

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際活動支援班）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21737

研究課題名（和文）「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」の国際活動支援についての研究

研究課題名（英文）Support for international research in "epigenome dynamics and regulation in germ cells"

研究代表者

篠原 隆司 (Takashi, Shinohara)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,200,000 円

研究成果の概要（和文）：海外の共同研究者がオランダ、米国、韓国、カナダ、イタリア、チェコスロバキアから来日し、計画研究者10名のうち8名が国際共著論文を発表した。若手研究者支援では、まず若手勉強会で参加者の投票によりベストプレゼンター賞に選ばれた若手研究者10名を海外の学会へ派遣を行うことにより、海外交流により新たな研究の報告を見いだせる機会を提供とした。さらに新学術領域においての年度ごとにお優秀論文を先行を行った。選考に当たっては、領域で発表された全て論文（計画班と公募班を含む）を対象とし、計画班員による投票で優秀論文を決定した。この優秀論文の筆頭著者についても希望の海外学会への参加を領域から負担を行った。

研究成果の概要（英文）：For international collaboration, researchers from six countries have visited Japan. Eight of 10 researchers in this grant group member wrote international collaboration papers. We also supported an international collaboration for the analysis of human embryonic germ cells by providing travel expense to the proposed researcher. For supporting young researchers, we provided international travel funds to X young researchers who wanted to go to international meetings. However, these researchers were selected and awarded "best presentater" during summer retreat. All members who participated in the retreat voted to select best researchers. In addition, we also selected a total of X best papers from all the papers published in each year. The first authors of these papers were also supported for their travel expense to join international conferences.

研究分野：生殖生物学

キーワード：エピジェネティクス 精子形成 卵子形成 核移植

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞研究はこれまでに核移植法の開発、ES細胞の樹立、ゲノムインプリンティングの発見などの基礎的な発見に加えて、*in vitro fertilization*や顕微授精などの開発により現在の我々の生活様式に広汎な影響を及ぼしつつある。これらの研究で近年急速に注目されるようになってきたのは生殖細胞の運命決定におけるエピジェネティック(後天的)な遺伝子制御の役割である。DNAのメチル化やヒストンの修飾は生殖細胞が世代を超えて遺伝的形質を次世代に伝達するときに大きく変化する。実際に高度に最終分化した配偶子が全能性を持つ受精卵を経て初期胚へと至るダイナミックなリプログラミングの際にエピゲノムが重要な役割を果たすことが明らかになってきた。そして、生殖細胞では体細胞には存在しないような独自のエピジェネティック制御因子が同定されており、これらがネットワークを形成することが正常な個体発生に必要と考えられるようになってきた。しかしながら、数多くのエピゲノム制御因子が同定された現在も生殖細胞のリプログラミングにこれらの因子がどのような法則で働くのか、その「文法」は理解されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では次の重要なテーマとして1) 時空間軸をふまえたエピジェネティックネットワークが生殖系列細胞の発生過程においてどのように形成・維持されるのか、その分子機構の解明を4次元的に明らかにすると共に、2) 生殖細胞のエピゲノム操作により、エピゲノムの乱れによる遺伝子発現異常を正常化・機能改善することを目標とする。

3. 研究の方法

共同研究支援

(1) 篠原

①アメリカ合衆国 Texas 大学 John McCarrey 教授「精子幹細胞におけるゲノム・エピゲノム変異の解析」

内容：長期培養を行った精子幹細胞と生体内の精子幹細胞のゲノムとエピゲノム異常について McCarrey 博士が解析を行う予定で進めているが、McCarrey 博士を招聘してさらに詳細な DNA 解析を予定している。McCarrey 博士は霊長類研究センターにも所属しており霊長類研究に精通していることから、最新の当該分野における生殖細胞研究の進展についての情報交換も行う。

