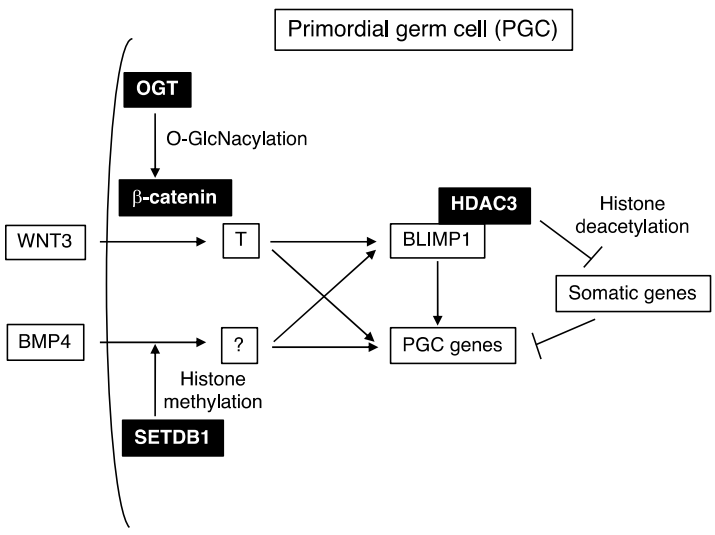
168　エネルギー代謝調節を介した生殖系列の分化制御機構	林　陽平

【目的】本研究では、哺乳類の生殖細胞系列の発生・分化における代謝調節の撹乱が始原生殖細胞の形成やエピゲノム制御を介した遺伝子発現に与える影響を解明することを目的として進めた。我々は、マウスの多能性幹細胞から始原生殖細胞（PGC）への分化過程において、解糖系から酸化的リン酸化への主要エネルギー代謝の変換が起こることを明らかにした。しかし、代謝調節の異常がどのような経路を介して生殖細胞の分化や機能に影響を与えるか、は全く分かっていなかった。そこで本研究では、生殖細胞分化に必須な代謝・エピゲノム関連因子を同定し、その薬剤による阻害や遺伝子操作により生殖細胞の分化や機能に現れる異常を検証する。また、代謝・エピゲノム関連因子が生殖細胞分化に寄与する分子メカニズムを解明する。

【方法】生殖細胞の形成、分化の過程で代謝状態を調節する因子として転写因子やエピゲノム関連因子が挙げられる。本研究では、特に代謝調節とエピゲノム制御に焦点を当て、これらの制御と生殖細胞分化の関連性について研究を進めた。当研究室で行われたスクリーニングにより、始原生殖細胞の形成に関わるエピゲノム因子として、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 とヒストンメチル化酵素 SETDB1 が特定された。本研究ではこれらに加え、培地組成を様々に変えて始原生殖細胞の分化誘導を行うことにより、生殖細胞分化に寄与する新規の代謝関連因子の同定を進めた。これらの遺伝子のノックダウンや薬剤による阻害が始原生殖細胞の形成を抑制する分子メカニズムを、定量 PCR を用いた遺伝子発現解析や免疫染色によるタンパク質の局在解析により検証した。

【結果】*Hdac3* と *Setdb1* の遺伝子ノックダウンは、培養下での多能性幹細胞からの始原生殖細胞形成を顕著に阻害した。また、その制御機構を検証したところ、HDAC3 は転写因子 BLIMP1 と協調してヒストン H3/H4 の脱アセチル化を介した体細胞遺伝子の発現抑制を行い、SETDB1 はヒストン H3K9 のトリメチル化を介して BMP4 シグナルの阻害因子の発現を抑制しており、それぞれ異なる経路によって生殖細胞遺伝子の発現上昇に寄与していることが明らかになった。また、*Hdac3* や *Setdb1* のノックアウトマウスの解析から、これらの因子が個体内でも生殖細胞の形成に寄与していることを明らかにした。さらに、始原生殖細胞の形成に関わる新規の代謝経路として、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の合成を担うヘキソサミン経路を同定した。始原生殖細胞の形成に重要な役割を果たす WNT シグナル経路の主要制御因子である beta-catenin が O-GlcNAc 転移酵素（OGT）を介した O-GlcNAc 化を受けることにより核局在を増加させることを見出しており、タンパク質の O-GlcNAc 化が生殖細胞の分化に関与する可能性を示した。

