

—— 勾坂記念賞受賞記念講演 ——

2018年5月26日：勝山館

エネルギー代謝調節を介したマウス生殖系列の分化制御機構と その生理的意義の解明

東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター

林 陽 平



略 歴

- 2005年3月 東京大学薬学部卒業
- 2005年4月 東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻 進学
- 2010年3月 東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻 博士課程 修了
- 2010年4月 東京大学分子細胞生物学研究所 発生分化構造研究分野 博士研究員
- 2011年4月 東京大学薬学系研究科 微生物薬品化学教室 博士研究員 (学振PD)
- 2014年4月 東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター 助教

エネルギー代謝調節を介したマウス生殖系列の分化制御機構と その生理的意義の解明

Regulatory Mechanisms of Mouse Germline Differentiation Via Metabolic Control and Its Significance

林 陽 平

東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター

はじめに

生殖細胞系列は、精子および卵へと分化し、受精を介して個体発生全能性を再獲得することにより、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、胎齢 6.5 日ではじまる原腸陥入に伴う中胚葉分化と並行して、多能性幹細胞の一種であるエピプラスト細胞の一部から始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) が生じることによって始まる (図 1)¹⁾。PGC はダイナミックな遺伝子発現やエピゲノムの変化を伴いながら、性分化を経て雄では生

後に精原幹細胞から精子へ、雌では胎仔期に減数分裂を開始して卵母細胞となり、生後の卵胞成熟を経て卵へと分化する²⁾。近年、細胞の代謝状態の調節が引き金となり、多能性幹細胞、免疫細胞やがん細胞の細胞機能、分化が制御される事例が多数報告されている。一方で、PGC を含む哺乳類の生殖細胞は取得できる細胞数が限られており、生殖細胞系列の代謝特性が分化過程でどのように変化するか、代謝調節が生殖細胞の機能や分化にどのような役割を果たすのか、は不明であった。

PGC の発生・分化に伴う代謝変換

PGC の発生・分化における代謝特性の変化とその特殊性を検証するために、生殖細胞と体細胞の両方への分化能を持つ胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞)、PGC、および精巣や卵巣の原基である生殖巣を構成する体細胞 (gonadal somatic cells; Soma) の中に含まれる代謝化合物、タンパク質の質量分析による包括的な同定を行った。その結果、ES 細胞では PGC や Soma と比較して解糖系の代謝化合物や代謝酵素が多いこと、PGC では ES 細胞や Soma と比較してミトコンドリアで好気呼吸を担うトリカルボン酸回路 (tricarboxylic acid cycle, TCA 回路) や酸化リン酸化に含まれる代謝化合物や代謝酵素が多いことが分かった。また、PGC では、核酸、アミノ酸と、アミノ酸を基質として作られる抗酸化物質グルタチオンの合成経路が亢進していることも見出した。以上より、PGC は ES 細胞や Soma とは異なる特殊なエネルギー代謝、物質代謝特性を持つことが示唆された。

この解析結果から、多能性幹細胞から PGC へと分化が進む中で、通常の体細胞分化では見られない

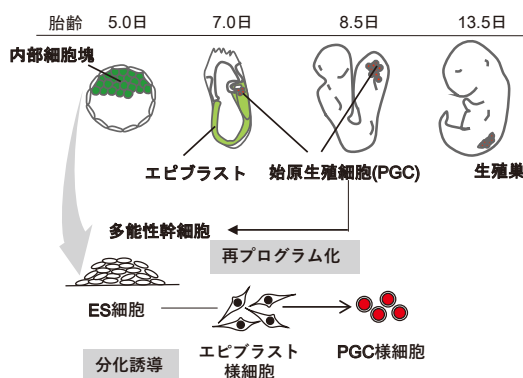


図 1. マウス始原生殖細胞の分化と再プログラム化
着床前の胚盤胞中の内部細胞塊は高い分化多能性を持ち、培養により ES 細胞が得られる。着床後、内部細胞塊はより多能性の制限されたエピプラストへと分化する。エピプラスト細胞の一部が始原生殖細胞 (PGC) へと誘導され、増殖と移動を経て生殖巣へと入る。PGC は培養下でサイトカインの作用により多能性幹細胞へと再プログラム化される。また、ES 細胞からエピプラスト様細胞を経て PGC 様細胞を人為的に誘導することも可能である。

