との共同研究)。

公募研究

6) 浅野雅秀

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) (●古関明彦、眞貝洋一との共同研究)。

7) 多田高



多能性維持の鍵因子として知られる Nanog 遺伝子のノックダウンマウスを作製し、生殖細胞の生存維持に必須であること、着床後初期胚のエピブラストの維持にも必要であること、その発現制御は ES 細胞のそれと異なることを報告した (*Development* 2009) (●佐々木裕之、中辻憲夫、斎藤通紀との共同研究)。

8) 関由行

マウスの PGC が DNA メチル化維持に関わる Uhrf1 の発現を抑制し、かつ活発に増殖することでゲノム全体の脱メチル化を誘導すること、また PGC 特異的に発現するエピゲノム制御因子 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*) (●斎藤通紀、立花誠、浅野雅秀との共同研究)。

【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】

計画研究

9) 眞貝洋一・立花誠

胎生期マウスの雄性生殖細胞では H3K9 メチル化酵素 Glp が転写後抑制を受け、その結果 H3K9 ジメチル化のレベルが低く維持されていること (*Biol Reprod* 2013)、H3K9 メチル化酵素 G9a/Glp 複合体は H3K9 ジメチル化と DNA メチル化を誘導して転写を抑制することを発見した (*EMBO J* 2008)。未分化な ES 細胞で観察される DNA のメチル化に非依存的なプロウイルスの発現抑制に、H3K9 メチル化酵素 ESET が重要な役割を果たすことを明らかにした (*Nature* 2010)。

10) 篠原隆司

ヒストン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渡り発生すること (*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)。GS 細胞の増殖 (自己複製) に Ras-サイクリン D2 を介するシグナル経路が重要であることを発見し (*Cell Stem Cell* 2009; *Proc Natl Acad Sci USA* 2010)、GS 細胞の精細管内ニッチへのホーミング機構の解明を進め、最終的に試験管内でのニッチ再構成に成功した (*Cell Stem Cell* 2008, 2011, 2012) (●中辻憲夫、中馬新一郎、小倉淳郎との共同研究)。また、生殖細胞からの多能性幹細胞様細胞の誘導方法について米国に特許を出願した (出願番号: PCT/JP2012/084138)。尚、篠原は本領域発足後、JST 戦略的創造研究推進事業 CREST (2008 年～) に採択された。

11) 仲野徹

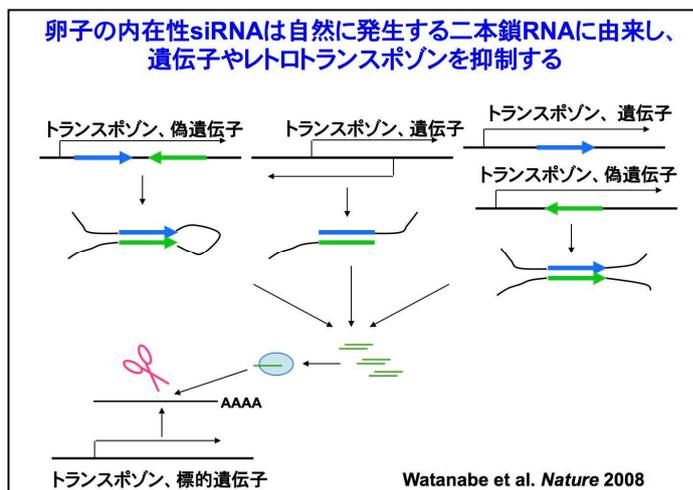
精巣におけるマウス Mili、Miwi2、Mvh タンパク質の機能解析を行ない、これらが雄性生殖細胞における piRNA の産生と、piRNA を介したレトロトランスポゾンの DNA メチル化に必須であることを見いだした (*Genes Dev* 2008, 2010) (●佐々木裕之、秦健一郎、岡部勝、中辻憲夫、中馬新一郎、野瀬俊明との共同研究)。

