

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03426

研究課題名(和文) Maxタンパク質による減数分裂開始抑制とその抑制解除の為の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular bases of liberation of germ cells from Max-dependent suppression of meiotic onset

研究代表者

奥田 晶彦 (Akihiko, Okuda)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60201993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、以前、非典型的なPRC1複合体の一つ(PRC1.6)が、体細胞分裂時期にある生殖細胞において減数分裂が起こらないように減数分裂関連遺伝子群の発現を強力に抑えていること、及び、同複合体がES細胞において異所的に減数分裂が起こらないように働いていることも明らかにしていた。本研究課題において、私たちは、生殖細胞が減数分裂を開始する際に、PRC1.6の構成因子の一つであるMaxの発現を減らす及びPRC1.6の形成に対してドミナントネガティブに働くMgaタンパク質を産生することを明らかにした。加えて、PRC1.6におけるMgaが持つ2つのDNA結合領域の重要性について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物の生殖細胞が体細胞分裂により活発に増殖するのを止めて減数分裂を開始する仕組みについてはほとんどわかっていない。本研究では、生殖細胞がPRC1.6複合体の機能を不活化することで減数分裂の開始を可能にしていることとの確定的な証拠を得たことに加え、PRC1.6の構成因子であるMax及びMgaをターゲットとした少なくとも2つの異なる機構により、生理的にPRC1.6の不活化が達成されていることを明らかにした。これらの成果により、減数分裂の開始機構についての研究を進展させたのみならず、男性不妊が危険因子の一つとされている精巣腫瘍の原因の解明の為の一つの基盤を提供できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that PRC1.6, one of non-canonical subtypes of PRC1, functions as a strong blockade against meiosis. In this study, we have unequivocally demonstrated that inactivation of the function of PRC1.6 is a prerequisite stem for germ cells to onset meiosis. Moreover, we have demonstrated that there are at least two independent mechanisms are operating in germ in parallel to attenuate repressing activity of PRC1.6 for meiotic onset. One way is that germ cells reduces expression levels of Max gene that encodes one of PRC1.6 components substantially prior to meiotic onset. The other way is that germ cells produce anomalous protein from Mga gene locus that functions as a dominant negative regular against the construction of PRC1.6 via germ cell-specific alternative splicing. In addition, we have demonstrated that both of two DNA binding domains that Mga protein bears are independently involved in repressing rather distinct sets of meiosis-related genes each other.

研究分野：幹細胞研究

キーワード：生殖細胞 ES細胞 減数分裂 非典型的PRC1 Max

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

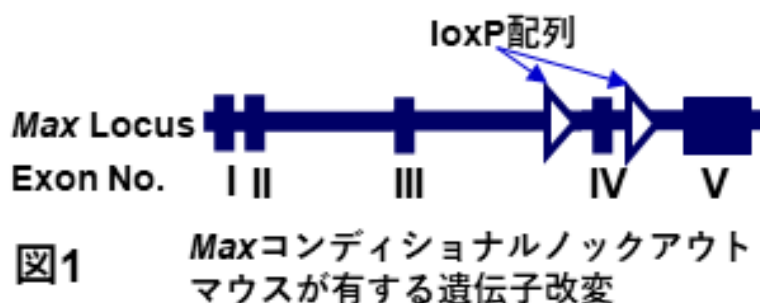
減数分裂は、染色体の数を半分に減らす特殊な細胞分裂の様式であり、生理的には、生殖細胞特異的に見られる細胞分裂の様式である。しかし、生殖細胞といえども、通常の体細胞と同様に、体細胞分裂によりその数を増やす能力も併せ持っている。減数分裂は、減数分裂 S 期、減数分裂前期、第一減数分裂及び第二減数分裂により構成される極めて複雑であり、かなりの時間を要する過程であるが、これらの過程については酵母からヒトに至るまでの様々な種間においてその仕組みが高度に保存されており、そのことが助けとなってかなり研究が進んでいる。一方で、生殖細胞が体細胞分裂を止めて減数分裂を開始する仕組みについては種間での保存が極めて乏しく、その為、この点については、減数分裂そのものの研究と比べてかなり遅れている。中でも、哺乳動物の生殖細胞が減数分裂を開始する仕組みについては研究が遅れている。なお、私たちは、以前、PRC1.6 という非典型的な PRC1 複合体の中の 하나가、体細胞分裂時期にある生殖細胞において減数分裂が起こらないように減数分裂関連遺伝子群の発現を強力に抑えていることを見出していた¹。かつ、私たちは、予備的なデータではあるが、生殖細胞が、減数分裂を開始するのに先立って、PRC1.6 複合体の減数分裂の開始を抑制する機能を減弱させていることを見出していた。加えて、私たちは、ES 細胞が、生殖細胞ではないにも関わらず減数分裂を開始する潜在能力を有しており、かつ、ES 細胞が異所的に減数分裂を起こさないように、その潜在能力は、生殖細胞と同様に、PRC1.6 複合体により抑制されていることも明らかにしていた。