始原生殖細胞形成を制御する分子ネットワークと新規エピゲノム・代謝関連因子（白抜き）



168. エネルギー代謝調節を介した生殖系列の分化制御機構

林　陽平

東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター

Key words：生殖細胞，代謝調節，エピゲノム

緒　言

本研究課題は、「多能性幹細胞から始原生殖細胞が形成され、精子と卵へと分化する際、生殖細胞系列の代謝状態はどのように変化し、それが生殖細胞の発生・分化にどのように影響するのか？」という問いに端を発する。

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特殊な細胞系列である。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（primordial germ cell：PGC）として生じた後、性分化を経て雄では精子へ、雌では卵へと分化を進行する。近年、多能性幹細胞の自己再生や再プログラム化［1，2］、マクロファージやT細胞の免疫応答［3，4］、がん細胞の増殖［5］など様々な局面で、代謝調節が細胞機能を上流で制御する事例が報告されている。一方で、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。このような状況で我々は、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、生殖細胞の代謝特性と細胞分化・機能との関連性の解明を試みた。その結果、多能性幹細胞から始原生殖細胞への変化に伴って、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、始原生殖細胞の発生・分化に一部代謝系の撹乱が影響を与えることを見出した［6，7］。しかし、どのような代謝化合物や代謝経路がどのような仕組みを介して生殖細胞の発生・分化に寄与するか、は未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、「生殖細胞の発生・分化においてどのような代謝系がどのような役割を果たすかを包括的に解明すること」を目的とする。そのために、培地組成の変化、阻害剤の添加、あるいは代謝関連因子の遺伝子操作とともに始原生殖細胞の分化誘導培養を行い、始原生殖細胞の発生・分化への代謝調節の影響を包括的に検証する。これらにより分化誘導に影響が見られた代謝系に着目し、生体内での始原生殖細胞形成における主要制御因子の遺伝子操作の影響を解析する。さらに、着目する代謝系を変化した始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析を通して、分化制御に関わる分子メカニズムの解明に取り組む。

方　法

始原生殖細胞の形成、分化の過程で代謝状態を制御する因子として転写因子やエピゲノム関連因子が挙げられる。特にヒストンのアセチル化やメチル化といったエピゲノム制御は、その基質であるアセチル-CoAやS–アデノシルメチオニンといった化合物自体が代謝産物であること、これらの制御が代謝酵素遺伝子を含む広範な遺伝子発現に影響を与えることから、代謝調節と密接な関係にあると考えられる。したがって、本研究では、代謝調節・エピゲノム制御と生殖細胞分化の関連性に特に焦点を当てて研究を進めた。

1.　始原生殖細胞の分化誘導培養における代謝・エピゲノム関連因子の寄与の検証

培地中に含まれる成分の濃度を変更した培地を用いる、あるいは特定の代謝経路・エピゲノム経路の促進剤・阻害剤を添加する、代謝・エピゲノム関連因子を遺伝子操作した場合の、始原生殖細胞分化への影響を観察した。この系では、始原生殖細胞に特異的に発現する転写因子 Blimp1 に Venus を付与したトランスジーンを持つ ES 細胞を用い、エピブラスト様細胞を介した PGC 様細胞の分化誘導を行い、分化傾向を Venus 蛍光強度により判定した。この系を用いて、Venus 蛍光が有意に増加、あるいは低下する環境条件・遺伝子操作条件を探索した。

2.　生体内での始原生殖細胞分化における代謝・エピゲノム調節の寄与の検証

1 の解析で分化傾向が変化する条件について、生体内での同様の変化が始原生殖細胞分化に与える影響を検証するために、鍵となる遺伝子のノックアウト（KO）マウスを作出した。これらのマウスの始原生殖細胞の数や形態の変化を、BLIMP1 などの始原生殖細胞マーカーの免疫染色により解析した。変化が観察された遺伝子については、どのような仕組みにより始原生殖細胞の分化に影響を与えるかを、着目する条件で分化誘導した PGC 様細胞のトランスクリプトーム解析（RNA-seq）により調べた。発現が変動した遺伝子の中で、観察された変化への関与が考えられる原因遺伝子候補を *in silico* 解析や文献調査で抽出した。

3.　代謝・エピゲノム変化による始原生殖細胞分化制御の分子メカニズムの解析

2 で抽出した原因遺伝子を基に代謝・エピゲノム調節が始原生殖細胞の発生・分化に寄与する分子メカニズムの解明に取り組んだ。原因遺伝子から考えられる作動仮説を提案し、ウエスタンブロットによるタンパク質解析、免疫沈降を用いた因子間相互作用解析、免疫染色法を用いたタンパク質の量・局在状況の検証、クロマチン免疫沈降によるヒストン化学修飾や因子の局在解析などを行った。