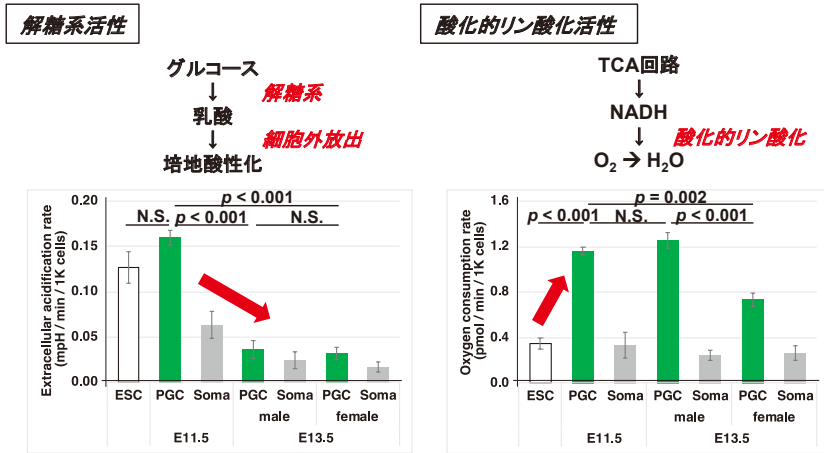


図2. 始原生殖細胞の分化における代謝活性の変化
解糖系活性の変化 (左) と酸化的リン酸化活性の変化 (右). 解糖系活性は培地中に放出される乳酸により培地酸性化する速度により、酸化的リン酸化活性は溶存酸素の減少速度により定量している (文献5より).
PGC: 始原生殖細胞, Soma: 生殖巣の体細胞, ESC: ES細胞, E11.5 (13.5): 胎齢 11.5 日 (13.5 日)

PGC 特有の解糖系主体から酸化的リン酸化主体へのエネルギー代謝変換が起こることが示唆された. このエネルギー代謝の変換はどの PGC の分化段階で起こるのか, を明らかにするために, ES 細胞, ES 細胞から分化誘導した PGC 様細胞 (胎齢 9.5 日の PGC に相当), 様々な胎齢の PGC と Soma を用いた細胞外フラックス解析により, 培養下での解糖系活性と酸化的リン酸化活性を計測した. その結果, PGC の解糖系活性は胎齢 11.5 日-13.5 日の分化過程を通して低下すること, 一方で酸化的リン酸化活性は, ES 細胞-胎齢 11.5 日の PGC の発生段階で上昇することを見出した (図 2). 興味深いことに胎齢 13.5 日の PGC では雄 PGC の方が雌 PGC よりも酸化的リン酸化活性が高く雌雄差が見られるが, これが何を意味するかに関しては今後の研究が待たれる.

PGC におけるエネルギー代謝変換の役割

では, PGC の分化過程で起こるエネルギー代謝の変換は, PGC の細胞機能に影響を及ぼすのか. これを検証するために, 培養下での ES 細胞から PGC 様細胞の分化誘導³⁾ や, PGC の多能性幹細胞への再プログラム化⁴⁾ の過程 (図 1) で特定の代謝経路を阻害してその影響を検証した. PGC の再プログラム化時に, 解糖系活性を阻害する 2-デオキシ-D-グルコース (2-Deoxy-D-glucose, 2DG) を添加すると, PGC の再プログラム化は顕著に阻害された. この時 PGC の生存は 2DG の添加により変化しないことから, 解糖系

の阻害は多能性幹細胞への再プログラム化能を抑制したと考えられる. 一方, ES 細胞から PGC 様細胞を分化誘導する際に 2DG を添加すると, PGC マーカー遺伝子発現の減少は伴うものの, PGC マーカーの一つ, Blimp 1 陽性の PGC 様細胞はコントロール群と同程度の割合で得られた. 一方, 電子伝達系の呼吸鎖複合体 I を阻害するロテノン⁵⁾ を添加すると, PGC の細胞死が誘導され, それに付随して再プログラム化や分化誘導は顕著に低下した. これらの結果から, 解糖系活性は