12) 佐々木裕之・秦 健一郎

哺乳類には存在しないと考えられていた内在性 small interfering RNA をマウス卵子で発見し、これがレトロトランスポゾンや遺伝子を負に制御することを示した (*Nature* 2008) (●仲野徹、河野友宏との共同研究)。この siRNA の一部は偽遺伝子に由来し、相補的な mRNA を標的として分解することから、卵子の RNA のユニークな制御ネットワークが浮き彫りになった。また、精巣における piRNA 合成に必要なフォスホリパーゼ/ヌクレアーゼファミリー蛋白質 MitoPLD の同定と遺伝子抑制への応用を行ない (*Dev Cell* 2011; *Genome Res* 2012) (●仲野徹、中辻憲夫、中馬新一郎、野瀬俊明との共同研究)、インプリント遺伝子 Rasgrf1 のメチル化刷込みに piRNA 経路とレトロトランスポゾン配列をふくむ長鎖非コード RNA が関わることを発見した (*Science* 2011) (●仲野徹との共同研究)。また、配偶子に刷込まれたメチル化は受精後 Dnmt1 により配列特異的に維持されることを証明した (*Genes Dev* 2008)。

13) 河野友宏

マウス 7 番染色体の Igf2-H19 領域および 12 番染色体の Dlk1-Dio3 領域の非コード RNA を含むインプリント遺伝子群の胚発生及び胎盤形成に対する作用について新たな知見を得た。次世代シーケンサーを用いた一塩基レベルの網羅的 DNA メチル化解析により、性分化後のマウス胎児生殖腺の雌雄生殖細胞、卵子、精子の詳細なメチル化パターンを初めて記述した (*PLoS Genet* 2012; *Genome Res* 2013) (●秦健一郎、松居靖久との共同研究)。また、卵子由来の雌性ゲノムのみをもつ胚と成体を作成する技術について特許を取得した (*European*



patent No.1661456; US patent No.7659443)。

14) 古関明彦

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) (●浅野雅秀、眞貝洋一との共同研究)。一方、Epc1 蛋白質は、Tip60 と結合して円形精細胞におけるヒストン高アセチル化を媒介し、精子形成に寄与することを示した。

公募研究

15) 齋藤都暁

ショウジョウバエの生殖巣由来培養細胞を用いて、転写因子 TJ が piRNA の生合成とトランスポゾンの抑制に必要な Piwi 遺伝子の転写を担う因子であることを報告した (*Nature* 2009)。また、同細胞の細胞質にある Yb 小体の構成成分である Yb 及び Armitage 蛋白質が piRNA の生合成とトランスポゾンの抑制に必須であることを明らかにした (*Genes Dev* 2010)。

16) 河村和弘

休眠原始卵胞活性化技術をヒトで最適化し、ヒト卵胞発育制御因子の網羅的同定を試み、新規因子を同定した (*Hum Reprod* 2012)。また、倫理委員会の承認と患者の同意のもと、早発卵巣機能不全患者の不妊治療に対する臨床応用を行い、卵胞発育に成功し成熟した卵子を得た。

【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】

計画研究

17) 田中智・大鐘潤

マウス ES 細胞と栄養膜幹細胞 (TS 細胞) それぞれに特徴的な DNA メチル化状態を示すゲノム領域を同定した。得られた DNA メチル化情報などに基づき、核移植クローン胚由来 TS 細胞は正常胚由来 TS 細胞と同等であることを示した (*Proc Natl Acad Sci USA* 2009)。また、初期胚発生において DNA メチル化パターンは形態的な細胞分化のあとで形成されることを明らかにした。

18) 青木不学

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 変異体の置換について解析を行い、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こることを明らかにした (*Development* 2010; *PLoS Genet* 2011; *J Reprod Dev* 2012)。これらの置換が受精後の再プログラム化に重要な役割を果たすことが示唆された。

19) 岡部勝・蓮輪英毅・磯谷綾子

遺伝子改変マウスを使用することにより精子の受精能形成に必須な遺伝子群 Spesp1、Calsperin、Pdilt、Pmis2、Tex101 を同定し (*Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 2013; *Mol Biol Cell* 2012)、受精のメカニズムの一端を明らかにした。これらの発見とは別にマイクロ RNA である miR-200b と miR-429 が排卵に必須の要素として働いていることを明らかにした (*Science* in press)。