2. 研究の目的

1 の項目に記載したように、私たちは、PRC1.6 複合体が生殖細胞における減数分裂を抑えており、生殖細胞は、減数分裂を開始する際に、同複合体の機能を不活化することを示唆するデータを得ていたが、生殖細胞がどのようにして PRC1.6 複合体の機能を低下・破綻させているかについては全く分かっていなかったため、本研究課題では、そのことを明らかにすることを主な目的として研究を行った。加えて、ES 細胞を材料として用いることにより、PRC1.6 複合体が減数分裂を抑制するための機構の詳細な解析を目的とした研究も行った。

3. 研究の方法

PRC1.6 複合体が生体内における体細胞分裂期にある生殖細胞での減数分裂を抑制しているという確定的な証拠を得るために、PRC1.6 複合体の構成因子の一つをコードする *Max* 遺伝子のコンディショナルノックアウト解析を中心に研究を進めた。具体的には、共同研究者である



米国の Robert Eisenman 博士から提供された *Max* コンディショナルノックアウトマウス (*Max* 遺伝子の exon IV が loxP 配列で挟まれているマウス) (図 1) に対して、CRE-ERT2 の発現が Oct4 遺伝子プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックマウスと掛け合わせることで、タモキシフェンを投与することにより着床後の胚においては生殖細胞特異的に *Max* 遺伝子が破壊されるように設定した。そして、実際、それらのマウスを掛け合わせ、性交後 8.5 日 (8.5 dpc) の妊娠マウスに対してタモキシフェンを投与することにより *Max* 遺伝子をノックアウトし、そのことが生殖細胞に及ぼす影響について調べた。また、PRC1.6 複合体の構成因子であると同時に *Myc* に対するパートナー因子として体細胞分裂の促進にも関わる *Max* の発現調節が生殖細胞における減数分裂の開始の制御に関わる可能性があることから、減数分裂の過程における *Max* の mRNA 及びタンパク質の量の変動について詳細に調べた。また、*Max* 以外の PRC1.6 複合体の構成因子をコードする遺伝子での alternative splicing を介した PRC1.6 複合体の構築の抑制の可能性について検討した。ES 細胞を用いた研究では、14 個もの因子により構成される PRC1.6 の構築における足場的な役割を果たしている Mga タンパク質の機能解析を中心に行った。

4. 研究成果

(1) *Max* コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

妊娠マウスを介して 8.5 dpc のマウス胎児にタモキシフェンを投与することで *Max* 遺伝子をノックアウトし、その後の胎児の生殖隆起を回収した。そして、RNA 調製後 *Sycp3* 等の減数分裂関連遺伝子の発現を定量的 PCR により検討したところ、雌の生殖細胞のみならず、胎生期では本

来減数分裂が起こらない雄の生殖細胞においても、減数分裂関連遺伝子の発現の上昇が見られた。私たちは、この結果を、Max を構成因子の一つとして有する PRC1.6 複合体の機能破綻が生殖細胞における生理的な減数分裂の開始の引き金になっていることを強く示唆する結果であると考えている。なお、Max 遺伝子は、あらゆる種類の細胞においてほぼ一定量の発現を示すハウスキーピング遺伝子に分類させる遺伝子であるが、私たちは、生殖細胞での発現プロファイル

