

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06434

研究課題名（和文）始原生殖細胞の発生・分化における代謝調節の役割の包括的解明

研究課題名（英文）Role of metabolic regulation in primordial germ cell formation and differentiation

研究代表者

林 陽平（Hayashi, Yohei）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00588056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：代謝調節は細胞機能や分化を上流で制御する重要な要素だが、始原生殖細胞の運命決定において重要な役割を果たす代謝経路は不明であった。本研究では、グルコースが解糖系から分岐するヘキソサミン合成経路を通して始原生殖細胞の形成に必要であること、この効果は標的タンパク質の糖付加修飾を介したエピジェネティックな制御によってもたらされることを明らかにした。さらに、母親の糖質制限食による糖質代謝の低下が、胚における始原生殖細胞の形成の抑制を引き起こすことを明らかにした。これらの結果は、母体の栄養、代謝、エピジェネティックな制御が、その子孫の生殖細胞の運命決定の制御において重要な役割を持つことを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞系列は、胎仔期の早い段階で多能性幹細胞から分岐して生じ、増殖・移動を経て生殖巣に入り、配偶子へと分化していく。そのため、胎仔の置かれた環境が生殖細胞分化や将来的に生殖機能に影響を与える可能性が高いものの、それを証明した研究はなかった。本研究で、始原生殖細胞が形成される時点での糖質代謝の重要性を明らかにしたことにより、初めて栄養環境と始原生殖細胞形成の関連性が示唆された。このことは培養系や母体の栄養環境により生殖細胞の分化能や生殖機能に影響を与えうる可能性を示しており、非侵襲的な外部環境からの介入による生殖細胞機能の操作へと繋がるのが期待される。

研究成果の概要（英文）：Metabolic regulation is an important upstream regulator of cell function and differentiation, but the metabolic pathways that play a critical role in primordial germ cell fate determination have been unknown. In this study, we showed that glucose is required for primordial germ cell formation through the hexosamine biosynthetic pathway, which branches off from the glycolysis, and that this effect is mediated by epigenetic regulation via O-linked glycosylation of target proteins. Furthermore, we found that a reduction in carbohydrate metabolism due to a carbohydrate-restricted diet in the mother causes suppression of primordial germ cell formation in the embryo. These results indicate that maternal nutritional, metabolic, and epigenetic controls have an important role in the control of germ cell fate decisions of their offspring.

研究分野：生殖細胞研究

キーワード：始原生殖細胞 代謝 エピゲノム 栄養

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「多能性幹細胞から生殖細胞系列と体細胞系列が分かれる際、生殖細胞系列の代謝状態はどのように変化し、それが始原生殖細胞の形成・分化にどのように影響するのか?」である。

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プ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 (Kim et al., *Stem Cells*, 2015; Folmes et al., *Cell Metabolism*, 2011)、マクロファージや T 細胞の免疫応答 (Ip et al., *Science*, 2017; Geriger et al., *Cell*, 2016)、がん細胞の増殖 (Hattori et al., *Nature*, 2017) 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。このような状況で申請者は、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攪乱が影響を与えることを見出した (Hayashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2017)。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始原生殖細胞の発生・分化に寄与するか、は未だ明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、「始原生殖細胞の発生・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」を目的とした。そのために、様々に培地組成を変えた環境条件で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。環境変化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代謝酵素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。

本研究は、マウス始原生殖細胞の代謝特性とその分化段階による変化、細胞機能との関連性について初めて体系的な解析を行った代表者の先行研究を基に、始原生殖細胞の発生・分化における代謝調節の生理的意義と分子メカニズムを包括的に明らかにすることが目的であり、自身の研究を基盤とした発展研究であるという点で学術的独自性が高い。また、代表者は、マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) を用いた PGC 様細胞の分化誘導系 (Hayashi et al., *Cell*, 2011) において、グルコースを除去する、あるいは解糖系を阻害することにより、PGC 様細胞分化が異常なることを見出している。代謝系は細胞のエネルギー・物質合成の根幹を担うことから、遺伝子発現をはじめとする他の細胞システムと連結して、これまで解明されてこなかった新規分化制御モデルの創造につながることが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、「始原生殖細胞の発生・分化における代謝調節の役割を、下記の手法により分子メカニズムレベルで包括的に明らかにする」ことを目標とした。