20) 若山照彦

卵子の初期化因子は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ジェネティクス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、連続核移植を 25 回繰り返し、エピジェネティクス異常が蓄積しないことを明らかにした (*Cell Stem Cell* 2013) (●幸田尚との共同研究)。

公募研究

21) 中村肇伸

マウスの受精卵において、PGC7 蛋白質がヒストン H3K9me2 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) (●仲野徹、小倉淳郎、眞貝洋一との共同研究)。

22) 有馬隆博

マウスにおいて胎盤特異的インプリント遺伝子を複数同定し、ヒト胎盤におけるインプリントの保存性を確認した (*Hum Mol Genet* 2012) (●佐々木裕之、田中智との共同研究)。また、初期化異常を示すクローンマウスの胎盤は肥大化するが、新規胎盤特異的インプリント遺伝子がこのマウスの胎盤でインプリント異常を示すことを見つけた。

9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

特定領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（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、計画研究・公募研究毎に順に記載し、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。

【英文原著論文】

合計 369 報。高インパクトファクター（概ね IF>8）のジャーナルに掲載された 51 報を以下にリストした。また、領域内の共同研究による成果には●を付した（51 報中 27 報であった）。

計画研究

1. Akiyama, T., Suzuki, O., Matsuda, J. and *Aoki, F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. **PLoS Genet** 7, e1002279 (2011)
2. *Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., Vidal, M., Bernstein, B.E. and *Koseki, H. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1 dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. **PLoS Genet** 8, e1002774 (2012)
3. Fujihara, Y., Tokuhira, K., Muro, Y., Kondoh, G., Araki, Y., Ikawa, M. and *Okabe, M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. **Proc Natl Acad Sci USA** 110, 8111-6 (2013)
4. Hasuwa, H., Ueda, J., Ikawa, M., and *Okabe, M. Micro RNAs miR-200b and miR-429 are essential for female fertility in the mouse by ensuring ovulation. **Science** (in press)
5. *Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H. and *Saitou, M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. **Science** 338, 971-975 (2012)
6. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and *Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. **Cell** 146, 519-532, (2011)
7. Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R. and *Sasaki, H. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. **Genes Dev** 22, 1607-1616 (2008)
8. ●*Ichiyanagi, K., Li, Y., Watanabe, T., Ichiyanagi, T., Fukuda, K., Kitayama, J., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Yabuta, Y., Seki, Y., Saitou, M., and Sasaki, H. Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. **Genome Res** 21, 2058-2066, (2011)
9. ●Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., Sawai, K., Otte, A.P, Tian, X.C., Yang, X., Ishino, F., Abe, K. and *Ogura, A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. **Science** 330, 496-499 (2010)
10. Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M. and *Saitou, M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. **EMBO J** 32, 340-353 (2013)
11. ●*Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A. and Shinohara, T. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. **Cell Stem Cell** 11, 567-578 (2012)
12. ●*Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Chuma, S., Nakatsui, N., Fässler, R. and Shinohara, T. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on b1-integrin. **Cell Stem Cell** 3, 533-542 (2008)
13. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S. and *Shinohara, T. Transmission distortion caused by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. **Proc Natl Acad Sci USA** 107, 6210-6215 (2010)
14. ●Kobayashi, H., Sakurai, T., Imai, M., Takahashi, N., Fukuda, A., Yayoi, O., Sato, S., Nakabayashi, K., Hata, K., Sotomaru, Y., Suzuki, Y. and *Kono, T. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. **PLoS Genet** 8, e1002440 (2012)
15. ●Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochiduki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y. and *Kono, T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. **Genome Res** 23, 616-627 (2013)
16. Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Hasuwa, H., Saito-Fujita, T., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T. and *Okabe, M. From the Cover: Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 1451-1455 (2011)
17. ●Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N.,

- Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T., Hata, K., Li, E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H. and *Nakano, T. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. **Genes Dev** 22, 908-917 (2008)
18. ●Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Kimura, T., Nakatsuji, N., Noce, T., Sasaki, H. and *Nakano, T. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. **Genes Dev** 24, 887-892 (2010)
 19. Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K. and *Saitou, M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. **Genes Dev** 22, 1617-1635 (2008)
 20. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Takashima, S., Oshimura, M., Toyokuni, S. and *Shinohara, T. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. **Cell Stem Cell** 5, 76-86 (2009)
 21. ●Maeda, I., Okamura, D., Tokitake, Y., Ikeda, M., Kawaguchi, H., Mise, N., Abe, K., Noce, T., Okuda, A. and *Matsui, Y. Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. **Nat Commun** 4, 1754 (2013)
 22. ●Matoba, S., *Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., *Ishino, F. and *Ogura, A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 20621-20626 (2011)
 23. Matsui, T., *Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., *Lorincz, M.C. and *Shinkai, Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. **Nature** 464, 927-931 (2010)
 24. ●Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C. and *Shinohara, T. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. **Cell Stem Cell** (in press)
 25. ●Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T. and *Saitou, M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. **Cell** 137, 571-584 (2009)
 26. ●Okamura, D., Maeda, I., Taniguchi, H., Tokitake, Y., Ikeda, M., Ozato, K., Mise, N., Abe, K., Noce, T., *Izpisua Belmonte, J.C. and *Matsui, Y. Cell-cycle gene-specific control of transcription has a critical role in proliferation of primordial germ cells. **Genes Dev** 26, 2477-2482 (2012)
 27. ●Sekita, Y., Wagatsuma, H., Nakamura, K., Ono, R., Kagami, M., Wakisaka, N., Hino, T., Suzuki Migishima, R., Kohda, T., Ogura, A., Ogata, T., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. and *Ishino, F. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. **Nat Genet** 40, 243-248 (2008)
 28. ●Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., Kono, T. and *Sasaki, H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. **PLoS Genet** 9, e1003439 (2013)
 29. ●Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S.L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R.S., Nakatsuji, N. and *Chuma, S. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. **Dev Cell** 17, 775-787 (2009)
 30. ●Sugimoto, M., Kondo, M., Hirose, M., Suzuki, M., Mekada, K., Abe, T., Kiyonari, H., Ogura, A., Takagi, N., Artzt, K. and *Abe, K. Molecular identification of *t^{w5}*: *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell-cell interactions. **Cell Rep** 2, 1363-1374 (2012)
 31. Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H. and *Shinkai, Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. **EMBO J** 27, 2681-2690 (2008)
 32. Takashima, S., *Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Takehashi, M., Morimoto, H. and *Shinohara, T. Rac mediates spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. **Cell Stem Cell** 9, 463-475 (2011)
 33. ●Tanaka, T., Hosokawa, M., Vagin, V.V., Reuter, M., Hayashi, E., Mochizuki, A.L., Kitamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, G., Okawa, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Pillai, R.S., Nakatsuji, N., *Chuma, S. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 10579-10584 (2011)
 34. Tokuhiko, K., *Ikawa, M., Benham, A.M. and Okabe, M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male infertility. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 10579-10584 (2011)

Sci USA 109, 3850-3855 (2012)

35. ●Wakayama, S., Kohda, T., Obokata, H., Tokoro, M., Li, C., Terashita, Y., Mizutani, E., Nguyen, V.T., Kishigami, S., Ishino, F. and *Wakayama, T. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. **Cell Stem Cell** 12, 293-297 (2013)
36. Wakayama, S., Ohta, H., Hikichim, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O. and *Wakayama, T. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. **Proc Natl Acad Sci USA** 105, 17318–17322 (2008)
37. ●*Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., Noce, T., Nakano, T., Nakatsuji, N., Lin, H. and *Sasaki, H. MitoPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. **Dev Cell** 20, 364-375 (2011)
38. ●*Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., Gotoh, K., Hiura, H., Arima, T., Fujiyama, A., Sado, T., Shibata, T., Nakano, T., Lin, H., Ichianagi, K., Soloway, P.D. and *Sasaki, H. Role for piRNAs and non-coding RNA in *de novo* DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. **Science** 332, 848-852 (2011)
39. ●*Watanabe, T., Totoki Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M.A., Sakaki, Y. and *Sasaki, H. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. **Nature** 453, 539-543 (2008)
40. ●Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto, K., Chuma, S. and *Saitou, M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. **J Cell Biol** 192, 781-795 (2011)
41. ●Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y. and *Saitou, M. *Prdm14* defines a novel genetic pathway, initiating independently from *Blimp1*, for the establishment of the germ cell lineage in mice. **Nat Genet** 40, 1016-1022 (2008)
42. Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Shirahige, K. and *Saitou, M. PRDM14 ensures naïve pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. **Cell Stem Cell** 12, 368-382 (2013)
43. ●Yamamoto, Y., Watanabe, T., Hoki, Y., Shirane, K., Li, Y., Ichiiyanagi, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Oginuma, M., Suzuki, H., Sado, T., Nakano, T. and *Sasaki, H. Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus. **Genome Res** 23, 292-299 (2013)