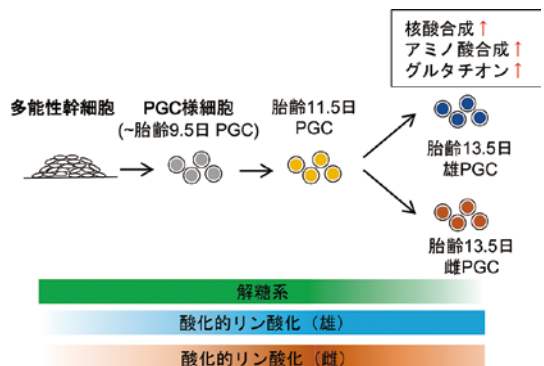


図3. 生殖細胞の分化に伴う代謝特性の変化
多能性幹細胞から胎齢 13.5 日の PGC への分化の過程で, 解糖系は胎齢 11.5-13.5 日で低下し, 酸化的リン酸化は胎齢 9.5-11.5 日で上昇することを見出した. また, 酸化的リン酸化は雄 PGC において雌 PGC よりも上昇していた. さらに胎齢 13.5 日の雄 PGC では, 核酸, アミノ酸やグルタチオン合成経路の亢進も示唆された.

再プログラム化に必要であり、また PGC の分化誘導にも一定の役割を果たす一方、酸化リン酸化は PGC の生存そのものに必要であると考えられた。

以上より、本研究では哺乳類で初めてとなる始原生殖細胞のメタボローム、プロテオーム統合解析を基に、これまで明かされることのなかった哺乳類の生殖細胞の代謝特性を解明し (図3)、それを基に新たな視点からの PGC の分化、再プログラム化制御機構の存在を提案することに成功した⁵⁾。

おわりに

胎齢 13.5 日の雄 PGC は、増殖休止期に入りつつあるが、にも関わらず酸化リン酸化の活性が極めて高く、多くのエネルギーを必要とすることが示唆された。最近、同胎齢の PGC は Soma と比較して過剰転写、過剰翻訳状態にあることが報告された⁶⁾。われわれの結果でも、PGC で核酸やアミノ酸の合成が亢進しており、これらの原料を基に何らかの RNA やタンパク質を過剰合成していると考えられる。PGC がどのような物質を過剰合成し、それが生殖細胞機能とどのように関与するかは今後の課題である。

また、PGC の発生・分化だけでなく、さらなる生殖細胞の分化における代謝調節の役割を明らかにすることも興味深い課題である。われわれは既に、器官培養によりオス PGC を精原幹細胞へ、メス PGC を卵胞成熟へと導く分化誘導系を用いて、培地組成の変化や代謝阻害剤の添加により代謝を攪乱することで、生殖細胞分化への影響を検証している。この系を用いて、すでにいくつかの代謝系の攪乱において、オス精原幹細胞への分化異常や、メスにおける卵胞成熟異常を検出している。これらを端緒とし、さらなる環境条件の

変化が生殖細胞分化に及ぼす影響を包括的に調査する。

今回、長陵医学振興会勾坂記念賞という栄えある賞を受賞できたことに対し、松居靖久教授はじめ、加齢医学研究所医用細胞資源センターの皆様へ感謝申し上げます。また、メタボローム解析は慶応大学先端生命研究所の曾我朋義教授、プロテオーム解析は東北大学大学院医学系研究科の五十嵐和彦教授、生殖巣の器官培養解析は東北大学病院産婦人科の八重樫伸生教授および田中恵子さんのご協力のもと行うことができました。最後に皆様に深い感謝の意を申し上げます。

文 献

- 1) Ginsburg, M., Snow, M.H. and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, **110**, 521-528.
- 2) Matsui, Y. and Mochizuki, K. (2014) A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **81**, 160-170.
- 3) Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., et al. (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, **146**, 519-532.
- 4) Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B.L. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, **70**, 841-847.
- 5) Hayashi, Y., Otsuka, K*, Ebina, M*, et al. (2017) 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. (*equally contributed)
- 6) Percharde, M., Wong, P. and Ramalho-Santos, M. (2017) Global Hypertranscription in the Mouse Embryonic Germline. *Cell Rep.*, **19**, 1987-1996.