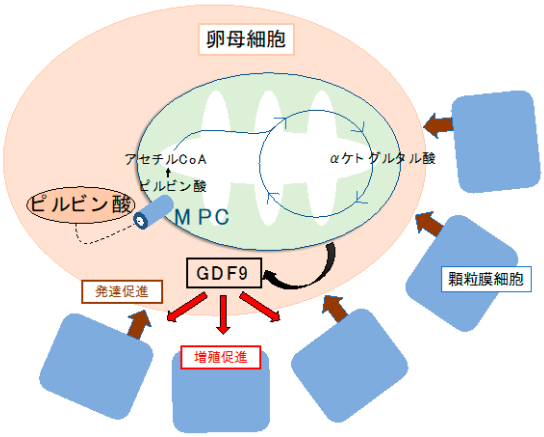
51　胎仔生殖細胞の代謝制御の役割と子孫への影響	松居　靖久

【目的】次世代個体の健康な発生・成長を担う生殖細胞の分化機構に関して、エピジェネティック制御が生殖細胞の形成や、その後の分化段階で起こる減数分裂などに必須な役割を果たしていることが示されてきた。一方、細胞外環境に敏感に反応し、さまざまな細胞状態の制御に重要な代謝状態と、その制御機構に関しての生殖細胞に関する知見は少なく、特に胎仔期生殖細胞の代謝状態に関してはこれまでほとんど調べられてこなかった。そこで本研究の代表者らは、これまでにマウス胎仔生殖細胞のメタボローム・プロテオームの統合解析を行い、胎仔生殖細胞が生殖巣の体細胞や多能性幹細胞と比較して、高いミトコンドリア代謝などの特徴的な代謝状態にあることを明らかにしてきた。その知見をもとに本研究では、胎仔生殖細胞で亢進している、解糖系から分岐するセリン生合成経路やミトコンドリア代謝の、胎仔生殖細胞から精原細胞や卵母細胞が形成される際の役割と作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】マウス胎仔精巣の器官培養に、解糖系から分岐するセリン生合成系経路の律速酵素 PHGDH の阻害剤である CBR-5844 を添加すると、胎仔生殖細胞の精原細胞への変化が促進されることが、これまでの研究でわかった。そこで、セリン生合成経路の下流で精原幹細胞への分化制御に働く遺伝子候補を同定するために、阻害剤の有無で発現が変化する遺伝子を、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析で調べた。一方、ピルビン酸のミトコンドリアへの取込みを担う MPC タンパク質の阻害剤である UK5099 をマウス胎仔卵巣の器官培養系に添加し、卵母細胞への分化に対する影響と下流遺伝子候補を調べた。また *Mpc2* 遺伝子の生殖細胞特異的欠損マウスの解析により、*in vivo* での役割を調べた。さらに妊娠期に糖質制限をすると、MPC 阻害による影響と類似した卵母細胞の異常が見られるかを、糖質を含まず脂質が主体の高ケトン食を給餌することにより調べた。

【結果】PHGDH の阻害剤存在下で培養した胎仔精巣の生殖細胞では、エピゲノム制御に関連する遺伝子の発現上昇が見られ、それらが精原細胞への変化に関与することが示唆された。一方、マウス胎仔卵巣の器官培養系に MPC の阻害剤を添加すると卵胞形成の初期段階が抑制され、さらにミトコンドリア代謝の中間代謝産物で、DNA やヒストンの脱メチル化の制御に関与するαケトグルタル酸およびコハク酸が、阻害剤の影響を緩和することがわかった。また卵母細胞で発現し、卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞の増殖に必要な分泌性因子 GDF9 の遺伝子発現が阻害剤により低下し、さらにまた GDF9 の添加が阻害剤の影響を緩和することが明らかになった。さらに *Mpc2* の欠損マウスでも、同様な初期卵胞発達の抑制が確認された。これらの結果から、ピルビン酸のミトコンドリアへの効率の良い取込みを介して、トリカルボン酸回路のαケトグルタル酸などが十分に確保されることにより GDF9 の発現が保たれ、それにより卵胞形成が円滑に進行すると考えられた。一方、高ケトン食給餌を行ったマウスから産まれた雌マウス卵巣を調べたが、卵胞形成に異常は見られなかった。