公募研究

44. Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., Rijli, F.M., Nishiyama, K., Kim, K.S., Uchijima, Y., Ogawa, H., Kurihara, Y. and *Kurihara, H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. **Nat Commun** 3, 1267 (2012)
45. Courtois, A., Schuh, M., Ellenberg, J. and *Hiragi, T. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. **J Cell Biol** 198, 357-370 (2012)
46. Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Emanuel, B.S. and *Kurahashi, H. Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. **Nat Commun** 4, 1592 (2013)
47. ●*Nakamura, T., Liu, Y.U., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y., *Nakano, T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos. **Nature** 486, 415-419 (2012)
48. Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., *Siomi, H. and *Siomi, MC. A regulatory circuit for piwi by traffic jam, a large Maf, in *Drosophila* gonadal somas. **Nature** 461, 1296-1299 (2009)
49. Saito, K., Ishizu, H., Komai, M., Kotani, H., Kawamura, Y., Nishida, KM., *Siomi, H. and *Siomi, MC. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. **Genes Dev** 24, 2493-2498 (2010)
50. Tawaramoto, M., Sasanuma, H., Hosaka, H., Lao, J.P., Sanda, E., Yamashita, E., Hunter, N., Shinohara, M., Nakagawa, A. and *Shinohara, A. Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 (PCSS) is a new Rad51 mediator with Rad51/RecA-like folds. **Nat Commun** 4, e2678 (2013)
51. ●Thirokuo, K., Isotani, A., Yokota, S., Yano, Y., Oshio, S., Hirose, M., Wada, M., Fujita, K., Ogawa, Y., Okabe, M., Nishimune, Y. and *Tanaka, H. OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. **PLoS Genet** 5, e1000712 (2009)

【英文総説】

合計 56 報。代表的なもの 6 報をリストした。

1. *Chuma, S. and Pillai, R.S. Retrotransposon silencing by piRNAs: ping-pong players mark their sub-cellular boundaries. **PLoS Genet** 5, e1000770 (2009)
2. Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M. and *Shinohara, T. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol** 73, 17-23 (2008)
3. *Sasaki, H. and *Matsui, Y. Epigenetic events in mammalian germ cell development: reprogramming and beyond. **Nat Rev Genet** 9, 129-140 (2008)
4. Sharif, J., Endoh, M. and *Koseki, H. Preview: Epigenetic memory meets G2/M; to remember or to forget? **Dev Cell** 20, 5-6 (2011)
5. *Shinkai, Y. and Tachibana, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. **Genes Dev** 25, 781-788 (2011)
6. Wennkamp, S., Mesecke, S., Nédélec, F. and *Hiiragi, T. A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. **Nat Rev Mol Cell Biol** (in press)

【英文書籍】

合計 24 冊。代表的なもの 3 冊をリストした。

1. Kanatsu-Shinohara, M. and *Shinohara, T. Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. **Methods Enzymol** 477, 17-36 (2010)
2. *Kishigami, S. and Wakayama, T. Somatic cell nuclear transfer in the mouse. In “Microinjection: Methods and Applications” ed. by David J. Carroll (Humana Press, USA), **Methods Mol Biol** 518, 207-218 (2009)
3. *Kurimoto, K. and *Saitou, M. A global single-cell cDNA amplification method for quantitative microarray analysis. In “PCR Protocols 3rd edition” ed. by Danny Park (Humana Press, USA), **Methods Mol Biol** 687, 91-111 (2011)