### **(1) 始原生殖細胞の分化誘導培養における環境変化の影響の包括的検証**

培地中に含まれる各種アミノ酸、ビタミン、無機塩類、核酸などの濃度を種々に変更した培地を用いる、あるいは特定の代謝経路の促進剤・阻害剤を添加することで代謝系を変化させ、始原生殖細胞分化への影響を観察する。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、エピプ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する。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を探索する。申請者はすでにグルコース枯渇条件を含むいくつかの環境条件についてこれらの実験を進めており、複数の環境条件で PGC 様細胞の分化傾向が変化することを見出している。これらを端緒とし、環境要因の変化が始原生殖細胞の分化に及ぼす影響を包括的に調査する。

### **(2) 生体内での始原生殖細胞分化における代謝調節の寄与の検証**

(1)の解析で分化傾向が変化する環境条件について、生体内での同様の環境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、鍵となる代謝酵素遺伝子のノックアウト (KO) マウス

を作出する。着目する代謝系の主要代謝酵素遺伝子について、目的遺伝子を機能欠損した胎仔を得る。目的遺伝子の KO マウスが胚発生初期で致死となる場合は、目的遺伝子に *LoxP* 配列を挿入した *floxed* マウスを作出する。これをエピプラスト由来細胞で Cre リコンビナーゼを発現する Sox2-Cre トランスジェニックマウス (Hayashi et al., *Mech. Dev.*, 2002) などと交配して、始原生殖細胞の発生時期に代謝酵素遺伝子を欠損したコンディショナル(c)KO マウスを得る。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する。

変化が観察された場合、着目する代謝系が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検証する。まずは、代謝変化が始原生殖細胞の遺伝子発現変動を引き起こすかを、着目する環境条件で分化誘導した PGC 様細胞や(c)KO マウスの始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) により調べる。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する。さらに、着目する代謝系が原因遺伝子の発現を制御する分子メカニズムを、着目する代謝系とシグナル伝達経路・転写因子・エピゲノム因子などの関わりを基に推測する。

### (3) 環境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)で立案した仮説に基づき代謝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を明らかにしていく。(1),(2)で新たに着目した代謝系に関して、提案した仮説に従い、ウェ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、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通して分子メカニズムを明らかにしていく。

## 4. 研究成果

### (1) 始原生殖細胞の分化誘導培養における環境変化の影響の包括的検証

様々な代謝系の阻害剤や中間代謝化合物の添加条件で PGC 様細胞を分化誘導したところ、解糖系の分岐経路であるヘキソサミン生合成経路の阻害により誘導が抑制されることが明らかになった。この際の遺伝子発現変動は解糖系を阻害した場合とよく似ており、解糖系の下流で PGC 形成を制御する主要な経路がヘキソサミン生合成経路であることが示唆された。ヘキソサミン生合成経路の最終産物である UDP-N-acetylglucosamine はタンパク質への O-結合型  $\beta$ -N-アセチルグルコサミン付加 (O-GlcNAc 化) 修飾の基質となることから、この反応を阻害したところ、解糖系阻害時と同様の PGC 形成阻害を示した (図 1)。

