

2013 年度 日本生殖工学会学術集会

プログラムおよび講演要旨集

2013 年 6 月 30 日(日)

明治大学リバティタワー

2013 年日本生殖工学会学術集会
2013 年 6 月 30 日(日)
明治大学リバティタワー8F
1083 教室

13:00 ~ 13:05 開会の辞

柏崎 直巳(麻布大)

13:05 ~ 14:05 一般講演

座長:牛島 仁 (日獣大) / 中井 美智子(生物研)

大貫 雄司 (日獣大).....	3
藤原 克祥 (麻布大院).....	4
天羽 杏実 (IVF なんばクリニック).....	5
谷原 史倫 (山口大院).....	6

14:05 ~ 15:35 シンポジウム I「ヒト胚の初期発生」

座長:乾 裕昭(乾マタニティクリニック) / 柏崎 直巳(麻布大)

講演 I :「Time-lapse 映像で見るヒト初期胚発生過程の新知見」

見尾 保幸(ミオ・ファティリティ・クリニック).....	7
------------------------------	---

講演 II :「ノルエピネフリンによるヒト胚盤胞の品質評価」

中田 久美子(山下湘南夢クリニック).....	9
-------------------------	---

15:35 ~ 15:50 Coffee Break

15:50 ~ 17:20 シンポジウム II「生殖細胞の分化」

座長:菊地 和弘(生物研) / 伊藤 潤哉(麻布大)

講演 III :「体外培養における生殖細胞分化」

林 克彦(京都大院).....	10
-----------------	----

講演 IV :「生殖系列のリプログラミング(メチローム解析)」

河野 友宏(東京農大).....	11
------------------	----

17:20 ~ 17:25 閉会の辞

後藤 正幸 (明治大)

17:30 ~ 19:30 懇親会 (リバティタワー 23F サロン燦(さん))

改変した最少容量ガラス化法によるウシ卵核胞期卵の生存性の低下

Survival loss of germinal vesicle (GV) stage bovine oocytes vitrified with modified-MVC vitrification method

大貫 雄司・小島 萌菜美・影山 敦子・岡田 幸之助・牛島 仁
日本獣医生命科学大学

【目的】ガラス化保存法は低温耐性が高い細胞を高率に保存できることからウシ雌性生殖細胞の保存に活用されている。ガラス化法の中で最少容量ガラス化法は CPA 濃度が他の方法よりも低く、ガラス化専用器具であるクライオトップ (CT: 北里バイオファルマ) の汎用性が高いため、低温感受性の高い卵や胚の保存に利用されるとともに、作業性を改変した方法が開発されている。これらの改変された方法が耐凍性に及ばず影響を調べた。

【材料および方法】屠場由来の食肉処理場由来のウシ卵巣から重層の卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) を吸引法により採取した。凍結保護剤の浸透を促すため、 $130\ \mu\text{m}$ のピペットで COCs を 1 回ピペッティングすることにより卵丘細胞を部分的に除去し、透明帯の一部を露出させた。これらの GV 期ウシ COCs を基礎液 (20%FCS+TCM199) に移し、平衡液 (EG7.5%+DMSO7.5%) を 3 回に分けて添加した後に平衡液中で 9 分間平衡した。ついで、ガラス化 (EG15%+DMSO15% +0.5M Suc) に移動して 1 分以内で強制的にガラス化液に置換させた後、再度新しいガラス化液に移した。0.5 分以内に CT シート状に移動させ、周囲のガラス化液を吸い取ってから速やかに液体窒素に浸漬することにより、超急速に COCs をガラス化し、その後 7~10 日間保存した。加温は培養器で 39°C に温めた加温液 (1MSuc) に 1 分間浸漬した。次いで、希釈液 (0.5M Suc) に 3 分間浸漬した後、基礎液 (20%FCS+TCM199) に 5 分間浸漬してから、 39°C 、5%CO₂ で 24 時間体外成熟培養した。実験 1 では、ガラス化法を改変する事を目的に、①平衡液の浸漬時間を 15 分からさらに 5 分延長する (高橋ら 2011)、②VS 液に卵子を暴露する時間を 1 分 (対照区) から 3 分に延長する (Inui et al. 2011)、③融解時にクライオトップのシートから COCs が剥がれ易くするため液量を $2\ \mu\text{l}$ にする (橋谷田ら 2012)、④COCs を加温液に 3 分間暴露する (作野ら 2010)、⑤全ての操作を 24°C (Akiyama et al. 2010)、⑥ 39°C で実施する (Sripunya et al. 2010) 実験区を設け、ガラス化した COCs の体外成熟率を比較した。実験 2 では、⑧実験 1 で確認した条件を参考にして MVC 法の精度を確認するため、COCs に 5 回連続してガラス化と加温の負荷をかけ、その後の体外成熟率を調べた。

