

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03231

研究課題名(和文)胎仔生殖細胞に特有の代謝状態による卵母細胞への分化制御機構

研究課題名(英文)Regulation of oogenesis by the unique metabolic status in fetal germ cells

研究代表者

松居 靖久 (Matsui, Yasuhisa)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：40241575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエネルギー代謝経路の、マウス胎仔卵巣内の卵母細胞の発達における役割を解明することを目的とした。そしてミトコンドリアへのピルビン酸取込に働くMPC2タンパク質と、その下流のTCAサイクルの代謝物の中でエピゲノム制御に必要な α -ケトグルタル酸、さらにその制御下にあると考えられた、卵胞発達に重要な増殖因子であるGDF9が、初期段階の卵胞発達に重要であることを明らかにした。さらに遺伝子発現と、それを促進するヒストンH4のアセチル化が、MPC2の制御下にあると考えられる遺伝子候補の中に、卵胞形成に働くことが知られている転写因子遺伝子のNoboxが含まれることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ミトコンドリア代謝がエピジェネティック制御を介して、卵胞形成に重要な役割を果たす分子機構の一端が、初めて明らかになり、代謝-エピゲノム制御軸による卵子形成制御の新たなしくみを示した。この研究成果は、卵胞形成不全等の疾患の原因の1つとして、ミトコンドリア代謝を介したエピジェネティック異常が関与する可能性を示唆し、今後、Mpc2遺伝子変異の有無による不妊リスクの評価などの発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to show roles of energy metabolism in fetal mouse germ cells for oogenesis. We demonstrated that MPC2, a pyruvate carrier protein on mitochondrial membrane, and α -ketoglutarate in TCA cycle are crucial for early steps of oogenesis by using organ culture of fetal ovary and germ cell-specific knock-out mouse of Mpc2. In addition, we also found that GDF9, an essential factor for oogenesis, is under the control of MPC2, and acetylation of histone H4 in Nobox gene, another essential gene for oogenesis, and its expression are also controlled by MPC2. The results suggest that MPC2 is crucial for gene expression required during oogenesis by the histone modification via α -ketoglutarate.

研究分野：Developmental Biology

キーワード：卵母細胞 代謝 エピゲノム MPC TCA回路

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、卵子、精子への分化と受精を介して個体発生全能性を獲得し、体細胞にはない生命の世代継承能を持つ。生殖細胞に関する研究は、さまざまな観点から進展しているが、発生全能性の獲得を担う分子機構の解明には至っていない。それを明らかにすることは、世代を超えて命が受け継がれていくしくみの理解を通じて学術的なブレークスルーをもたらすだけでなく、先天性疾患や不妊が起こる原因の解明と、その予防、および治療に向けた新たなアプローチに道を拓くことになる。生殖細胞は胚発生の初期過程で始原生殖細胞 (PGC) として形成され、雌では胎仔期に減数分裂を開始し卵母細胞の状態に休止状態に保たれ、成体の性周期に従って一部の卵母細胞が卵子へと成熟する。この卵母細胞の分化・成熟過程では、母性因子として様々な物質が蓄積し、それらが卵の発生全能性の獲得に重要であると考えられる。

生殖細胞は分化に伴い、DNA のメチル化やヒストン修飾の特徴的な変化を起こし、そういったエピゲノム変化が発生全能性の獲得に関わっていると考えられ解析が進んでいる。一方、細胞機能を制御する分子ネットワークには、さまざまな代謝産物が含まれ、代謝状態が、エピゲノム制御を含めて、生殖細胞の分化・発生能の制御に重要な役割を果たしていることが予想されるが、これまで生殖細胞を対象とした代謝の役割に関する研究は限定的だった。そこで、これまでの研究で、マウス PGC、ES 細胞 (ESC)、および胎仔生殖巣体細胞のメタボローム・プロテオーム統合比較解析を行い、PGC が特徴的な代謝状態を示すことを明らかにしてきた (PNAS 114, 8286, 2017)。例えば、13.5 日胚以降の雌雄 PGC では、ESC や胎仔生殖巣の体細胞と比べると、酸化リン酸化の亢進と解糖系の抑制が見られた。解糖系やミトコンドリア代謝経路はエネルギー産生だけでなく、核酸やアミノ酸合成、エピジェネティック制御やレドックス制御などとも係わるので、こういった胎仔期生殖細胞の代謝状態が、卵子への分化・成熟過程や発生全能性の獲得に必要な、多様な役割を担っている可能性が考えられる。そこで PGC から卵子への分化を再現できる培養系に、脂肪酸またはピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みを阻害する化合物を添加したところ、卵胞数は影響を受けないが成熟が抑制されることがわかり、TCA 回路の下流で卵胞形成を制御する分子経路が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では PGC が、個体発生全能性に重要な役割を果たす卵子に分化する際の、ミトコンドリア代謝の役割と、その下流で働く分子経路を解明することを目的とする。こういった研究は報告がなく、これまでの研究成果をもとにアプローチする点に本研究の学術的独自性がある。