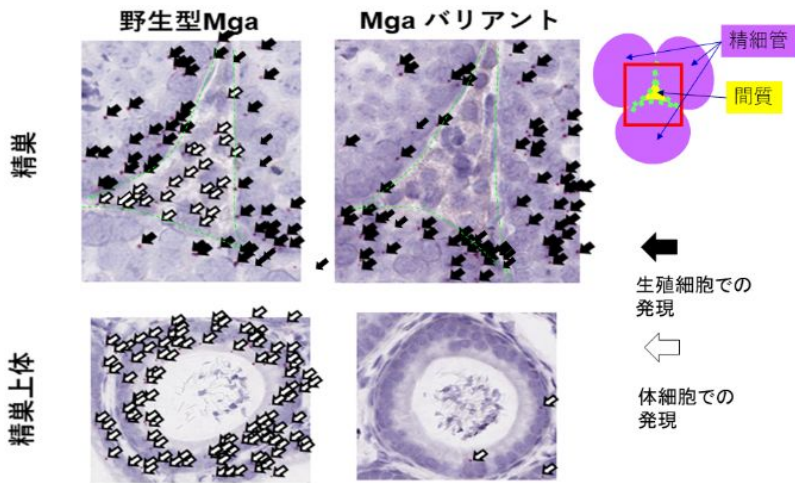


図2 野生型及びバリエント Mga の精巣及び精巣上体での発現の検出

を詳細に解析したところ、同遺伝子は、体細胞分裂期にある生殖細胞では、周りの体細胞と比べて極めて高い発現を維持しており、しかし、その発現は、減数分裂の開始に先だって一過性に顕著に低下する。ただし、その低下した Max の発現は、シナプトネマ複合体の構築が完成する pachytene 期になると再び上昇することを発見した。従って、これらの結果から、減数分裂の開始の為に PRC1.6 複合体の機能の低下については、少なくとも Max 遺伝子の発現により調節されていることが強く示唆された。

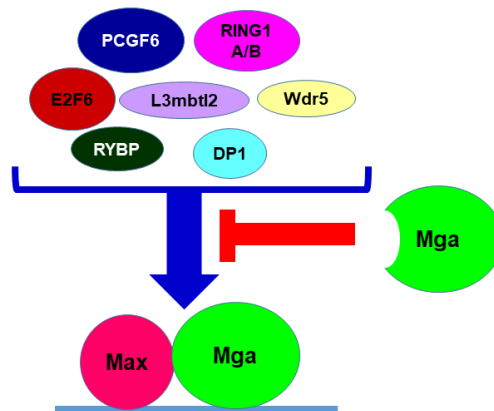
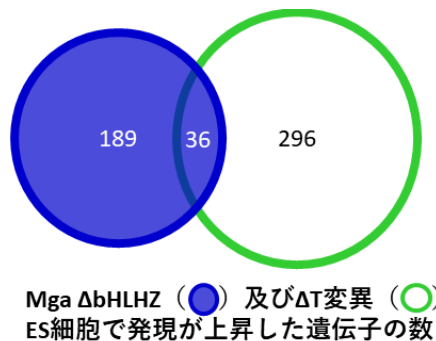


図3 実験的に証明された生殖細胞特異的 Mga タンパク質の PRC1.6 複合体の構築に対するドミナントネガティブ作用についてのモデル図

(2) 生殖細胞における alternative splicing を介した PRC1.6 の機能制御の可能性の検討

上記の結果は、Max 遺伝子の発現の低下が、減数分裂に対して強力に抑制する PRC1.6 複合体の機能低下を引き起こし、そのことで、生殖細胞が体細胞分裂を止めて減数分裂を開始することが可能になるというスキームを想定させるものであるが、減数分裂は、生殖細胞が精子や卵子へと変換するための極めて重要なステップであるので、Max 遺伝子の発現調節のみで減数分裂の開始がコントロールされているのではなくて、Max の発現が低下しないといった異常な状態になったとしても、減数分裂の開始が可能になるように、Max タンパク質以外の PRC1.6 複合体の構成因子をコードする遺伝子に対して、同複合体の機能破綻を司る分子基盤が存在しているのではないかと考えた。なお、生殖細胞は、神経系の細胞と同様に、極めて多くの遺伝子座において alternative splicing が認められる²ことから、alternative splicing を介した PRC1.6 の機能の調節の可能性を探った。その結果、Mga 遺伝子座において、PRC1.6 複合体の構築に対してドミナントネガティブに機能することが予測されるトランスクリプトが減数分裂過程に