【結果】対照区のガラス化-加温後のウシ GV 期卵の成熟率は 91.1% (51/56) で、非ガラス化卵の成熟率 97.1% (67/69) と同等であった。これに対し、生存は全ての区の COCs で確認されたものの、成熟率はそれぞれ 63.3%、55.0%、70.0%、66.7% と対照区よりも有意 ($p < 0.05$) に低下した。常法のガラス化で高ランクの GV 卵を 5 回繰り返し行ったところ、91.3% と GV 期卵は高い成熟率を有した。これらのことから、MVC 法を用いたガラス化法は、適正な温度管理、時間管理、浸透圧管理ならびに液量管理に基づく作業が必要で、これらの改変によって卵の生存性は著しく低下すると考えられる。

ガラス化保存したマウス成熟卵および未成熟卵の発生能

藤原 克祥¹・小早 菜月²・伊藤 潤哉^{1,2}・柏崎 直巳^{1,2}

¹麻布大学大学院 獣医学研究科

²麻布大学 獣医学部

【目的】哺乳類卵母細胞の超低温保存は、効率的な遺伝資源保存やヒト生殖補助医療への応用に重要な技術である。成熟卵(排卵卵子)および未成熟卵(卵胞卵子)における効率的な超低温保存は、個体復元時に雄性配偶子の遺伝的背景が選択できることから貴重な技術となりえる。しかし成熟卵および未成熟卵は、受精卵および胚と比較すると加温後の受精能・発生能が著しく低下する。本研究では、マウス成熟卵および未成熟卵におけるガラス化保存の改良を目的とし、ガラス化保存成熟卵の卵丘細胞付着の有無が体外受精(IVF)後の発生能に及ぼす影響について検討した。さらに、未成熟卵においても同様に体外成熟(IVM)および IVF 後の発生能について検討した。

【方法】(実験 1) 成熟卵は hCG 投与 15 時間後に ICR 雌マウスの卵管膨大部から採取した。卵丘細胞が付着した成熟卵(COC 区)および除去した卵(DO 区)は、Ca 無添加 PB1 に 7.5% EG および 20% ウシ胎児血清(FCS)を添加した平衡液に 3 分間平衡させた後、Ca 無添加 PB1 に 30% EG, 20% FCS および 0.5 M Sucrose を含むガラス化保存液に 1 分感作させ、クライオトップによりガラス化保存した。成熟卵は 1 時間の回復培養後に IVF および体外発生培養を行った。IVF は BDF1 雄マウスの凍結融解精子を用いて行い、生存率、前核形成率および胚盤胞率を調べた。さらに IVF 由来 2 細胞期胚を偽妊娠誘起したレシピエント雌マウスの卵管内に胚移植した。(実験 2)過剰排卵処置した雌マウス卵巣から採取した未成熟卵は実験 1 と同様の方法でガラス化保存した。加温した未成熟卵は 14 時間の IVM 後に IVF を行い、生存率、前核形成率、胚盤胞率および産子率を調べた。

【結果】ガラス化保存後の生存率は成熟卵、未成熟卵ともに 90%程度を示した。(実験 1)COC 区の前核形成率および胚盤胞率(75.4%および 66.3%)は、DO 区(40.5%および 24.3%)と比較し有意に高い値を示し($P<0.01$)、新鮮区(68.9%)と比較して同程度の産子率(68.7%)を示した。(実験 2)ガラス化保存した未成熟卵の前核形成率は 46.6%であり、前核形成胚はほぼ全てが胚盤胞へと発生した。さらに、ガラス化保存した未成熟由来胚の 36.4%が産子へと発生した。本研究により、成熟卵は卵丘細胞が付着した状態でガラス化保存することで、加温後に体外発生能が改善され、産子への発生能を有することが明らかとなった。さらに、同様の方法を用いてガラス化保存した未成熟卵も IVM および IVF 後に高い生存性と産子への発生能を有することが示された。