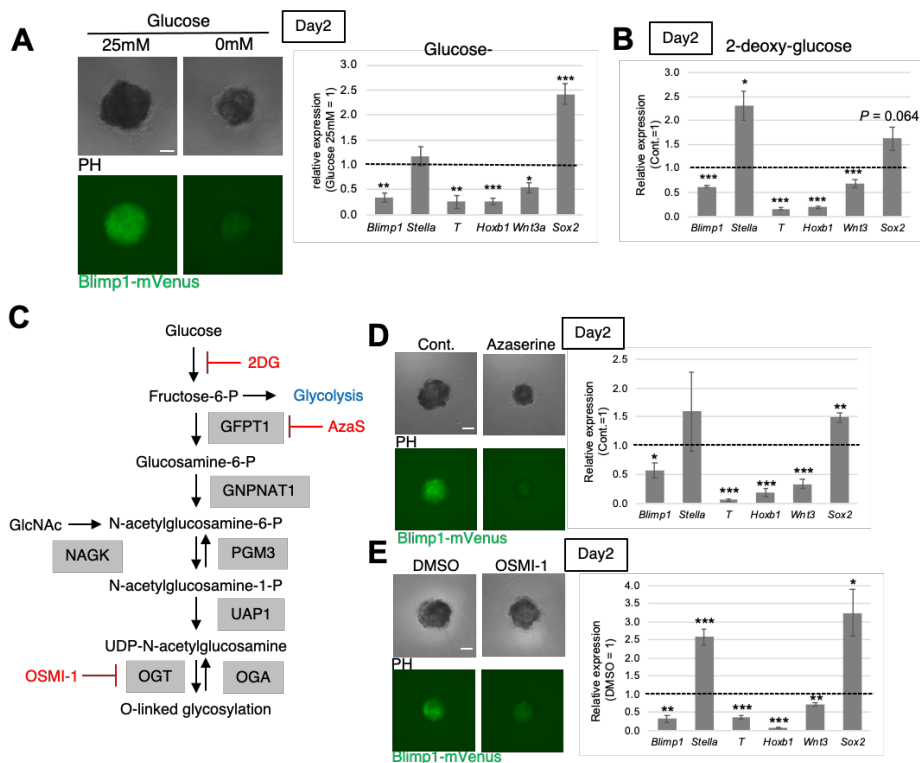
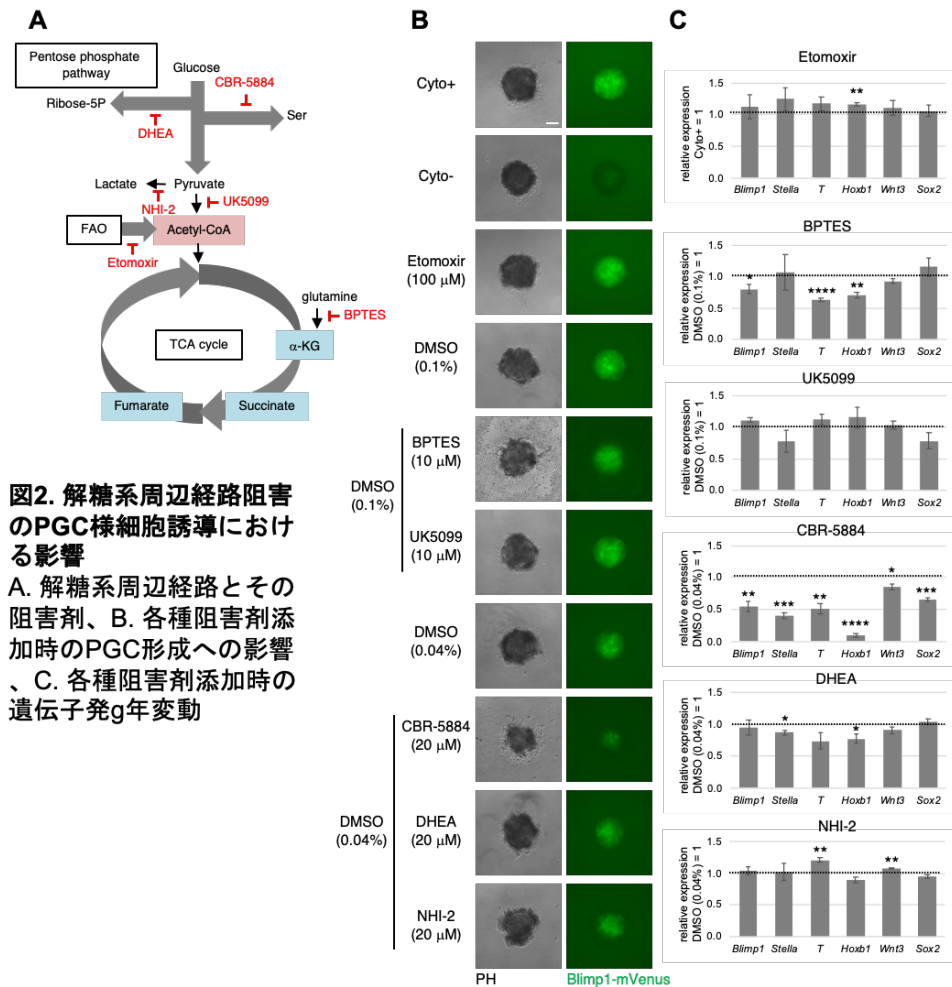