卵母細胞におけるピルビン酸のミトコンドリアへの取込の役割



51. 胎仔生殖細胞の代謝制御の役割と子孫への影響

松居　靖久

東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター

Key words：精原細胞，卵母細胞，代謝，ピルビン酸，GDF9

緒　言

次世代個体の健康な発生・成長を担う生殖細胞の分化機構に関して、エピジェネティック制御が生殖細胞の形成や、その後の分化段階で起こる減数分裂などに必須な役割を果たしていることが示されてきた［1］。一方、細胞外環境に敏感に反応し、さまざまな細胞状態の制御に重要な代謝状態と、その制御機構に関しての生殖細胞に関する知見は少なく、特に胎仔期生殖細胞の代謝状態に関してはこれまでほとんど調べられてこなかった。そこで本研究の代表者らは、これまでにマウス胎仔生殖細胞のメタボローム・プロテオームの統合解析を行い、胎仔生殖細胞が生殖巣の体細胞や多能性幹細胞と比較して、高いミトコンドリア代謝などの特徴的な代謝状態にあること、またそういった代謝状態が生殖細胞の形成や再プログラム化に関与することを明らかにしてきた［2］。さらに、その後の研究により、胎仔生殖細胞では、核酸およびセリンを始めとするアミノ酸生合成系の亢進と、タンパク質フォールディングに関する因子などの濃縮が見られ、安定した転写・翻訳とタンパク質の品質管理が重要な役割を担っていることが示唆された［3］。胎仔生殖細胞で亢進しているセリン生合成経路の下流には、DNAやヒストンのメチル化に必要となるメチオニン回路があり、またミトコンドリアのトリカルボン酸（TCA）回路にはそれらの脱メチル化酵素の活性制御に関与するαケトグルタル酸とコハク酸が含まれており、これらの代謝経路がエピジェネティック制御と関連しながら、胎仔生殖細胞の分化に関与する可能性が考えられる。実際にセリン生合成経路の阻害剤添加により、胎仔生殖細胞が精子の幹細胞である精原細胞へ変化しやすくなることを、これまでの研究で見いだした。

そこで本研究では、セリン生合成経路やミトコンドリアへのピルビン酸の取込みが、胎仔生殖細胞から精原細胞や卵母細胞が形成される際にどのような役割を果たすかを明らかにすることを目的とした。その結果、マウス胎仔精巣でセリン生合成経路を阻害すると、生殖細胞でのエピゲノム関連遺伝子の発現上昇が起こることが示唆され、それら遺伝子が精原細胞への変化の制御に関わる可能性が示唆された。またピルビン酸のミトコンドリアへの取込みを阻害すると、卵母細胞で発現し、顆粒膜細胞の増殖促進を介して、卵母細胞の成熟に関与する分泌性因子のGDF9［4］の発現が低下し、卵胞発達の初期段階が抑制されることを見いだし、GDF9の発現制御がTCA回路の下流で働くことが示唆された。さらに胎仔のエネルギー代謝経路は、母胎の栄養状態の影響を受けやすい可能性が考えられるので、妊娠マウスに糖質制限を行った際の卵胞発達への影響を調べた。その結果、卵胞発達への影響は確認されず、短期間の母胎の糖質制限に対して卵胞発達はある程度の頑強性を示すことが示唆された［5］。

方　法

1. 胎仔生殖巣の器官培養

生殖細胞で特異的にRFPを発現する *Vasa-RFP* トランスジェニックマウス12.5日胚の精巣または卵巣を単離し、Transwell insertを使って器官培養を行った［6, 7］。培養液中にセリン生合成経路の律速酵素PHGDHの阻害剤CBR-5844、またはピルビン酸のミトコンドリアへの取込みを担うMPCタンパク質の阻害剤UK5099、およびαケトグルタル酸、リコンビナントGDF9などを添加した。精巣は21日間、卵巣は17日間、培養後、固定しHE染色、および生殖細胞マーカ-などに対する抗体による染色を行った。

2. 遺伝子発現解析

培養後の生殖巣から、RFP 陽性の生殖細胞をセルソーターにより分離し、RNA-seq および RT-qPCR 解析により遺伝子発現を調べた。

3. 生殖細胞特異的ノックアウトマウスの作製

Mpc2-flox マウス［8］を、生殖細胞で特異的に Cre を発現する *Vasa-Cre* トランスジェニックマウスを交配し、生殖細胞で特異的に遺伝子欠損するマウスを得て、卵巣の組織解析を行った。高ケトン食の給餌は交配直後から出産時まで給餌を行った。