一般講演

閉鎖型凍結法による凍結融解単一胚盤胞移植によって生まれた児の予後調査

天羽 杏実・橋本 周・濱 聡子・大住 哉子・森本 義晴

医療法人三慧会 IVF なんばクリニック

胚の凍結保存を行う際に、従来の開放型凍結法では、胚が液体窒素と直接接触することによって液体窒素からの細菌やウイルスによる汚染が危惧されている。近年開発された閉鎖型凍結法では、液体窒素と接触しないため、汚染リスクの低減が期待されている。本研究では、閉鎖型と開放型の胚移植後の児への影響を比較した。2012年1～9月に凍結融解単一胚盤胞移植を実施した253周期(閉鎖型:105周期 vs. 開放型:148周期)から得られた児の予後調査を行い、閉鎖型と開放型の比較検討を行った。着床率、胎児心拍確認率、8週以上の継続妊娠率(閉鎖型:53.3%、46.7%、82.1% vs. 開放型:53.4%、50.7%、86.1%)に有意差は見られなかった。出産に至った85人(閉鎖型:34人、開放型:51人)の児のうち、出生児の体重、在胎日数、奇形率(閉鎖型:2963g、270.9日、3.4% vs. 開放型:3018g、275.2日、0.0%)に有意差は見られなかった。以上の結果から、閉鎖型凍結法は発生能を損なうことなく、従来の開放型凍結法と同等の妊娠成績を示し、児を得られることが明らかになった。

ブタの体外受精時に透明帯は精子-卵子融合因子 Izumo の発現を促進し
卵母細胞への精子侵入を高める

谷原史倫^{1,2)}, 中井美智子²⁾, Nguyen Thi Men^{2,3)}, 加藤徳子^{2,4)}

野口純子²⁾, 金子浩之²⁾, 菊地和弘^{1,2)}

¹⁾山口大院連獣, ²⁾農業生物資源研, ³⁾筑波大院生命環境, ⁴⁾麻布大院獣医

透明帯(ZP)は、多精子侵入の防御には重要な機能を有するが、ヒト卵母細胞(以下、卵)では体外受精(IVF)の際に Zona drilling 等の方法で直接精子が卵に到達することで受精率が向上することが示唆されている。しかし、ヒトを含む哺乳動物の卵の IVF 時において、卵への精子侵入に関する ZP の機能については不明な点が多い。一般には ZP には多精子侵入を防ぐ透明帯反応があると考えられているが、我々はこれまでに、ブタにおいて ZP を除去して IVF を行うと、逆にブタ卵への精子侵入が低下すること¹⁾、および ZP を通過した精子は効率よく卵細胞膜と融合することを示した²⁾。精子と卵細胞膜の膜融合に関する何らかの因子の発現を ZP が促している可能性がある。マウス、ヒトおよびブタ精子において、sperm-egg fusion に関連する因子として報告されている膜タンパクに Izumo があり^{3,4)}、その候補となりうる。そこで、本研究では ZP の存在が Izumo の発現と卵への精子侵入に及ぼす影響を検討した。

Anti-Izumo1 antibody (Santa Cruz Biotechnology)を添加した体外受精培地を用いて ZP 除去卵の IVF を行い、精子侵入状況を調べたところ、抗体濃度を高くすると精子侵入は有意に低下した。また、同抗体を用いて Izumo の免疫蛍光染色を行い、先体を失った精子について Izumo の発現を調べたところ、ZP を通過することで Izumo の発現が促進されていた。その結果として卵への精子侵入が促進されていると推察される。今後、Izumo の発現を促す因子を解明することで、ブタのみならずヒトの IVF においても受精率の向上に応用できると期待される。

1. Tanihara F et al. J. Reprod. Dev. 2013 (印刷中).
2. 谷原史倫ら. 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012, P-51.
3. Inoue N et al. Nature 2005; 434: 234–238.
4. Kim E et al. Reprod. Domest. Anim. 2012; 48: 90–97.