図1. グルコース代謝阻害によるPGC様細胞形成の抑制

A. グルコース枯渇条件でのPGC様細胞誘導、B. 解糖系阻害条件でのPGC用遺伝子発現変化、C. ヘキソサミン生合成経路、D. ヘキソサミン生合成経路の阻害条件でのPGC様細胞の誘導、E. O-GlcNAc阻害条件でのPGC様細胞の誘導

さらに他の解糖系分岐経路の解析では、セリン代謝経路の阻害により PGC 形成が阻害されることを見出した。この時の遺伝子発現変動は解糖系阻害やヘキソサミン生合成経路阻害とはパ

ターンが異なっていたことから、これらとは異なる仕組みで PGC 形成を制御していることが示唆された。この仕組みについても引き続き解析を進めている (図 2)。



**(2) 生体内での始原生殖細胞分化における代謝調節の寄与の検証**

タンパク質の O-GlcNAc 化の PGC 形成への寄与を *in vivo* で調べるため、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) のエピブラスト特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製して解析を行った (*Ogt-flox; Sox2-Cre*)。Ogt は X 染色体上の遺伝子であるが、ホモノックアウトはエピブラスト

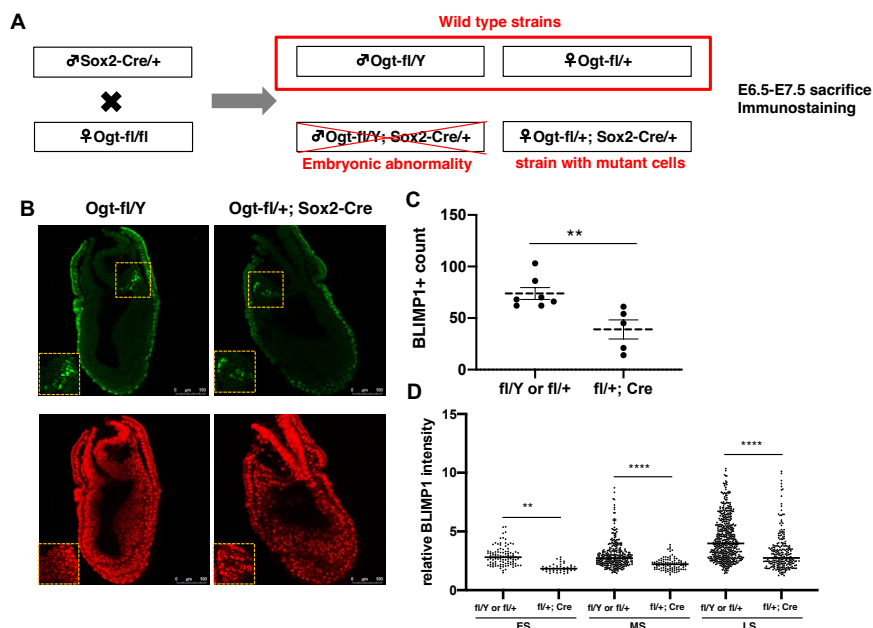


図3. Ogtのエピブラスト特異的コンディショナルノックアウトマウス胚の解析  
 A. Ogtノックアウトの手法、B. E7.0胚のPGC形成の様子、C. PGC数の変化、D. PGCマーカーBLIMP1の平均蛍光強度の定量

に異常をきたすため、メスのヘテロノックアウトマウスを解析対象とした。その結果、*Ogt* ヘテロノックアウトマウスはPGC形成が抑制されることが明らかになった。また、この胚ではOGTの発現量とBLIMP1の発現量に正の相関性が見られたことから、O-GlcNAc化がPGCマーカーの遺伝子発現に重要な役割を果たすことが示唆された(図3)。

