

【領域番号】 5 2 9	【領域略称名】 生殖系列
【領域代表者（所属）】 佐々木裕之（九州大学・生体防御医学研究所・教授）	
<p>【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとしたか】</p> <p>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。）</p> <p>【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】</p> <p>目的の達成に係る主な研究成果</p> <p>研究項目 A01：生殖系列の分化決定機構</p> <p>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 (<i>Dev Cell</i> 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 (<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2011)。</p> <p>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 (<i>Development</i> 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。</p> <p>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 (<i>Development in press</i>)。</p> <p>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</p> <p>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 (<i>Biol Reprod</i> 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見つけた (<i>EMBO J</i> 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。</p> <p>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 (<i>Biol Reprod</i> 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 (<i>Biol Reprod</i> 2009)。</p> <p>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 (<i>Genes Dev</i> 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。</p> <p>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 (<i>Nature</i> 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 (<i>Dev Cell</i> 2011)。さらに、インプリント遺伝子 Rasgrf1 のメチル</p>	

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わ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】

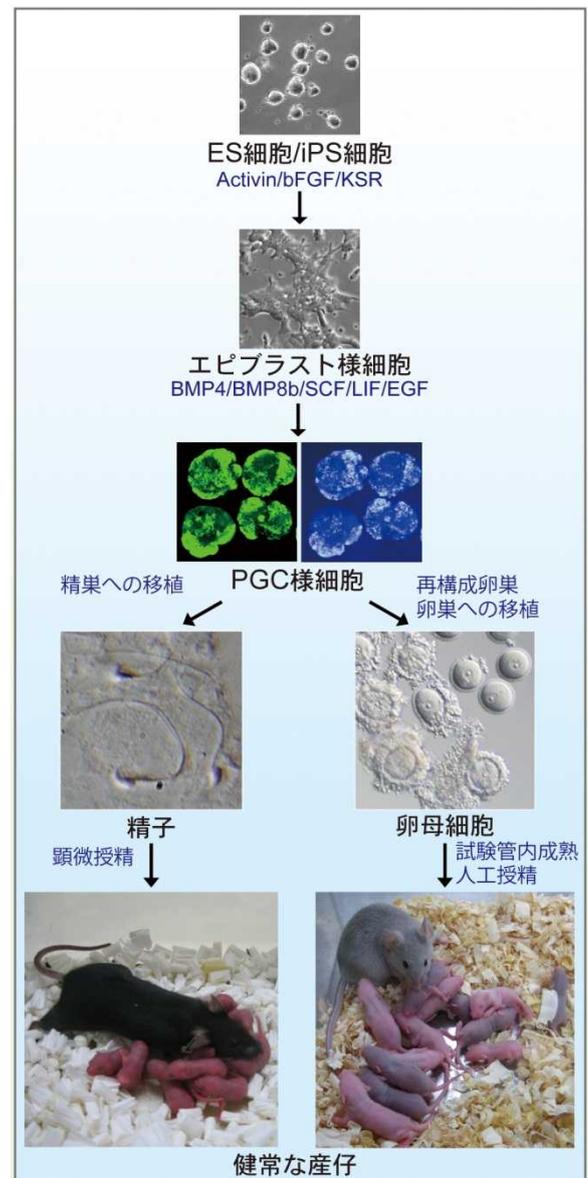
目的の達成に係る主な研究成果

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、無血清培地でエピブラストから 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ピブ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「8. 主な研究成果(発明及び特許を含む)」で述べる。