シンポジウム I 「ヒト胚の初期発生」

Time-lapse 映像で見るヒト初期胚発生過程の新知見

見尾保幸

ミオ・ファティリティ・クリニック

リプロダクティブセンター

生殖補助医療 (ART) の発展に伴い、ヒト初期胚の発生過程の形態学的観察が可能となり、初期胚の発生機序の解明、ならびに、ヒト配偶子や初期胚の体外培養環境の改善が飛躍的速度で進められてきた。しかし、従来の形態学的観察は、非連続的静止画像における解析であり、詳細な検討には自ずと限界が存在した。我々は、長期間にわたり胚発生過程を非侵襲的に観察可能な体外培養装置 (Time-lapse cinematography; TLC) を独自に構築し、これを用いたヒト初期胚発生過程の解析を進めてきた^{1,2)}。

TLC に供した観察卵子は、治療用卵子と研究目的胚の 2 種類である。治療用卵子のうち、IVF 卵子は、媒精後 1 時間で緩やかな機械的操作にて卵丘細胞を除去し、透明帯に最も深く侵入した精子に焦点を合わせて観察を開始した。また、ICSI 卵子は、通常操作にて精子注入後直ちに観察を開始した。いずれも本研究に同意が得られた治療周期において、複数個得られた成熟卵子のうちの 1 個を選択し、TLC に供した。TLC により一定期間 (約 40 時間) 観察後、形態良好胚に発育した初期胚は、その後の治療のために凍結保存した。

一方、治療用に凍結保存中の初期胚で、今後、治療に用いる意志のなくなった胚に関しては、本研究への同意を得た後、研究目的胚として TLC 観察に供した。研究目的胚は、融解後一定期間体外培養し、良好胚であることを確認後、TLC を開始した。

まず、TLC のために独自に構築した体外培養装置を説明する。倒立顕微鏡全体を覆う純アクリル製専用チャンバーと、顕微鏡ステージ上の小型専用チャンバーにより、専用ガラスディッシュ内の培養液マイクロドロップ (5 μ l) が一定条件 (温度: 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C、pH: 7.37 \pm 0.02) となるようチャンバー内温度、CO₂ 流量を調整した。TLC 観察は、装置全体を遮蔽し、一定の撮影条件 (露光時間: 1/20 秒、撮影間隔: 2~10 分、撮影枚数: 2000~8000) 下に、ノマルスキー微分干渉装置を用いて、治療用卵子では約 40 時間、研究目的胚では最大 120 時間継続した。

以上の条件下で、観察した映像を解析し、得られた新たな知見のうち、本講演では、1) 受精/前核形成過程^{2,3,4)}、2) 第一/第二卵割過程^{2,3)}、3) 胞胚腔形成過程^{2,3)}、4) Hatching 過程^{2,3)}、5) その他³⁾、の時期の興味ある映像を紹介し、時間の許す限り解説してみたい。ヒト生命の誕生とその発生過程は、自然の営みの中でも究極的魅力と躍動美に溢れていると実感する。今後も、ヒト初期胚発生過程において、未だ無数に存在する未知の領域に TLC を駆使して出来る限り迫ってみたいと考えている。

文献

1. Payne D, Sean P.F, Michael F.B and Colin D.M: Preliminary observations on polar

body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*, 12: 532, 1997.

2. Mio Y.: Morphological Analysis of Human Embryonic Development Using Time-lapse Cinematography, *J. Mamm. Ova Res.* 23: 27, 2006.
3. Mio Y, Maeda K: Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am. J. Obstet Gynecol.* 199: 660, 2008.
4. Mio Y., et. al.: Possible mechanism of polyspermy block in human oocytes observed by time-lapse cinematography. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 29: 951-6, 2012.

シンポジウム I 「ヒト胚の初期発生」

ノルエピネフリンによるヒト胚盤胞の品質評価

中田久美子

山下湘南夢クリニック高度生殖医療研究所

近年、着床前診断などの遺伝的解析が進む一方で、胚盤胞の質の評価は一般的に一時的かつ形態的な観察にとどまっている。胚盤胞の選択が難しいことを示す臨床的な事例として、同一患者の同一周期に採卵した卵子由来かつ、体外培養液での同一の発育速度で、同一時間(体外受精から123時間目)に凍結した、良好な2個の胚盤胞が得られたケースで、1回目の移植用に選択した胚盤胞では妊娠せず、もう片方の胚盤胞を用いて移植を行った結果、妊娠成立したという様な例が、不妊治療の現場では数多く経験されている。2つの胚盤胞が全く同一の評価結果であったにもかかわらず、初回では妊娠せず、後者では妊娠着床に至ったことは、現行評価法の限界を示しており、妊娠率向上に 관련된 精度の高い評価法が待ち望まれている。