2. 研究の方法

ピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みを行う MPC タンパク質を阻害する化合物 UK5099 存在下での遺伝子発現変化を調べる。PGC 特異的に RFP を発現する *Vasa-RFP* トランスジェニックマウスの 12.5 日胚卵巣を、UK5099 のあるなしで 3、7、17 日間培養後に、セルソーティングにより RFP 陽性の生殖細胞と RFP 陰性の体細胞を精製し、RNA-seq を行う。2 次卵胞までの成熟が起こる培養 17 日後の遺伝子発現変化から異常の詳細を調べる。また 3、7 日目のデータからピルビン酸取り込み阻害の初期段階で影響を受ける遺伝子を選択し、その中から UK5099 存在下で見られた卵母細胞の異常との関連が予想されるものを絞り込む。次に候補遺伝子産物が、UK5099 により見られた異常に関与するかを、組み換えタンパク質の培養への添加などにより調べ、TCA 回路関連代謝の下流で、卵母細胞成熟を制御する遺伝子を明らかにする。また UK5099 による影響が、TCA 回路に含まれる代謝産物でレスキューされるかを調べる。それにより、阻害剤で見られた卵母細胞の異常が、TCA 回路全体の活性が低下した結果なのか、あるいは特定の代謝産物が減少することにより起こったのかを推定する。特定の代謝産物の関与が考えられた場合は、エピジェネティック制御や母性因子蓄積・維持などに関わる可能性を、阻害剤存在下で培養した卵母細胞のエピゲノム解析などにより調べる。

さらに培養への阻害剤の添加で見られた影響が、生体内での MPC 遺伝子の機能不全によっても見られるかを、*Mpc2* 遺伝子の生殖細胞特異的 *ck0* マウスで調べる。そのために *Mpc2-fllox* マウスを、生殖細胞特異的な *Vasa-Cre* マウスと交配し、得られた *ck0* 胚の卵母細胞の状態を組織解析により調べる。

3. 研究成果

ピルビン酸の下流の代謝産物には、ヒストンアセチル化に関与するアセチル-CoA、ヒストンおよび DNA の脱メチル化に必要な α -ケトグルタル酸があるので、UK5099 のヒストン修飾に対する影響を抗体による染色で調べた結果、アセチル化ヒストン H3、H4 が増加することがわか