結果および考察

1. 始原生殖細胞の分化誘導培養における代謝・エピゲノム関連因子の寄与の検証

この研究の一環として行われたスクリーニングにより、始原生殖細胞の形成に関わるエピゲノム因子として、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 とヒストンメチル化酵素 SETDB1 が特定された（図 1）。これらの遺伝子ノックダウンは、培養下での多能性幹細胞からの始原生殖細胞形成を顕著に阻害した。また、解糖系を阻害する、グルコースを含まない培地を使用するといった条件で始原生殖細胞の形成が阻害されることが分かっていたが、本研究でその下流の代謝経路を調査したところ、ヘキソサミン経路を介した N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）合成の阻害、およびタンパク質の O-GlcNAc 化修飾の阻害により同様の効果を得た。これらの結果から、ヒストンのアセチル化・メチル化制御およびヘキソサミン経路を介した GlcNAc 合成とタンパク質 O-GlcNAc 化修飾の制御が始原生殖細胞の形成において重要な役割を果たすことが示唆された。

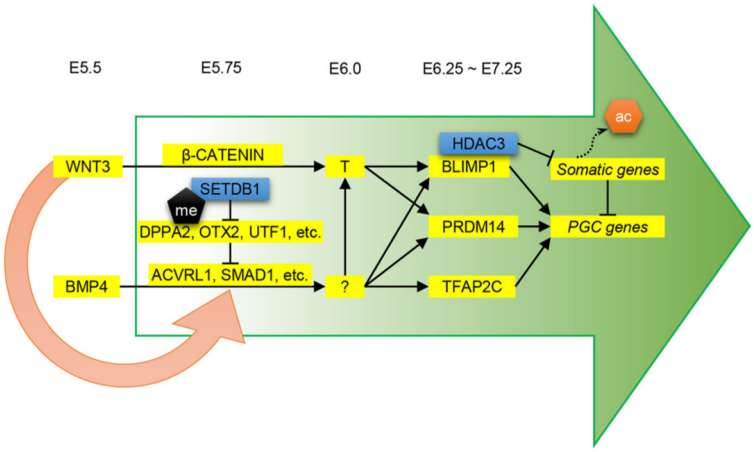


図 1.　始原生殖細胞の形成を担う分子ネットワークとヒストン化学修飾因子

WNT3 や BMP4 を介するシグナルが最上流として始原生殖細胞（PGC）の形成を担う。ヒストンメチル化酵素 SETDB1 は、DPPA2、OTX2、UTF1 などの遺伝子の発現抑制を介して BMP4 シグナル伝達を制御する。一方、HDAC3 は BLIMP1 と協調して体細胞遺伝子（Somatic genes）の抑制を担い、間接的に始原生殖細胞関連遺伝子（PGC genes）の発現を制御する。Development, 145, pii: dev164160, 2018 の Fig.1 より転載。

2. 生体内での始原生殖細胞分化における代謝・エピゲノム調節の寄与の検証

*Hdac3*や*Setdb1*のノックアウトマウスの解析から、これらの因子を欠損するとマウス胎仔内で形成される始原生殖細胞の数が顕著に低下することが見出された。また、タンパク質のO-GlcNAc化を触媒する酵素であるOGTの生殖細胞特異的ノックアウトマウスを作製して始原生殖細胞形成へのO-GlcNAc化の影響の検証を進めた（進行中）。

*Hdac3*や*Setdb1*をノックダウンした始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析（RNA-seq）では、体細胞関連遺伝子の発現上昇と生殖細胞関連遺伝子の発現低下が見られたことから、これらのエピゲノム関連因子が、遺伝子発現の制御を介して生殖細胞への分化を促進していることが示唆された。また、グルコースを含まない培地で誘導した始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析から、Wntシグナル経路の遺伝子発現低下、多能性遺伝子発現の上昇を見出した。れらの遺伝子の発現変動はタンパク質のO-GlcNAc化を抑制した場合も同様であり、タンパク質のO-GlcNAc化制御が特定の遺伝子群の発現制御に特異的に寄与していることが示唆された（図2）。