【和文総説】

合計 79 報。本領域の松居靖久が企画し、5 つの研究室が総説を著した一般・学生向けの特集号を 1 冊挙げる。

「実験医学」特集：生殖細胞サイクル（松居靖久・企画）（2009）

【和文書籍】

合計 23 冊。研究代表者が多数関与したもの及び代表的なもの各 1 冊をリスト。

1. 青木不学、小倉淳郎、河村和弘、斎藤通紀、河野友宏、佐々木裕之、田中智、松居靖久「卵子学」（森 崇英・総編集）京都大学学術出版会（2011）
2. 若山照彦「クローンマンモスへの道-クローン技術最前線の技術における発生・再生医療技術を探る」（単著）アドスリー社（2009）

【特許】

合計 20 件のうち主なもの 5 件をリストする。

1. Kono, T., and Obata, Y. “Method of constructing nuclear-transplanted egg, parthenogenetic embryo and parthenogenetic mammal”, European patent No.1661456
2. Kono, T., Obata, Y., Kawahara, M. “Method of constructing nucleus-implanted egg, parthenogenetic embryo and parthenogenetic mammal”, U.S. patent No.7659443
3. 斎藤通紀、林 克彦、名称：Method of inducing differentiation from pluripotent stem cells to germ cells [出願国：米国、出願日：2010 年 8 月 13 日]、出願番号：61/373,563 [出願人：国立大学法人京都大学（100%）]
4. 斎藤通紀、中木文雄、名称：Method of inducing differentiation from pluripotent stem cells to germ cells [出願国：米国、出願日：2013 年 3 月 1 日]、出願番号：61/771,619 [出願人：国立大学法人京都大学（100%）]
5. 篠原隆司、高島誠司、名称：生殖細胞からの多能性幹細胞様細胞の誘導 [出願国：米国、出願日：2012 年 12 月 28 日]、出願番号：PCT/JP2012/084138 [出願人：国立大学法人京都大学（100%）]

【ホームページ】

研究領域の目的、体制、活動及び研究成果等の情報の公開と発信を目的として領域ホームページを立ち上げた。公開シンポジウム、国際シンポジウム、若手勉強会等の開催予告や活動報告を行ったほか、高インパクトファクター（IF>10）のジャーナルに掲載された論文 30 報については一般向けにその内容の解説を行なった。解説はリレー方式で行ない、解説してもらった者が次の解説を行なうこととし、簡潔で分かりやすい表現を心がけた。



英語版も立ち上げ、主な項目について英文で情報発信を行なった。

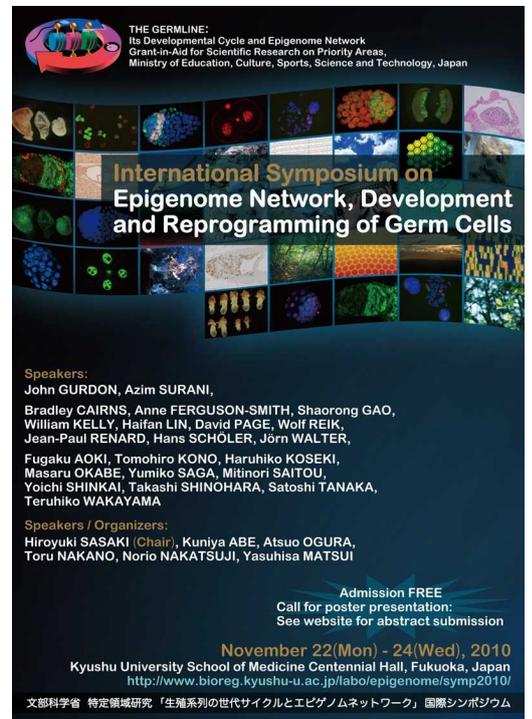
(日本語版) <http://www.brc.riken.go.jp/lab/mcd/germline/index.html>