②カナダ McGill 大学 Makoto Nagano 准教授「ヒト精子幹細胞の表現型解析とエピゲノムの果たす役割の解析」

内容：この研究ではこれまで研究が進んでなかったヒト精子幹細胞の表現型解析を行う。実験動物の精子幹細胞の表現型解析について精通している篠原が、ヒト精子幹細胞の研究を行っている Nagano 博士との共同研究を

行い、ヒト精子幹細胞の同定およびエピゲノムの果たす役割の解析を行う予定である。この研究は当初の研究と併せて実施する新たな内容となっている。この研究はヒトサンプルの解析が比較的すくない本領域の研究を補完するものとなる。

(2) 小倉

①イタリア Teramo 大学 Pasqualino Loi 教授「ヒストンプロタミン置換による核移植クローン技術の新規開発」

内容：体細胞の核タンパク質であるヒストンを、精子の核タンパク質であるプロタミンに置換し、その細胞を体細胞核移植クローンに用いる。精子ゲノムは卵子内で完全に再プログラム化されることから、この置換により、体細胞ゲノムが効率よく再プログラム化されることが期待される。Loi 教授のポスドク Domenico Iuso 博士が来日し、ドナー体細胞の準備を行い、小倉らのグループがマウス核移植実験を行う。

②チェコスロバキア Institute of Molecular Genetics Helena Fulka 博士「体細胞クローン胚の次世代シーケンサーを用いたエピジェネティクス解析」及び「ノックアウトハムスターを用いた生殖細胞関連遺伝子の機能解析」

内容：前者は、体細胞クローン胚のエピジェネティクス異常を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた解析を行う。後者は、本来、生殖に必須であると考えられているものの、マウスのノックアウトで表現型が出ない因子(アクロシンや卵管タンパク質)をハムスターのノックアウトで試みる。Fulka 博士のラボでは、CRISPR/Cas9 ハムスターノックアウトのプロジェクト準備を進めており、その一環として本研究計画を共同で進める。

(3) 伊川

①韓国 国立ソウル大学 SungHee Baek 教授(韓国科学技術アカデミー准会員)「H3 ユビキチン化不全による精子形成不全の解析」

内容：Baek 博士が H3 ユビキチン化を修飾する PHF7 の生化学機能解析を行い、伊川が遺伝子改変マウスを作成して個体レベルの遺伝子機能解析を行う。1 週間来日して研究打ち合わせを行う。

②アメリカ合衆国 Baylor 医科大 Martin Matzuk 教授(米国科学アカデミー会員)「不妊関連遺伝子のノックアウトマウス作成とその機能解析」(継続研究)

内容：Matzuk 博士と伊川で候補遺伝子を選別。Matzuk 博士が定法による遺伝子破壊マウス作製、伊川が CRISPR/Cas9 を使った遺伝子破壊、ノックインマウスの作製を行う。Matzuk 博士が精子形成、伊川が精子成熟～受精を解析する。妊孕性に必須因子について、Baylor 医科大学 DNA-Encoded Chemical Library (DEC-TEC 技術)を用いて両者で阻害小分子スクリーニングを行う。Matzuk 博士が 2 週間

× 2 回来日し、阪大に滞在して共同研究を行う。

若手の海外派遣

(1) 若手勉強会および優秀論文発表者への支援

本領域では毎年夏に若手研究者が主催する勉強会を行っている。二泊三日の勉強会では連日若手研究者が順番に発表するなかで、最終日に公募研究者を含めた中から優秀な発表者を参加者全員の投票で決定している。優秀発表者は合宿においては賞状と賞金を授与されるのに加えて、次年度の合宿の企画と運営を任されることとなっている。そこで本申請ではこの若手勉強会を活用して、従来の賞状と賞金に加えて、ベストプレゼンターが自ら興味をもった海外の学会もしくは研究室でその研究成果をアピールすることを支援する制度を設けたい。領域内の成果を積極的に海外で宣伝する目的で海外学会への派遣を行うことは、海外の研究者との共同研究へと発展する可能性に繋がるのみならず、将来的にはポストドクとして学ぶ場としての留学先の選択にも役立ち、生殖細胞研究の新領域の開拓にも広がりうる。

