

始原生殖細胞の分化誘導における糖代謝の役割

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター

林 陽平

1. 背景と目的

本研究は、多能性幹細胞から始原生殖細胞が形成され分化していく際の、代謝調節の役割とその制御の仕組みを明らかにすることを目的として行った。

生殖細胞系列は、受精を介して個体発生全能性を再獲得し、生命の世代継承に必須の役割を果たす。マウスの生殖細胞系列は、胚発生の初期過程で多能性幹細胞の一種であるエピブラストから始原生殖細胞 (PGC) として生じた後、性分化を経て雄では生後に精原幹細胞として増殖を開始する一方、雌では胎仔期に減数分裂を開始して卵母細胞となる (1)。近年、栄養環境の変化などを通じた細胞内代謝状態の調節が、エピゲノムなどの細胞機能を上流で制御する現象が注目されているが、生殖細胞は取得できる細胞数が限られるため、体系的な代謝特性解析が進んでいなかった。研究代表者はこれまでに、マウス始原生殖細胞のメタボローム・プロテオーム統合解析を行い、始原生殖細胞の形成に伴って酸化的リン酸化の上昇、解糖系の低下といったエネルギー代謝変換が逐次的に起こり、その形成・生存において重要な役割を果たすことを見出した (2)。

しかし、どのような代謝物、代謝経路がどのような仕組みを介して始原生殖細胞の形成に寄与するか、や始原生殖細胞形成後の性分化を含む分化過程で代謝調節がどのような働きをするか、は依然不明であった。 本研究の予備研究で、様々な環境条件で始原生殖細胞の分化誘導を行い、代謝変換の始原生殖細胞の発生・分化への影響を検証したところ、糖代謝の重要性が示唆されたため、糖代謝が始原生殖細胞形成に寄与する分子メカニズムを明らかにするべく研究を進めた。

2. 方法と結果

本研究ではまず、マウス胚性幹細胞を用いた始原生殖細胞の分化誘導系 (3) を用いて、環境要因の変化による始原生殖細胞の分化異常を包括的に解析した。その結果、グルコース代謝、グルタミン代謝、セリン代謝といった代謝系の障害が始原生殖細胞への分化誘導を重篤に阻害することを見出した。

中でもグルコース代謝は、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の合成とタンパク質にGlcNAcを付与する修飾 (O-GlcNAc化) により始原生殖細胞の形成を制御している可能性が有力であったため、その反応に働く酵素であるOGTの生殖細胞特異的ノックアウトマウスを作製、解析した。その結果、このOGTノックアウトマウス胎仔では始原生殖細胞の数やマーカー遺伝子の発現が低下していることが分かった (図1)。また、始原生殖細胞の形成においてタンパク質のO-GlcNAc化が機能する分子メカニズムを解析した。始原生殖細胞形成時にタンパク質のO-GlcNAc化を阻害すると、ヒストンH3の27番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) の低下とその修飾酵素 (EZH2) のタンパク質量の低下が認められた (Hayashi et al., in preparation) (図2)。

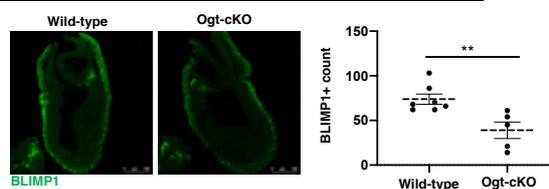


図1. O-GlcNAc転移酵素(OGT)のノックアウトマウス胎仔におけるPGC形成の低下 OGTをエピブラスト特異的にノックアウトした胎仔においてBLIMP1陽性の始原生殖細胞の数が減少した。

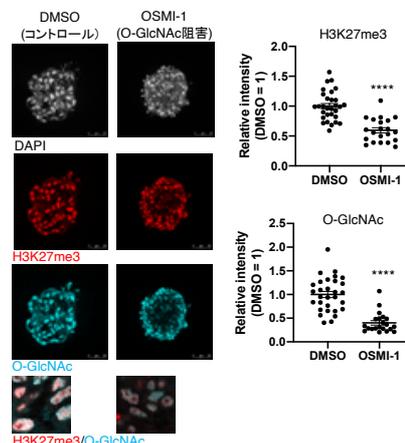


図2. PGCLCにおけるO-GlcNAc化によるヒストンメチル化の制御 PGCLC分化誘導時のO-GlcNAc阻害は、ヒストンH3の27番目のリジンのトリメチル化(H3K27me3)を抑制する。