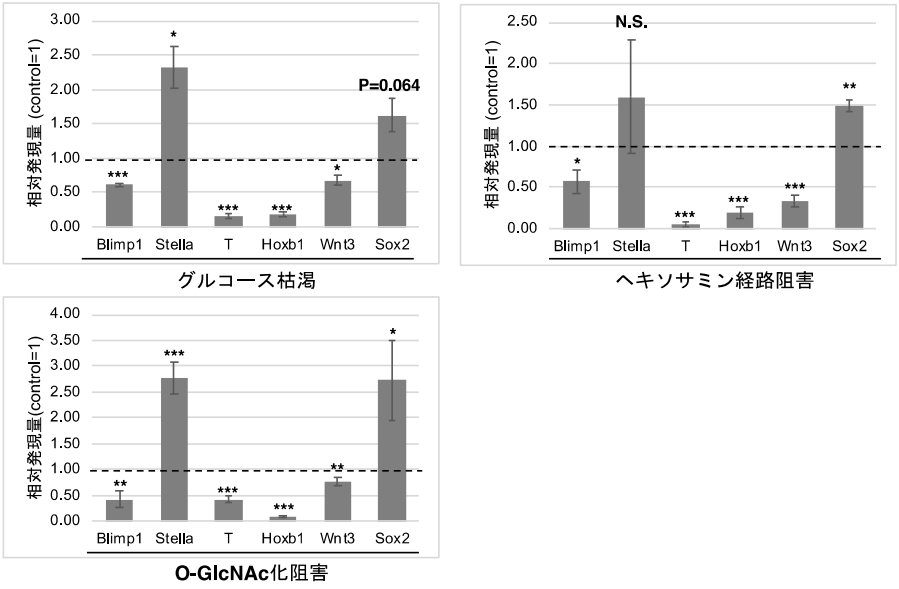


図2. ヘキソサミン経路阻害、O-GlcNAC化阻害による始原生殖細胞の遺伝子発現変動

ヘキソサミン経路阻害剤、O-GlcNAc化阻害剤の添加により、始原生殖細胞におけるWnt3の発現低下、Wnt経路下流遺伝子（Hoxb1、T、Blimp1）の発現低下、および多能性遺伝子（Sox2）、Stellaの発現上昇といったグルコース枯渇時と同傾向の変動を示した。グラフは各コントロール細胞に対する発現変動値の平均値±標準誤差（n = 3）により示す。統計解析はスチューデントのt検定により行った。*P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001。

3. 代謝・エピゲノム変化による始原生殖細胞分化制御の分子メカニズムの解析

免疫沈降法により始原生殖細胞の形成を制御するBLIMP1とHDAC3との相互作用が明らかになった。また、クロマチン免疫沈降法（ChIP）によりHDAC3は体細胞関連遺伝子のヒストンH3/H4の脱アセチル化を直接的に制御することが分かった。これらの体細胞遺伝子の過剰発現により生殖細胞関連遺伝子の発現が抑制されたことから、HDAC3による体細胞関連遺伝子の抑制が生殖細胞関連遺伝子の発現制御に寄与していることが示唆された［8］。また、SETDB1はヒストンH3K9のトリメチル化を介して始原生殖細胞の形成に必要なBMPシグナリングを阻害する遺伝子の発現抑制を介して始原生殖細胞の形成を助けていることが明らかになった（図1）［9, 10］。

さらに、始原生殖細胞の形成を制御するO-GlcNAc化の標的タンパク質の探索を進めた。Wntシグナルを制御するbeta-cateninはO-GlcNAc化により核局在が促進され、遺伝子発現の制御に関わることから、始原生殖細胞内でのbeta-cateninの局在を免疫染色により検証したところ、O-GlcNAc化の阻害によりbeta-cateninの核局在は顕著に阻害された（図3）。この結果から、始原生殖細胞の形成におけるO-GlcNAc化の機能の一部は、beta-cateninの制御によるWntシグナルの活性化に依っていることが示唆された。

これらの解析から、始原生殖細胞の形成に寄与する新規エピゲノム・代謝関連因子を複数同定し、うち Hdac3 と Setdb1 に関しては分子メカニズムを明らかにして論文発表に至った。O-GlcNAc 化による始原生殖細胞形成の制御メカニズム、またさらなる始原生殖細胞の形成を制御する代謝関連因子の探索を引き続き進める。