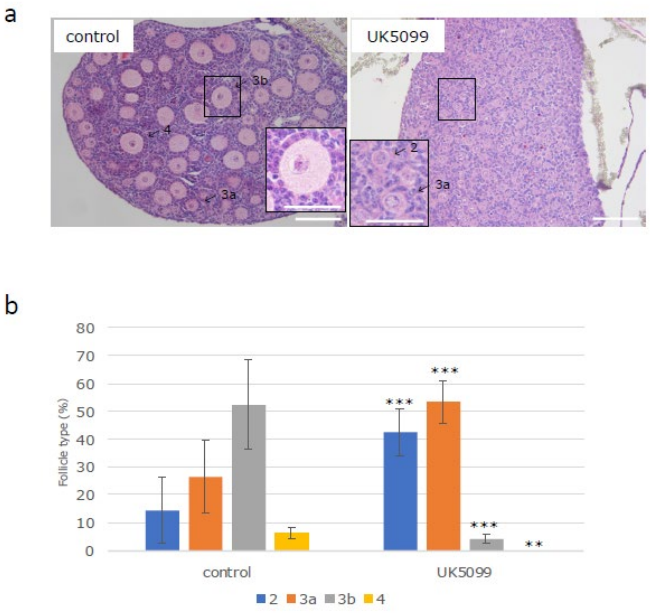
結果および考察

1. 胎仔精巣でのセリン生合成経路の阻害により、エピゲノム関連遺伝子の発現が上昇する

マウス 12.5 日胚精巣の器官培養に、セリン生合成経路の阻害剤 CBR-5844 を添加して 21 日間培養後に、*vasa-RFP* 陽性の生殖細胞での RNA-seq を行い、発現変動遺伝子の GO 解析を行ったところ、nucleosome、DNA-methylation on cytosine、Histone-fold などのエピゲノム関連遺伝子が発現上昇遺伝子に濃縮されていることがわかった。この結果から、セリン生合成経路がエピジェネティック制御関連遺伝子の発現に影響し、精原細胞への分化を制御する可能性が示唆された。

2. 胎仔卵母細胞でのミトコンドリアへのピルビン酸取込み阻害により、GDF9 の発現低下が起こり、初期卵胞発達が抑制される

マウス 12.5 日胚卵巣の器官培養に、ミトコンドリアへのピルビン酸取込み必要な MPC を阻害する UK5099 を添加して 17 日間培養後に組織像を評価したところ、より発達した 1 次卵胞である Type 3b 卵胞および 2 次卵胞（Type 4）卵胞の割合と、卵母細胞の大きさが、コントロールに比べて有意に減少した（図 1）。この結果から、ピルビン酸取込み阻害が、初期卵胞発達を抑制する可能性が示唆された。



1. MPC阻害剤UK5099による卵胞形成阻害
   a) コントロールと UK5099 存在下で培養した胎仔卵巣の組織像。四角で囲んだ部分の高倍率画像も示す。スケールバー：100 μm（主写真）、50 μm（高倍率写真）。
   b) コントロールと比較して UK5099 存在下で培養した胎仔卵巣では、より発達した Type 3b、Type 4 卵胞の割合が減少している。** $p<0.01$、*** $p<0.001$（Student's *t* test）。

次に、胎仔卵巣の器官培養に、UK5099 とともに TCA 回路の代謝産物を添加したところ、α ケトグルタル酸（αKG）およびコハク酸が、UK5099 による卵胞発達の抑制効果を緩和することがわかり、これらの代謝産物が初期卵胞発達に重要であることが示唆された。

さらに 12.5 日胚卵巣の器官培養に UK5099 を添加して 17 日間培養後、*vasa-RFP* 陽性の生殖細胞をセルソーターで集め、卵胞発達に関与することが知られているいくつかの遺伝子の発現を RT-qPCR で調べた。その結果、卵母細胞を取り囲んでいる顆粒膜細胞の増殖などに必要な *Gdf9* および *Bmp15* の発現が、コントロールに比べて上昇することがわかった（図 2）。そこで胎仔卵巣の器官培養に、UK5099 とともに GDF9 または BMP15 を添加したところ、GDF9 が UK5099 による卵胞発達の抑制効果を緩和することがわかった。これらの結果から、ピルビン酸の下流にある αKG およびコハク酸が、*Gdf9* の発現の維持に関与し、初期卵胞発達に寄与することが示唆された。