Mga ΔbHLHZ (●) 及び ΔT 変異 (○) ES 細胞で発現が上昇した遺伝子の数

GO 解析

Category	P-value
Meiotic cell cycle	1.40E-26
	1.30E-13

図4 マウス ES 細胞における Mga の ΔbHLHZ 及び ΔT 変異が遺伝子発現に及ぼす影響についての解析

ある生殖細胞に特異的に産生されることを見出し(図2)かつ、そのトランスクリプトによってコードされる Mga タンパク質は、生化学的な解析により、実際にドミナントネガティブ体として機能することを証明した³(図3)。

(3) PRC1.6 複合体の構成因子の一つである Mga タンパク質についての機能解析

ES 細胞を用いた Mga タンパク質の機能解析については、Mga タンパク質が T-box と bHLH-bZ という2つの異なる DNA 結合領域を持つ極めて希少なタンパク質である⁴ことから、その特徴の意味・重要性について主に解析した。その結果、Mga タンパク質が有するこれら2つの DNA 結合領域は、それぞれが基本的に異なる遺伝子セットの発現の抑制に関わっていることを明らかにした。しかし、Gene Ontology 解析の結果、それらの2つの異なる遺伝子群のいずれにも、顕著に減数分裂関連遺

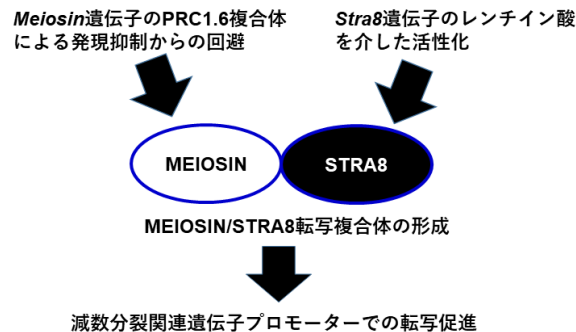


図5 減数分裂関連遺伝子群の活性化のためのカスケード

伝子が集積していることが明らかになった⁵(図4)かつ、Mga の bHLH-bZ ドメイン依存的に発現が制御されている減数分裂関連遺伝子は、Max タンパク質が発現の抑制に関わっている減数分裂関連遺伝子と共通しているものが多く、一方、Mga タンパク質の T-box によって発現が抑制されている減数分裂関連遺伝子群と Max によって発現が制御されている遺伝子群の間では、ほとんど共通点が見られないことがわかった。また、これらの解析の過程で、Stra8 と伴に強力に減数分裂を促進する Meiosin タンパク質⁵をコードする遺伝子は、Mga の bHLH-bZ ドメイン依存的に PRC1.6 複合体により発現が抑制されている遺伝子の一つであること証明した。これらの結果は、ES 細胞を用いて得られた結果であることから、生理的な減数分裂での現象をどこまで忠実に反映しているかについてはわからないが、Meiosin が減数分裂に対する抑制から促進に切り替わるための楔子のような役割を果たすことができる潜在能力を持った分子である可能性を示唆している(図5)。