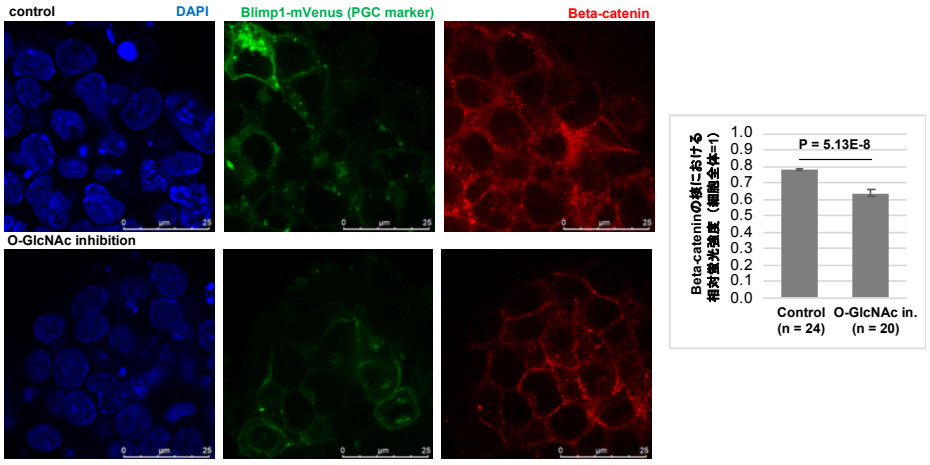


図 3. O-GlcNAc 化阻害による始原生殖細胞における beta-catenin 局在の変化

培地中で分化誘導した始原生殖細胞では、beta-catenin は核内にも局在が見られる。一方、O-GlcNAc 化阻害剤を添加すると、細胞質特異的な強い局在が見られた（左図）。細胞全体の beta-catenin の平均蛍光強度で核内の beta-catenin の平均蛍光強度を相対化した値は、O-GlcNAc 化阻害剤添加によって有意に低下していた。グラフは control と O-GlcNAc 化阻害剤添加した各細胞群における相対蛍光強度の平均値±標準誤差により示す。統計解析はスチューデントの t 検定により行った。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターの松居靖久教授、望月研太郎助教（現ブリティッシュコロンビア大学研究員）である。

文　献

1） Kim H, Jang H, Kim TW, Kang BH, Lee SE, Jeon YK, Chung DH, Choi J1, Shin J, Cho EJ, Youn HD. Core Pluripotency Factors Directly Regulate Metabolism in Embryonic Stem Cell to Maintain Pluripotency. Stem Cells. 2015 Sep;33(9):2699-711. doi: 10.1002/stem.2073. PMID: 26059508.

2） Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):264-71. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.011. PMID: 21803296.

3） Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, Kogadeeva M, Picotti P, Meissner F, Mann M, Zamboni N, Sallusto F, Lanzavecchia A. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. Cell. 2016 Oct 20;167(3):829-842.e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.031. Epub 2016 Oct 13. PMID: 27745970.

4） Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science. 2017 May 5;356(6337):513-519. doi: 10.1126/science.aal3535. PMID: 28473584.

5) Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, Kobayashi M, Nagy T, Glushka J, Tayyari F, McSkimming D, Kannan N, Tojo A, Edison AS, Ito T. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. Nature. 2017 May 25;545(7655):500-504. doi: 10.1038/nature22314. Epub 2017 May 17. PMID: 28514443.

6) 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. 2017 Aug 1;114(31):8289-8294. doi: 10.1073/pnas.1620915114. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28716939.

7) Hayashi Y, Matsui Y. Metabolomic and Proteomic Analyses of Mouse Primordial Germ Cells. Methods Mol Biol. 2018 May 23. doi: 10.1007/7651_2018_164. PMID: 29790096.

8) Mochizuki K*, Hayashi Y*, Sekinaka T*, Otsuka K, Ito-Matsuoka Y, Kobayashi H, Oki S, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y. Repression of Somatic Genes by Selective Recruitment of HDAC3 by BLIMP1 Is Essential for Mouse Primordial Germ Cell Fate Determination. Cell Rep. 2018 Sep 4;24(10):2682-2693.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.108. PMID: 30184502. (*equally contributed)

9) Mochizuki K, Tando Y, Sekinaka T, Otsuka K, Hayashi Y, Kobayashi H, Kamio A, Ito-Matsuoka Y, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y. SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling. Development. 2018 Dec 3;145(23). pii: dev164160. doi: 10.1242/dev.164160. PMID: 30446626.

10) Tatsumi D, Hayashi Y, Endo M, Kobayashi H, Yoshioka T, Kiso K, Kanno S, Nakai Y, Maeda I, Mochizuki K, Tachibana M, Koseki H, Okuda A, Yasui A, Kono T, Matsui Y. DNMTs and SETDB1 function as co-repressors in MAX-mediated repression of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells. PLoS One. 2018 Nov 7;13(11):e0205969. doi: 10.1371/journal.pone.0205969. eCollection 2018. PMID: 30403691.