若手勉強会の支援に加えて、各年度ごとに際立ってすぐれた論文を書いた著者についても本領域の成果をアピールする意味で海外学会への派遣を行う。この選別については、計画班メンバーに候補の著者（公募領域を含む）を領域代表に推薦してもらい、年間 2-3 名程度を海外への主要学会へと成果発表と研究打ち合わせのために派遣する。

いずれのケースでも帰国後には領域の web page に内容を報告することとする。

(2) 新規規技術習得

この支援は各計画班代表が領域代表へ要請することで決定する。新規の技術開発の導入により著しく研究の促進が期待できる場合、領域代表者へ研究遂行上必要な理由を申請するものとする。必要が認められた場合には在外研究として支援を行う。帰国後にはすみやかに領域内へ技術導入成果を還元するために、領域内ネットワークを利用してアピールすると共に web page に内容を報告する。必要とあれば公募班員も含めた領域メンバーに対して技術講習会を行う。

4. 研究成果

共同研究支援

(1) 篠原

① John McCarrey 教授

長期培養を行った GS 細胞、embryonic fibroblast, ES 細胞について BigBleu マウスを用いて突然変異頻度解析を行った（投稿準備中）。2015 年 5 月 9 日-5 月 27 日に来日し、意見交換を行った。

② Makoto Nagano 教授

2017 年 7 月 12 日-8 月 3 日に来日し、ヒト精巣サンプルを用いて精子幹細胞の表面抗

原の解析を行った。2 個の候補抗原の同定に成功した。

③ Kyle Orwig 教授

配偶子形成班（小林悟代表）により行われた国際シンポジウムに参加した際に、2017 年 7 月 23 日—7 月 25 日に京都にて研究打ち合わせを行った。その後、ヒト精子幹細胞の培養についての共同研究を開始した。

(2) 小倉

① Pasqualino Loi 教授

プロタミン置換処理をした体細胞を用いた核移植クローニングの共同研究をおこなった。2017 年 8 月 2 日-2017 年 8 月 19 日に来日し、打ち合わせを行なった。その結果、クローン産子の作出に成功した。滞在中に国際シンポジウムに参加し、プレゼンター賞を受賞した。

② Helena Fulka 博士

卵子 PIWI-piRNA 系の解析研究を開始し、2017 年 4 月 1 日-2018 年 3 月 31 日まで滞在し、解析用のノックアウトハムスターの作出に成功した。計画班である佐々木との共同研究を開始した。

(3) 伊川

① SungHee Baek 教授

Phf7 の KO マウス作製と機能解析の共同研究を実施した。KO マウスが雄性不妊であることから、H29 年度は PHF7 の酵素ドメインのアミノ酸置換マウスを作成した。

② Martin Matzuk 教授

2017 年 9 月 20 日-10 月 3 日、および 2018 年 1 月 17 日-24 日に滞在して精巣特異的発現遺伝子機能解析の意見交換を行った。種保存性の高い TCTE1 が精子鞭毛運動に必要であるという共同研究成果を PNAS に発表した（PMID: 28630322）。さらに、阪大で特任研究員として雇用していた同研究室出身の Julio Castaneda 博士を、特任助教に昇任させて共同研究を継続している。これと並行して共同研究を継続するために、2017 年 4 月 10 日—2024 年 3 月 31 日の部局間学術交流に関する協定書を締結した。

若手の海外派遣

(1) 若手勉強会および優秀論文発表者への支援

2016 年に 4 名、2017 年に 10 名の若手研究者の海外派遣を行った。ここで選ばれた研究者は全員がこれまでの若手勉強会でベストプレゼンター賞を受賞したものである。英国、カナダ、米国、中国での国際学会での発表を行っている。