胚盤胞を評価する上で最も望ましいのは、胚そのものを被検体とせず、非侵襲的に判定できることであり、培養液中に含まれる胚からの分泌物は、条件を満たす有力な検体である。ヒトとマウス胚の培養液中に含まれるタンパク質バイオマーカーについて、飛行時間型質量分析計を用いて調べた報告では、ユビキチンが同定されているが[1]、妊娠率との関連性は何ら示されていない。同様の報告としては、受胎の直後から胎児の栄養膜合胞体層(胎盤の一部)で作られることが知られる、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン(β hCG)を調べた電気化学発光免疫測定法(ECLIA)による結果から、胚培養液中 β hCG濃度と妊娠率の相関性が示唆されているが[2]、発生の過程で受精卵及び胚が、ノルエピネフリンを分泌するという知見は皆無である。

胚盤胞培養後に廃棄される培養液を被検体として、超高速液体クロマトグラフィーを用いた解析により培養液中に特異的に含まれる成分の同定を行い、更にその定量を実施したところ、ノルエピネフリン(ノルアドレナリン)が着目すべき成分であることを見いだした。更に解析を進めた結果、移植後に着床し妊娠が継続する胚盤胞の群が培養液中に分泌するノルエピネフリンの量と、移植をしても着床しない胚盤胞のノルエピネフリン分泌量に有意な差があることを発見した。

特許出願 整理番号:2013P7540 特願 2013-040989 提出日:平成 25 年 3 月 1 日

【発明の名称】胚盤胞培養液中のノルエピネフリン量によるヒト胚盤胞の評価方法

【発明者】中田久美子, 山下直樹

[1]Katz-Jaffe MG, et al., (2006) Fertil Steril. Sep;86(3):678-85.

[2]Xiao-Yan C, et al., (2012) J Assist Reprod Genet. Dec 29. [Epub ahead of print]

シンポジウムⅡ「生殖細胞の分化」

体外培養における生殖細胞分化

林 克彦

京都大学医学研究科機能微細形態

多能性幹細胞(ES 細胞や iPS 細胞)から特定の細胞へ分化させる体外培養系の確立は、再生医療や創薬のための評価系のみならず、基礎的な細胞分化のメカニズムを解明する上で重要である。我々は近年の研究において、マウスの ES/iPS 細胞から体外培養により分化させた始原生殖細胞に由来する卵子を作製し、それらの卵子から健常な個体を誕生させた。

すべての生殖細胞のもとである始原生殖細胞は、マウスにおいては多能性細胞であるエピブラストから分化する。始原生殖細胞はその後、将来の卵巣や精巣である生殖巣に移動することにより卵原細胞や精原細胞に分化する。我々は ES/iPS 細胞由来の始原生殖細胞を胎仔卵巣の体細胞と凝集培養し、成体の卵巣被膜下に移植することにより卵子を得た。得られた卵子は体外受精により健常で妊孕性のある個体になった。

今回のシンポジウムではこれらの結果とともに、最近の知見を紹介してこの技術の将来的な展望について議論したい。

シンポジウムⅡ「生殖細胞の分化」

生殖系列のリプログラミング(メチローム解析)

河野友宏

東京農業大学応用生物科学部

1. はじめに

次世代にゲノム情報を継承する生殖細胞の分化制御には、エピジェネティクスに基づくゲノムのリプログラミング機構が深く関与している。今から7年まえに登場した次世代シーケンサーは、桁違いに膨大な塩基配列を超高速で解読することが可能で、ゲノム解析に技術革命をもたらした。次世代シーケンサーは単純なゲノム解析に止まらず、生命現象を明らかにする様々な解析への応用が可能で、“DNA メチローム解析”への展開も期待されている。DNA メチロームとは、エピジェネティクス修飾の主要な要素である DNA(シトシン)のメチル化状態をゲノムワイドに解析した情報を指す。DNA メチル化に異常が起これば、個体発生、先天性疾患、がん化、不妊などに重篤な問題を引き起こすことが知られている。我々は生殖系列への分化および生殖細胞形成におけるリプログラミング機構の理解を深めるために、次世代シーケンサーを用いてマウス生殖系列細胞の DNA メチローム解析を実施してきた。ここでは、これまでの成果から全容が明らかになりつつある生殖系列で行われている DNA メチロームのリプログラミングについて報告する。