セリン代謝経路の障害の影響については、セリン代謝の責任酵素であるホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PHGDH)のエピブラスト特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製して解析予定である。

### (3) 環境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

マウスへの低糖質、高脂質のケトン食給餌により、血中ケトン体濃度を上昇させ、血糖値を低下させると、主要なエネルギー代謝はケトン代謝へと変換され、糖質代謝は抑制される(図4)。

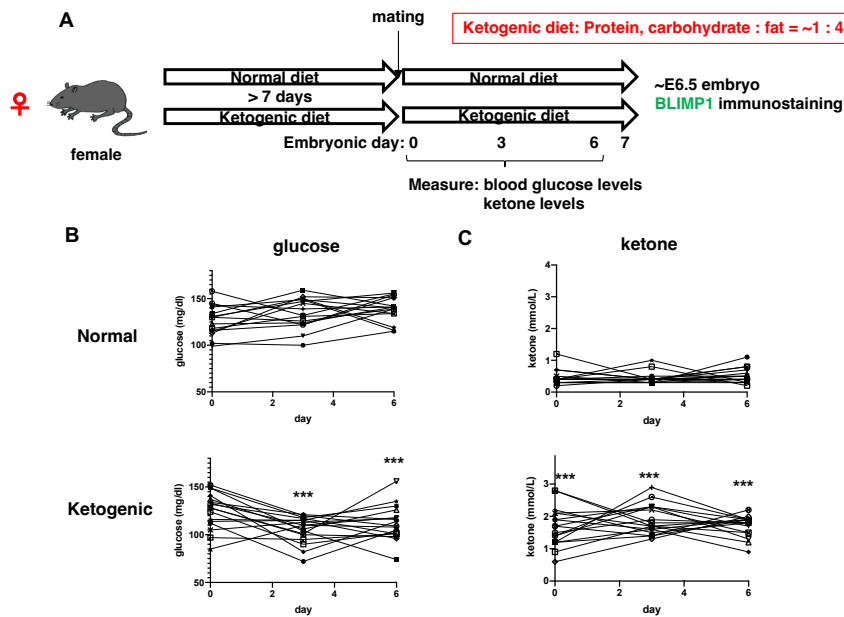


図4. ケトン食給餌マウスの交配試験

A. ケトン食給餌スキーム、B. ケトン食給餌による血糖値の変化、C. ケトン食給餌による血中ケトン体の変化

この仕組みを利用して、遺伝子改変を伴わない糖質代謝の低下条件下で始原生殖細胞の形成に影響を与えることができるかを検証した。ケトン食給餌によりケトジェニックな状態にしたメスマウスを通常のおスマウスと交配し、胎子のPGC形成の状態を検証したところ、顕著な低下が見られた。このことから、自然な糖質制限条件下でも胎子のPGC形成が抑制されることが示唆された。また、さらなる追跡調査により、できた直後のPGC形成だけではなく、胎子精巣や卵巣中の生殖細胞数もケトン食給餌の継続により低下すること、その影響はケトン食給餌を停止しても少なくとも卵巣中の生殖細胞ではしばらく継続することが示唆された(図5)。