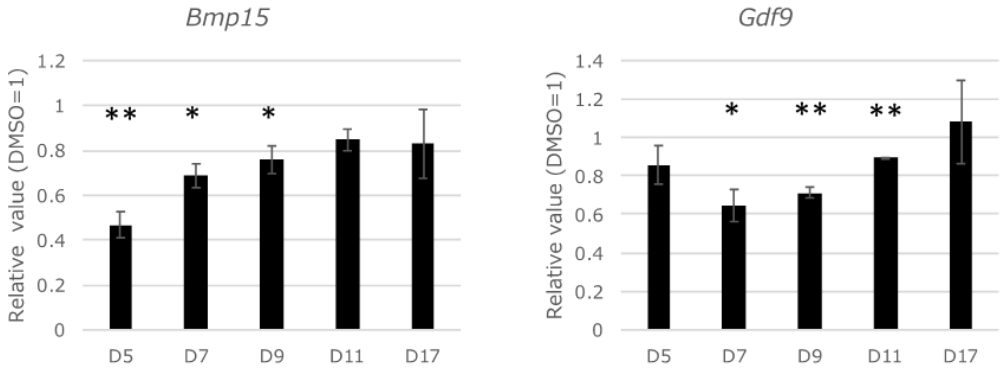


図2. UK5099による培養胎仔卵巣中の卵母細胞での*Bmp15*、*Gdf9* 遺伝子の発現変化
培養開始後、5日（D5）から17日（D17）での、卵母細胞での遺伝子発現をRT-qPCRにより調べた。
3回の独立実験からデータを得た。*$p<0.05$、** $p<0.01$（Student's *t* test）。

また、*Mpc2* を生殖細胞で特異的にノックアウトしたマウスの生後 10 日齢卵巣の組織解析を行ったところ、初期卵胞発達がコントロールに比べて抑制されていることがわかり、培養系へ阻害剤添加と同様に、MPC の機能欠損が、初期卵胞発達を抑制することが、*in vivo* でも確認された。

一方、糖質を含まず脂質が主な栄養成分であるケトン食の給餌を妊娠中に行ったマウスから産まれた生後 10 日齢のマウス卵巣を調べたが、卵胞形成の異常は確認されなかった。この結果から、母胎の糖質摂取の低下に対して、胎仔の卵胞形成は頑強性を示す可能性が考えられるが、今回の実験条件では胎仔卵母細胞の糖代謝が影響を受けなかった可能性も考えられた。

共同研究者

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林陽平、東北大学大学院医学研究科産婦人科学の田中恵子である。

文　献

1） Sasaki H, Matsui, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. Nat Rev Genet 2008 Feb;9(2):129-40. PMID: 8197165, DOI: 10.1038/nrg2295.

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. 2017 Aug 1;114(31):8289-8294. PMID: 28716939, DOI:10.1073/pnas.1620915114.
3) Hayashi Y, Mori M, Kaori I, 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 .2020 Oct 5;103(4):717-735. PMID: 32627815, DOI: 10.1093/biolre/ioaa115.
4) Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. J Assist Reprod Genet. 2018 Oct;35(10):1741-1750. PMID: 30039232, DOI: 10.1007/s10815-018-1268-4.
5) 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. Jul 2;105(1):64-75.. PMID: 33824958, DOI:10.1093/biolre/ioab064).
6) Morohaku K, Hirao Y, Obata Y. Development of fertile mouse oocytes from mitotic germ cells in vitro. Nat Protoc. 2017 Sep;12(9):1817-1829. PMID: 28796235, DOI: 10.1038/nprot.2017.069.
7) Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta, H, Hayashi, K, Nakamura T, Okamoto, I, Yamamoto, T, Kurimoto, K, Shirane, K, Sasaki, H, Saitou M. In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. Cell Rep.2016 Dec 6;17(10):2789-2804. PMID: 27926879, DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.026.
8) McCommis KS, Chen Z, Fu X, McDonald WG, Colca JR, Kletzien RF, Burgess SC, Finck BN. Loss of Mitochondrial Pyruvate Carrier 2 in the Liver Leads to Defects in Gluconeogenesis and Compensation via Pyruvate-Alanine Cycling. Cell Metab. 2015 Oct 6;22(4):682-94. PMID: 26344101, DOI: 10.1016/j.cmet.2015.07.028.