(英語版) <http://www.brc.riken.go.jp/lab/mcd/germline/eindex.html#>

【領域会議と公開シンポジウム】

本領域では年1回の領域会議を公開シンポジウムとして大都市会場で開催し(2008年秋を除く)、研究成果の公開と発信に努めた。

1. 2008年3月4-5日、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」キックオフシンポジウム(第1回)(世話人:佐々木裕之)、丸ビルホール(千代田区):本領域の発足にあたり領域代表者の佐々木裕之が概要を説明したほか、計画研究代表者数名がこれまでの成果と本領域に於ける計画について発表した。また、海外から招待したWolf Reik (UK)、Xiaodong Cheng (USA)、James Turner (UK)の各先生及び国内から招待した伊藤隆司(東京大学)、木村宏(大阪大学)、小林悟(基礎生物学研究所)、塩見美喜子(徳島大学)、吉崎悟朗(東京海洋大学)の各先生にご講演いただき、研究分野の最新情報の収集に努めた。(参加者約170名)
2. 2008年11月24-27日、「性分化機構の解明「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」合同領域会議(世話人:山田源(熊本大学))、ロマネスクリゾート菊南(熊本):(参加者約160名)
3. 2009年11月26-27日、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第2回公開シンポジウム(世話人:松居靖久)、コクヨホール(港区):各研究代表者による成果発表を行なったほか、吉田松生先生(基礎生物学研究所)による特別講演が行なわれた。(参加者約250名)
4. 2010年11月22-24日、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」国際シンポジウム(第3回) International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells (組織委員長:佐々木裕之)、九州大学医学部百年記念講堂(福岡):海外からJohn Gurdon先生(2012年ノーベル医学生理学賞受賞者:UK)やAzim Surani先生(UK)ら11名の著名な科学者を迎えて開催し、本領域の各研究代表者もそれぞれ成果発表を行なった。非常に活発な討議が行なわれ、その成果はmeeting reportとして国際誌に報告された(下記参照)。ご招待した海外演者は以下のとおり(上記2名を除く):Bradley Cairns (USA)、Anne Ferguson-Smith (UK)、Shaorong Gao (China)、William Kelly (USA)、Haifan Lin (USA)、David Page (USA)、Wolf Reik (UK)、Jean-Paul Renard (France)、Hans Schöler (Germany)、Jörn Walter (Germany)。(参加者約250名)
5. 2011年11月17-18日、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第4回公開シンポジウム(世話人:仲野徹)、千里ライフサイエンスセンター(豊中):各研究代表者による成果発表を行なった。(参加者約200名)
6. 2012年11月21-22日、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第5回公開シンポジウム(世話人:中辻憲夫)、京都大学芝蘭会館(京都):各研究代表者による成果発表を行なった。(参加者約200名)



【国際シンポジウムのmeeting report】

国際シンポジウム International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells (2010年11月22-24日開催)については、その内容が海外参加者によるmeeting reportとして国際誌に掲載され、本領域の研究成果や最新動向の情報発信に一役買った。

Susana M. Chuva de Sausa Lopes and Bernard A.J. Roelen. Symposium Report. The way of the germline: its developmental cycle and epigenome network. *Differentiation* 81, 217-221 (2011)

【学会におけるシンポジウムの共催など】

積極的に学会におけるシンポジウム共催・後援を行ない、本領域の研究代表者による成果発表を促すとともに、総括班費を用いて海外演者の旅費を負担するなど学会への支援活動を行った。

1. 2010年6月22日、The 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (第43回日本発生物学会年会)、Symposium 6: Nuclear reprogramming: from germline to cloned animals、京都国際会議場(京都)

2. 2010年6月24-29日、The 11th International Symposium on Spermatology (国際精子学シンポジウム)、沖縄コンベンションセンター (沖縄)
3. 2012年5月31日、The Joint Meeting of the 45th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology (第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会)、Symposium 4: Epigenomic regulation of gene expression、神戸国際会議場 (神戸)
4. 2012年9月24日、日本遺伝学会第84回大会、公開国際シンポジウム: Epigenomic regulation of cell fate determination and homeostasis、九州大学医学部百年講堂 (福岡)
5. 2012年12月15日、第85回日本生化学会大会、シンポジウム: 生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)