セリン代謝経路の障害についてもセリン欠乏餌の給餌により検証する予定である。

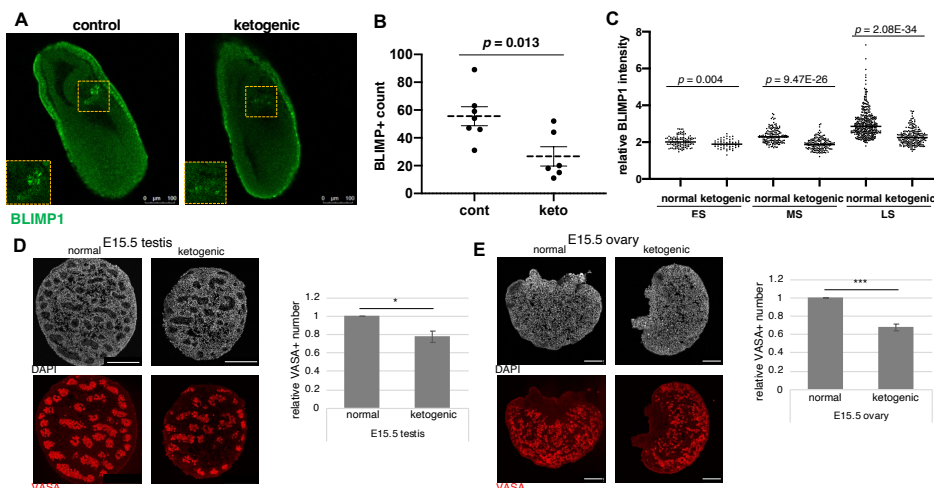


図5. ケトン食の生殖細胞形成への影響

A. E7.0胚のPGC形成の様子、B. PGC数の変化、C. PGCマーカーBLIMP1の平均蛍光強度の定量、D. E15.5精巣中の生殖細胞、E. E15.5卵巣中の生殖細胞

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Keiko, Hayashi Yohei, Takehara Asuka, Ito-Matsuoka Yumi, Tachibana Masahito, Yaegashi Nobuo, Matsui Yasuhisa	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/iaab064	査読の有無 無
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 MATSUI Yasuhisa, HAYASHI Yohei	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 2022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 無
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 Yohei, Matsui Yasuhisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolic Control of Germline Formation and Differentiation in Mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
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 無
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 Narita Kohei, Kudo Tada-aki, Hong Guang, Tominami Kanako, Izumi Satoshi, Hayashi Yohei, Nakai Junichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of Beta 2-Adrenergic Receptor Gly16Arg Polymorphism on Taste Preferences in Healthy Young Japanese Adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1430 ~ 1430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14071430	査読の有無 無
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 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/iaaa115	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 Watanabe Kei, Hong Guang, Tominami Kanako, Izumi Satoshi, Hayashi Yohei, Kudo Tada-aki	4. 巻 248
2. 論文標題 Association between Beta3-Adrenergic Receptor Trp64Arg Polymorphism and Fat Preference in Healthy Young Japanese Women	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 181 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.248.181	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 Kudo Tada-aki, Tominami Kanako, Izumi Satoshi, Hayashi Yohei, Noguchi Takuya, Matsuzawa Atsushi, Hong Guang, Nakai Junichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Characterization of PC12 Cell Subclones with Different Sensitivities to Programmed Thermal Stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8356 ~ 8356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21218356	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 Luo You-Ran, Kudo Tada-aki, Tominami Kanako, Izumi Satoshi, Tanaka Takakuni, Hayashi Yohei, Noguchi Takuya, Matsuzawa Atsushi, Nakai Junichi, Hong Guang, Wang Hang	4. 巻 23
2. 論文標題 SP600125 Enhances Temperature-Controlled Repeated Thermal Stimulation-Induced Neurite Outgrowth in PC12-P1F1 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15602 ~ 15602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232415602	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 雌雄に特徴的な代謝系を介した生殖細胞の性スペクトラム制御機構
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム」 第5回領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 The role of glucose metabolism in primordial germ cell fate determination
3. 学会等名 2021年度日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 代謝調節を基盤とした生殖細胞の性スペクトラム
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム」 第6回領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 Metabolic control for ensuring integrity in male germline differentiation
3. 学会等名 第2回配偶子インテグリティ領域会議・若手会議合同集会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 Metabolic control-based sex spectrum regulation in germ cells
3. 学会等名 2021年度性スペクトラム領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 Metabolic control of male germline differentiation and integrity
3. 学会等名 新学術領域研究合同公開シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Hayashi
2. 発表標題 Regulation of metabolic signaling in mouse primordial germ cell development
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Metabolic Signaling (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Hayashi
2. 発表標題 Proteomic and metabolomic characterization in mouse fetal germline differentiation
3. 学会等名 2019年度日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林陽平
2. 発表標題 マウス生殖細胞分化における代謝調節の変化とその役割
3. 学会等名 「世界を先導するリプロダクションコアの形成」研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------