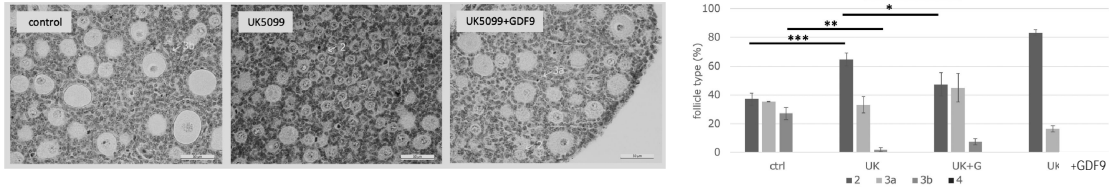


図1 MPC阻害剤UK5099による卵胞形成阻害が、GDF9により回復する

った。またピルビン酸の下流に位置する TCA サイクルの代謝物により UK5099 の影響が緩和されるかを調べ、DNA やヒストンの脱メチル化制御に関与することが知られている α -ケトグルタル酸およびコハク酸が、UK5099 による卵胞形成の抑制を緩和することがわかった。一方、遺伝子発現解析から、卵胞発達に重要な増殖因子である GDF9 と BMP15 の発現が、UK5099 により抑制されることがわかった。さらに培養下で GDF9 が UK5099 による卵胞形成の抑制を緩和することが明らかになった(図1)。これらの結果から、ピルビン酸の下流経路が GDF9 の発現を保障することで、卵胞発達が促進される可能性が考えられた(図2)。次に MPC2 の阻害が卵胞形成に関する特定の遺伝子のエピゲノムに影響する可能性を、アセチル化ヒストン H4 の CUT & RUN-seq 解析により調べ、UK5099 により変化し、MPC2 の制御下にあると考えられる遺伝子候補の中に、卵胞形成に働くことが知られている転写因子遺伝子の *Nobox* が含まれることが明らかになった。さらに MPC の *in vivo*での機能を確認するために、*Mpc2* 遺伝子の生殖細胞特異的な条件的ノックアウトマウス卵巣の解析を行い、ノックアウトマウス卵巣において、培養下で UK5099 添加時に見られた異常と類似した初期卵胞形成の抑制が起こることがわかった。これらの結果から、ミトコンドリアへのピルビン酸取込に働く MPC2 タンパク質と、その下流の TCA サイクルの代謝物の中でエピゲノム制御に必要な α -ケトグルタル酸、さらにその制御下にあると考えられた、卵胞発達に重要な増殖因子である GDF9 や、転写因子 NOBOX が、初期段階の卵胞発達に重要であることが示唆された。