【市民公開講座 (アウトリーチ活動)】

市民公開講座「生命のつながり: 受精の神秘と幹細胞の可能性」(世話人: 中馬新一郎)、2012年11月21-22日、京都大学芝蘭会館 (京都): 領域代表者の佐々木裕之が概要説明を行ったほか、岡部勝が「マウスが解き明かす受精の神秘」について、中辻憲夫が「幹細胞の秘める可能性: 基礎研究から真の実用化をめざす技術まで」と題して講演を行った。(参加者約50名)

10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1 ページ程度）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

【当該学問分野に与えたインパクト】

本領域の最も大きな成果は、斎藤通紀らによる多能性細胞からの生殖細胞誘導技術の確立と、これを利用した機能的な精子・卵子の作出である。この一連の仕事は、我が国の生殖細胞研究を間違いなく世界のトップへと押し上げ、生殖細胞分化の全貌を明らかにするステージを整えた。また、培養細胞から誘導した配偶子から正常なマウス産子が得られたことは驚きをもって社会に迎えられ、多くのマスコミにより報道された。ヒトを含む霊長類における研究には時間を要することが予想されるが、今後は倫理面をふくめた議論が必要となることは明らかであろう。

この他にも、生殖顆粒の機能、小分子 RNA とエピゲノムの制御ネットワーク、レトロトランスポゾン抑制、減数分裂の進行、ゲノム刷り込み、受精のメカニズム、受精後の再プログラム化機構の解明などでインパクトのある成果が多数生み出され、我国が世界の生殖細胞研究をリードする立場になった。

【関連分野への波及効果】

産業動物・生物多様性保持

クローンマウスにおけるエピゲノム異常の同定とその改善によるクローン作出効率の向上や、長期間凍結されていた死体からの子孫の作出など、産業動物の育種や絶滅危惧種の保存に貢献すると思われる技術の向上がもたらされた。上述の培養細胞からの配偶子誘導も今後多くの動物で試みられると思われ、この分野への様々な波及効果が期待される。

生殖医療

不妊や流産の原因となるゲノム・エピゲノム異常が多数同定され、ヒト疾患の病因解明へ貢献した。また、男性不妊患者の精子においてエピゲノム異常が高頻度に発見され、これが生殖補助医療による児にインプリント異常症が多い原因である可能性が示された。一方、マウスの顕微授精胚ではエピゲノム異常・遺伝子発現異常が報告され、胚操作の安全性にも疑問が呈されている。実際に体外受精児・顕微授精児に異常が多いか否かを確定するには疫学調査の結果を待たねばならないが、ベネフィットとリスクを正しく評価し、技術を改善していくため、本領域の成果が活用されることを期待する。

幹細胞生物学・再生医療

生殖細胞分化過程と受精後に生じる大規模な再プログラム化と多能性幹細胞を創出する際の再プログラム化の類似性と異質性が少しずつ明らかになり、その知見が幹細胞の自己複製能維持、品質管理、分化能などの理解へ貢献している。例えば、生殖細胞で同定されたエピゲノム制御因子が多能性幹細胞の分化/未分化状態に大きく影響することが分かり、今後の動向が注目される。

【計画研究代表者の他分野での活躍】

本領域の研究代表者が関連分野で次々と大型研究費を獲得したことからも研究成果の大きさが分かる。本領域の成果が関連分野の発展に繋がることを期待する。

JST 戦略的創造研究推進事業 CREST「人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・制御等の医療基盤技術」

篠原隆司（2008 年～）、古関明彦（2008 年～）、斎藤通紀（2009 年～）

うち斎藤通紀は ERATO「斎藤全能性エピゲノムプロジェクト」へ（2011 年～）

JST 戦略的創造研究推進事業 CREST「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」

眞貝洋一、仲野徹、佐々木裕之（いずれも 2012 年～）