(2) 新規技術習得

ドイツのグループとの共同研究のために、公募研究である、阿部班の若手研究者が派遣された。国内では入手困難であるヒト胎児期の生殖細胞についての研究を行った。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Castaneda JM., Hua R, Miyata H, Oji A, Guo, Y, Cheng Y, Zhou T, Guo X, Cui Y, Shen B, Wang Z, Hu Z, Zhou Z, Sha J, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Yu Z, Ramirez-Solis R, Ikawa M, Matzuk MM, Liu M. (2017). TCTRE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, E5370-E5378. doi: 10.1073/pnas.1621279114.
- ② Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Ogonuki N, Ogura A, Morimoto H, Cheng PF, Eisenman RN, Trumpp A, Shinohara T. (2016). Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 30, 2637-2648. doi: 10.1101/gad.287045.116.
- ③ Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isojani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. (2016). Genome engineering uncovers 54 evolutionally conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 113, 7704-7710. doi: 10.1073/pnas.1608458113.
- ④ Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. (2016). A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer? *Trends Biotechnol.* 34, 791-7. doi: 10.1016/j.tibtech.
- ⑤ Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV, Shinohara T. (2016). The Luteinizing Hormone-Testosterone

Pathway Regulates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal by Suppressing WNT5A Expression in Sertoli Cells. *Stem Cell Reports.* 7, 279-91. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.005.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 益子 あかね
Date: February 5-February 7, 2017
Conference: Keystone Symposium @ Fairmont Banff Springs, Alberta, Canada
Title: No presentation
- ② 古田明日香
Date: October 4-October 8, 2016
Conference: CSH meeting Germ Cells @ Cold Spring Harbor Laboratory
Title: Induction of totipotent fraction in ES cell culture
- ③ 濱田 裕貴
Date: September 12-18, 2016
Conference: IFPA 2016 Placenta: Back to the Basics @ Portland, Oregon
Title: Incomplete reprogramming of germline DNA methylation in the human placenta
- ④ 畑中 勇輝
Date: July 13-July 17, 2016
Conference: Mouse Genetics 2016 @ Orlando World Center Marriott
Title: Histone H3R17me2a Mark Recruits Tet3 to Initiate Active DNA Demethylation in mouse Zygotes
- ⑤ 福田 胡桃
Date: July 13- July 17, 2016
Conference: The Allied Genetics Conference @ Orlando, Florida
Title: Role of a 3'UTR-dependent DAZL suppression in mouse postnatal ovary.
- ⑥ 松崎 仁美、谷本 啓司
Date: July 13-July 17, 2016
Conference: Mouse Genetics 2016 @

Orlando World Center Marriott

Title: Imprinted DNA methylation status can be reconstituted by combining activity of distinct H19 ICR elements in mice

⑦ 前之原 章司

Date: May 9-13, 2016

Conference: The 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription @ Suzhou, China

Title: Essential role of Uhrfl during oocyte growth and preimplantation development.

⑧ 白根 健二郎

Date: May 9-13, 2016

Conference: The 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription @ Suzhou, China

Title: Global landscape and regulatory principles of DNA methylation reprogramming for germ cell specification by mouse pluripotent stem cells.

⑨ 樺山 由佳

Date: May 9-13, 2016

Conference: The 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription @ Suzhou, China

Title: Mutations in PLD8 and MILI in mouse oocytes reveal sex dependent differences in piRNA regulation.

⑩ 宮田 治彦

Date: February 27-March 2, 2016

Conference: Biophysical Society 60th Annual Meeting @ Los Angeles Convention Center

Title: Sperm Calcineurin is Necessary for Midpiece Flexibility and Male Fertility

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/research_summary.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 30322770

(2)研究分担者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・
教授
研究者番号 : 50221271

小倉 淳郎 (OGURA, Atsuo)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技
術室・室長
研究者番号 : 20194524