さらに、栄養環境によるグルコース代謝の調節が胎仔の始原生殖細胞形成に影響を与えるかを検証した。妊娠マウスに低糖質、高脂肪のケトン食餌を給餌し、その胎仔の始原生殖細胞の状態を調査したところ、OGTノックアウトマウスと同様、始原生殖細胞の数やマーカー遺伝子の発現が低下していることが分かった (図3)。

これら一連の研究と同時並行で、始原生殖細胞の形成より後の、性分化を含む生殖細胞分化過程における代謝特性の変化について、メタボローム・プロテオーム統合解析により調査した。その結果、性分化直後の生殖細胞では、オスではセリン・グリシン・メチオニン代謝系が亢進しており、メスでは脂肪酸代謝やピルビン酸代謝が亢進しているという雌雄差が既に形成されていることを見出し、論文報告に至った (4, 5)。また、メス生殖細胞において、ピルビン酸代謝がGDF9、BMP15といった卵胞形成関連遺伝子の発現制御を通して卵胞形成に寄与することを明らかにし、これらの代謝経路の機能的な重要性についても解析を進め一定の成果を得た (6) (図4)。

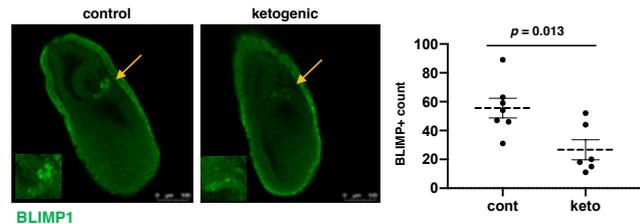


図3. ケトン食給餌の胎仔始原生殖細胞形成における影響
胎齢7.0日胚のBLIMP1免疫染色によりPGCの形成を調べた(左、矢印)。通常食を給餌した妊娠マウス由来の胚に比べ、ケトン食を給餌した胚ではBLIMP1陽性のPGCの数は有意に少なかった(右)。