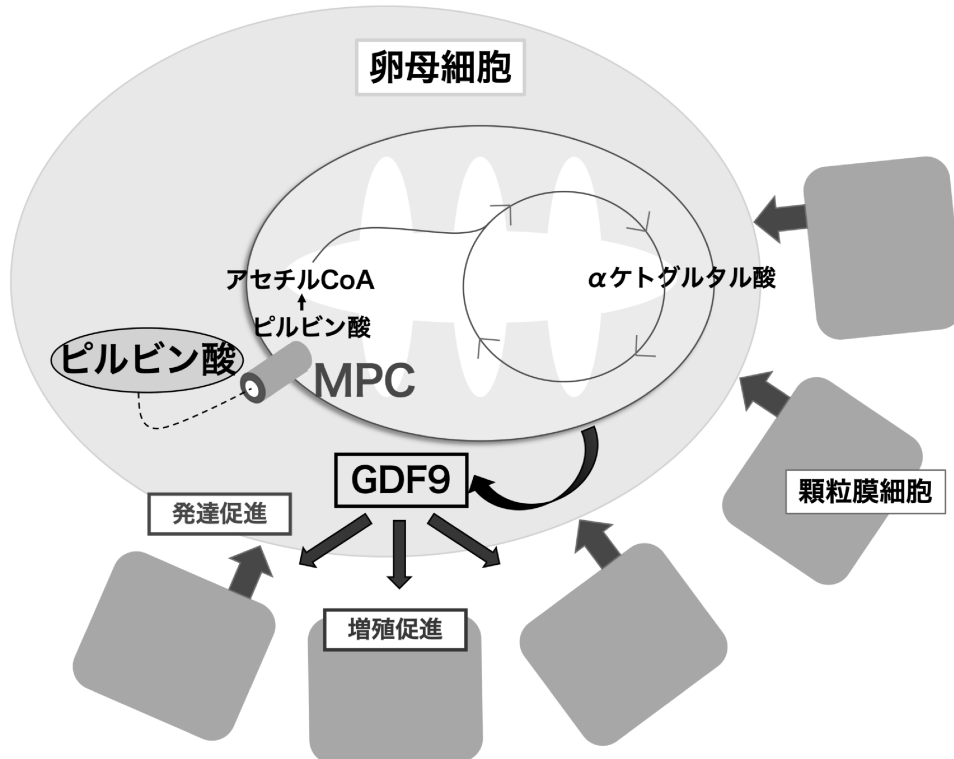


図2 MPCによる α ケトグルタル酸とGDF9を介した卵胞形成の促進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tando Yukiko, Matsui Yasuhisa	4. 巻 3
2. 論文標題 Identification of spermatogenesis-associated changes in DNA methylation induced by maternal exposure to chemicals in male germ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101912 ~ 101912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka, K., Hayashi, Y., Takehara, A., Ito-Matsuoka, Y., Tachibana, M., Yaegashi, N., Matsui, Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 Abnormal early folliculogenesis due to impeded pyruvate metabolism in mouse oocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 64-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioab064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tando, Y., Hiura, H., Takehara, A., Ito-Matsuoka, Y., Arima, T., Matsui, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Epi-mutations for spermatogenic defects by maternal exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e70322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.05.19.444770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshizaki Kaichi, Kimura Ryuichi, Kobayashi Hisato, Oki Shinya, Kikkawa Takako, Mai Lingling, Koike Kohei, Mochizuki Kentaro, Inada Hitoshi, Matsui Yasuhisa, Kono Tomohiro, Osumi Noriko	4. 巻 22
2. 論文標題 Paternal age affects offspring via an epigenetic mechanism involving REST/NRSF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e51524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi, Y. and Matsui, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolic control of germline formation and differentiation in mammals.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsui, Y. and Hayashi, Y	4. 巻 68
2. 論文標題 Metabolic pathways regulating the development and non-genomic heritable traits of germ cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 96-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2021-137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yohei, Mori Masaru, Igarashi Kaori, Tanaka Keiko, Takehara Asuka, Ito-Matsuoka Yumi, Kanai Akio, Yaegashi Nobuo, Soga Tomoyoshi, Matsui Yasuhisa	4. 巻 103
2. 論文標題 Proteomic and metabolomic analyses uncover sex-specific regulatory pathways in mouse fetal germline differentiation†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 717 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekii, K., Yorimoto, S., Okamoto, H., Nagao, N., Maezawa, T., Matsui, Y., Yamaguchi, K., Furukawa, R., Shigenobu, S., Kobayashi, K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcriptomic analysis reveals differences in the regulation of amino acid metabolism in asexual and sexual planarians.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42025-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takehara, A., Mtsui, Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 Shortened G1 phase of cell cycle and decreased histone H3K27 methylation are associated with AKT-induced enhancement of primordial germ cell reprogramming.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 357-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki, N., Matsui, Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Comprehensive analysis of mouse CTA functions in cancer cells and roles of TEKT5 in cancer cells and testicular germ cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00154-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00154-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Y.Matsui, Y.Tando, Y.Hayashi.
2. 発表標題 Epigenetic and metabolic controls in germ cell development.
3. 学会等名 The International Symposium 'Totipotenmcy and germ cell development' (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松居靖久、丹藤由希子、吉崎嘉一、有馬隆博、河野友宏、大隅典子
2. 発表標題 親の環境要因が仔の脳と精子形成に影響するしくみ
3. 学会等名 第64回日本老年医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 陽平、竹原 雅子花、伊藤-松岡 由美、生田 佳穂、前川 聡、松居 靖久
2. 発表標題 始原生殖細胞の運命決定における糖代謝の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹藤由希子、樋浦 仁、竹原 雅子花、伊藤-松岡 由美、有馬 隆博、松居靖久
2. 発表標題 妊娠期のフタル酸エステル暴露が仔の精子形成異常を引き起こすエピゲノム変異の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Hayashi, K. Igarashi, A. Kanai, T. Soga, Y. Matsui.
2. 発表標題 Regulation of metabolic signaling in mouse primordial germ cell development.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting, 'Mechanisms of metabolic signaling'. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Hayashi, Keiko Tanaka, Masaru Mori, Kaori Igarashi, Akio Kanai, Tomoyoshi Soga, Nobuo Yaegashi, Yasuhisa Matsui
2. 発表標題 Proteomic and metabolomic characterization in mouse fetal germline differentiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/crcbr/kenkyu.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------