2. マウス生殖細胞の DNA メチル化マップの作製

方法: C57BL/6 マウスの精巣上体尾部由来の精子、ならびに卵核胞期の卵子(10000個)からゲノム DNA を回収し、バイサルファイトシーケンス用の DNA ライブラリーを作製した。イルミナ社の Genome Analyzer II および HiSeq 2000 を用いて、それらのライブラリーの大規模高速シーケンス解読を行い、全ゲノム中の約 2.1×10^6 CpG サイトにおけるシトシン残基メチル化の有無を決定し、雌雄生殖細胞の DNA メチル化マップを作製した。

結果: 精子ではゲノム全体にわたり高メチル化状態(平均メチル化:89.4%)である一方、卵子では高メチル化と低メチル化状態に二分しており、全体として中程度のメチル化状態(40.0%)であることが明らかになった。さらに、哺乳類ゲノム中に散在する CpG アイランド(CpG 配列が密に存在する領域)の解析では、精子に比べむしろ卵子で高メチル化領域がより多く存在することを突き止めた。また、ゲノムインプリント制御領域における精子と卵子ゲノム間で明確なメチル化状態に差異が確認できるメチル化差異領域(Differentially methylated region, DMR)として、1329 の卵子型 DMR と 349 の精子型 DMR をそれぞれ同定した。

3. マウス始原生殖細胞の DNA メチル化マップの作製

方法: 胎齢 10.5、13.5 および 16.5 日齢 Oct4-GFP マウス胚から FACS 法によるソーティングによりマウス始原生殖細胞を雌雄それぞれ 2000-4000 細胞回収した。微量サンプルからの調整が可能である Post-Bisulfite Adaptor Tagging(PBAT)法により、DNA メチロー

ム解析用の DNA ライブラリーを作製した。HiSeq2000 (Illumina) を用いて大規模高速シーケンスを行い、それらの結果から雌雄始原生殖細胞の DNA メチル化マップを作製した。結果：解析した胎齢を通して雌雄始原生殖細胞間に CpG メチル化の性差が認められ、脱メチル化過程のメカニズムが雌雄で異なることを示した。発生に伴う脱メチル化の進行状況を見ると、胎齢 10.5 日始原生殖細胞ではすでに明確な脱メチル化が生じており、13.5 日始原生殖細胞ではほぼ完全に脱メチル化状態であることが確認できた。さらに、16.5 日齢の雄始原生殖細胞ではメチル化が上昇し始めていることを認めた。X 染色体上では、CpG アイランドならびにインプリント制御領域 (ICR) のメチル化の消去とともにゲノムワイドな脱メチル化が生じていた。一方、CpG-rich な一部のレトロトランスポゾンにおいて高度なメチル化が残存していることが明らかとなった。また、16.5 日齢においては父方 ICR のメチル化の上昇が認められたが、興味深いことに母方 ICR の一部も雌雄始原生殖細胞間のメチル化差異領域として同定することができた。

4. おわりに

生殖系列における DNA メチロームの解析に成功し、リプログラミングの推移を明らかにすることができた。生殖細胞の新たな評価基準を設ける上でも重要なステップといえる。このような解析法の開発と普及は卵子だけではなく初期腫瘍や特定部位の細胞などの極めて困難な検体解析、さらには体細胞クローンにおけるリプログラミングの正確な評価にも大きく貢献できる。

参考文献

1. Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H, Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genetics*, 9(4):e1003439 (2013).
2. Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T, High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Research*, 23(4): 616-627 (2013)
3. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T, Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genetics*, 8(1): e1002440 (2012).
4. Chan M, Smith Z, Egli D, Regev A, Meissner A, Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nature Genetics*, 44: 978-980, (2012).



2013 年度 日本生殖工学会学術集会
プログラムおよび講演要旨集
編集・発行 SRE[日本生殖工学会]
発行代表者 柏崎 直巳
〒252-5201
神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内
電話:042-769-2339
FAX:042-769-1762
発行 平成 25 年 6 月 30 日