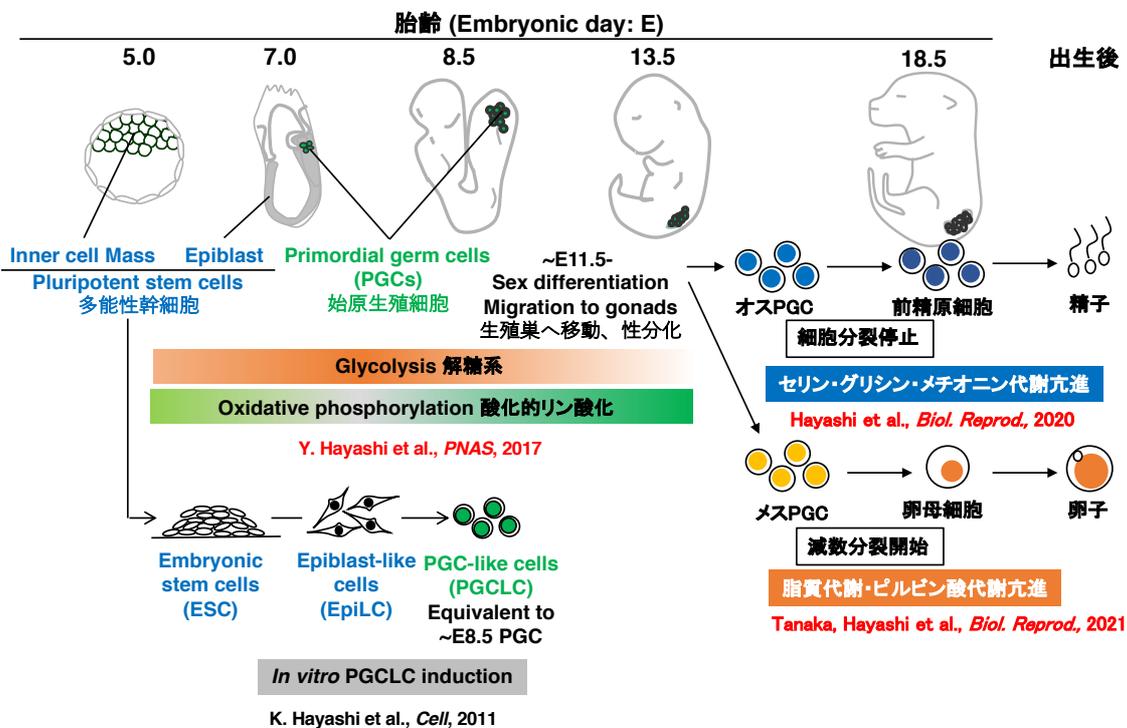


図4. これまでの研究の概要 マウス胎仔における始原生殖細胞形成～性分化を経た雌雄生殖細胞分化に至る過程での、代謝状態の変遷を包括的に明らかにしてきた(Hayashi et al., PNAS, 2017, Biol. Reprod. 2020)。また、各過程で特徴的な代謝経路がどのような分子メカニズムで生殖細胞分化を制御しているかを明らかにする研究を進めている(Tanaka, Hayashi et al., Biol. Reprod., 2021; Hayashi et al., in preparation)。これら結果を要約したReviewを最近執筆した(Hayashi and Matsui, Sex. Dev., 2021)。

3. 考察と今後の展望

タンパク質のO-GlcNAc化がエピゲノムの調節を介して始原生殖細胞形成に寄与することを明らかにしつつあり、代謝-エピゲノムのクロストークが生殖細胞の形成や分化に関わる分子メカニズムに初めて迫ることができた。さらに、妊娠母体の低血糖が胎仔のグルコース代謝異常を介して始原生殖細胞の形成に影響を与える可能性について、現在ケトン食給餌マウスの胎仔の生殖細胞解析により検証している。これらのことは、食事等による外部環境からの介入により、胎児の生殖機能の安定性を維持したり、改善をはかることができる可能性を示唆しており、生殖機能制御における新たな手法の提案につながる。

また、始原生殖細胞の形成以降の分化段階においても、代謝状態は性特異的に大きく変動していくことがこれまでの研究で明らかになった (4, 5)。この結果は、これらの過程でも代謝調節が生殖細胞分化やエピゲノム制御において重要な役割を果たすことを強く示唆しており、メス生殖細胞でのピルビン

酸代謝の関与を始め、その分子メカニズムの研究も進めている(6)。これら一連の解析を通して、生殖細胞の形成や分化における代謝- エピゲノムクロストーク制御の意義と仕組みを包括的に明らかにし、生殖機能の形成に外部環境から介入する方法を模索することが今後の目標である。

4. 文献

- 1) Saitou M, Yamaji M: Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4: a008375 (2012).
- 2) Hayashi Y, Otsuka K, Ebina M, Igarashi K, Takehara A, Matsumoto M, Kanai A, Igarashi K, Soga T, Matsui Y: Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 8289-8294 (2017).
- 3) Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M: Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146: 519-32 (2011).
- 4) Hayashi Y, Mori M, Igarashi K, Tanaka K, Takehara A, Ito-Matsuoka Y, Kanai A, Yaegashi N, Soga T, Matsui Y: Proteomic and metabolomic analyses uncover sex-specific regulatory pathways in mouse fetal germline differentiation. *Biol Reprod*, 103: 717-735 (2020).
- 5) Hayashi Y, Matsui Y: Metabolic control of germline formation and differentiation in mammals. *Sex Dev*, in press (2021).
- 6) Tanaka K, Hayashi Y, Takehara A, Ito-Matsuoka Y, Tachibana M, Yaegashi N, Matsui Y. Abnormal early folliculogenesis due to impeded pyruvate metabolism in mouse oocytes. *Biol Reprod*. 105: 64-75 (2021).