< 引用文献 >

1. Suzuki, A. *et al.* Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. *Nat Commun* **7**, 11056 (2016).
2. Yeo, G. *et al.* Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* **5**, R74 (2004).
3. Kitamura, Y. *et al.* Identification of germ cell-specific Mga variant mRNA that promotes meiosis via impediment of a non-canonical PRC1. *Sci. Rep.* **11**, 9737 (2021).
4. Hurlin, P.J. *et al.* Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *EMBO J.* **18**, 7019-7028 (1999).
5. Uranishi, K. *et al.* Two DNA binding domains of MGA act in combination to suppress ectopic activation of meiosis-related genes in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **39**, 1435-1446 (2021).
6. Ishiguro, K.I. *et al.* MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells. *Dev. Cell* **52**, 429-445 e410 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nishimoto Masazumi, Uranishi Kousuke, Asaka Masamitsu N., Suzuki Ayumu, Mizuno Yosuke, Hirasaki Masataka, Okuda Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Transformation of normal cells by aberrant activation of YAP via cMyc with TEAD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47301-6	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 Hirasaki Masataka, Mizuno Yosuke, Ida Yui, Murakoshi Takayuki, Okuda Akihiko, Kotani Norihiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification and characterization of splenic adherent cells forming densely packed colonies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 283 ~ 293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12605	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 Kitamura Yuka, Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Nishimoto Masazumi, Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of germ cell-specific Mga variant mRNA that promotes meiosis via impediment of a non-canonical PRC1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-89123-5	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 Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Kitamura Yuka, Mizuno Yosuke, Nishimoto Masazumi, Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Two <scp>DNA</scp> Binding Domains of <scp>MGA</scp> Act in Combination to Suppress Ectopic Activation of Meiosis-Related Genes in Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1435 ~ 1446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3433	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 Mochizuki Kentaro, Sharif Jafar, Shirane Kenjiro, Uranishi Kousuke, Bogutz Aaron B., Janssen Sanne M., Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko, Koseki Haruhiko, Lorincz Matthew C.	4. 巻 12
2. 論文標題 Repression of germline genes by PRC1.6 and SETDB1 in the early embryo precedes DNA methylation-mediated silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-27345-x	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 Nakano Takanari, Aochi Hidekazu, Hirasaki Masataka, Takenaka Yasuhiro, Fujita Koji, Tamura Masaru, Soma Hiroaki, Kamezawa Hajime, Koizumi Takahiro, Shibuya Hirotooshi, Inomata Reiko, Okuda Akihiko, Murakoshi Takayuki, Shimada Akira, Inoue Ikuo	4. 巻 478
2. 論文標題 Effects of Ppar 1 deletion on late-stage murine embryogenesis and cells that undergo endocycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 222 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2021.07.003	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 Inoue Hitoshi, Hirasaki Masataka, Kogashiwa Yasunao, Kuba Kiyomi, Ebihara Yasuhiro, Nakahira Mitsuhiro, Sakai Akihiro, Okuda Akihiko, Sugawara Masashi	4. 巻 141
2. 論文標題 Predicting the radiosensitivity of HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma using miR-130b	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 640 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2021.1897160	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 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木 歩、浦西洸介、北村友佳、平崎正孝、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 MaxノックアウトES細胞は哺乳類で減数分裂の開始機構を研究する有用なツールである
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村友佳、浦西洸介、鈴木 歩、平崎正孝、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 生殖細胞特異的なMgaバリエントが減数分裂開始を誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西本正純、浦西洸介、浅賀正充、鈴木 歩、水野洋介、平崎正孝、奥田晶彦
2. 発表標題 Yapの異常な活性化による形質転換はYap/TEAD複合体によるcMyc遺伝子の転写亢進による
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷典弘、平崎正孝、水野洋介、井田 唯、村越隆之、奥田晶彦
2. 発表標題 脾臓組織培養により出現するコロニー形成接着細胞の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Kitamura, Kousuke Uranishi, Masataka Hirasaki, Masazumi Nishimoto, Ayumu Suzuki, Akihiko Okuda
2. 発表標題 Identification of meiotic germ cell-specific Mga variant that functions as a negative regulator of non-canonical PRC1 leading to the promotion of meiotic onset
3. 学会等名 International Society of Stem Cell Research-annual meeting (Web開催) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 歩, 浦西 洸介, 北村 友佳, 水野 洋介, 西本 正純, 奥田 晶彦
2. 発表標題 Mammalian germ cell meiotic initiation is regulated by MAX
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村 友佳, 浦西 洸介, 平崎 正孝, 西本 正純, 鈴木 歩, 奥田 晶彦
2. 発表標題 Generation of meiotic germ cell-specific Mga splice variant for promoting meiotic onset via inactivation of non-canonical PRC1
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦西洸介、北村友佳、鈴木 歩、平崎正孝、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 MgaはbHLH領域を介してMeiosin-Stra8シグナルを制御することによって減数分裂移行を抑制する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 歩、浦西洸介、北村友佳、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 MAXによるマウス生殖細胞の減数分裂開始制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム基礎医学 http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/
--

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
研究分担者	鈴木 歩 (Suzuki Ayumu) (80639708)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	

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			
米国	Fred Hutchinson Cancer Research Center			