

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16147

研究課題名（和文）Mgaバリエーションの減数分裂時期特異的な産生の生物学的意義と分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the biological significance and molecular mechanisms of meiosis-specific production of Mga variants.

研究代表者

浦西 洸介 (Uranishi, Kousuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：40783238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞や生殖細胞におけるMgaの機能は未だ不明な点が多く、生殖細胞の減数分裂開始におけるPRC1.6の制御機構は不明瞭であった。しかしながら、申請者はMgaが2つの異なるDNA結合領域を使い分け、より多くの減数分裂関連遺伝子を抑制していること、減数分裂を行う生殖細胞ではナンセンス依存的mRNA分解機構が抑制されていることを利用し、野生型Mgaに対してドミナントネガティブに働く生殖細胞特異的MgaSVを産生していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mgaの下流標的遺伝子や、MgaによるPRC1.6制御機構が明らかになったことによって、配偶子形成や減数分裂開始における分子メカニズムの解明の大きな一歩となった。また、Mgaは多種多様ながんで変異が報告されており、今回の研究で見つかった知見はMga変異型のがんの病態解明にもポジティブな波及効果をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our understanding of the molecular mechanisms that prevent precocious meiotic onset by PRC1.6 is far from complete. Moreover, how germ cells impede the function of PRC1.6 for physiological meiotic onset remains totally obscure. In this research project, I have demonstrated that two distinct DNA binding domains of Mga, a scaffolding component of PRC1.6 enables the complex to repress numerous meiosis-related genes. I have also demonstrated that germ cells produced anomalous MGA that functions against the construction of PRC1.6 as a dominant negative regulator via germ cell-specific alternative splicing for promoting progression of meiosis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：減数分裂 PRC1.6 Mga Meiosin Stra8

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

雌雄の区別を持つ哺乳類では、精子・卵子という配偶子を形成するが、いずれの場合も始原生殖細胞への分化や、減数分裂といった生殖細胞特異的な過程を経て形成される。生殖細胞であっても、未分化な幹細胞の状態であれば、通常体細胞と同様に体細胞分裂によって細胞増殖を行っているが、分化に伴って減数分裂を開始する。生殖細胞が減数分裂を開始する為には、レチノイン酸-Stra8 という減数分裂に対して正に作用する経路の活性化と PRC1 複合体による負の作用の減弱・消失が必要である。しかしながら、これらの2つの事象のいずれにおいても、現状ではそれらを支えている分子メカニズムの理解が十分にできておらず、未だ不明な点が多い。私が所属する研究室では、以前、マウス ES において、Max 遺伝子のノックアウトを行うと、本来 ES 細胞では起こり得ないはずの減数分裂が進行すること、減数分裂関連遺伝子の上昇は、Max と相互作用を持つ遺伝子のうち、Mga 遺伝子の発現抑制でのみ生じることを報告し、次に Mga に焦点を当てて研究を行うこととした。Mga は、6 種類のサブタイプが存在する PRC1 複合体の中でも、非典型的である PRC1.6 複合体に属している転写因子であり、2 種類の異なる DNA 結合領域を持つ。そのため、PRC1.6 複合体の標的選択に大きな役割を果たしていると考えられるが、Mga タンパク質がマウスでは 3042、ヒトでは 3065 アミノ酸残基を有する巨大なタンパク質であるため、その生理機構は不明な点が多い。本研究を始めるにあたり、公開されている RNA-sequence のデータを用いて Mga の発現やスプライシングの検証を行った所、減数分裂が開始するにあたり、Mga の発現量は変動が無いが、生殖細胞特異的にスプライシングが変化し、Mga タンパク質としては C 末端の bHLH-LZ 部位以降のタンパク質が翻訳されないバリエーションの mRNA(MgaSV)が発現していることを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、未だに不明な点が多い Mga の機能の解析及び、生殖細胞においてのみ産生される Mga バリエーションの生理的機能の解明を通して、生殖幹細胞の減数分裂移行を司る、PRC1.6 の機能を制御する分子メカニズムの全容の解明を目的として研究を行う。

3. 研究の方法

(1)機能部位欠損 Mga 発現 ES 細胞の作製

Mga は、約 3000 アミノ酸残基を持つ巨大なタンパク質であり、その N 末端に T-box DNA 結合ドメイン、C 末端に bHLH-Leucine Zipper(bHLH-LZ)ドメインの2つの異なる DNA 結合領域を持つ稀有な転写因子であり、ヒストン H2A の 119 番目のリジン残基をユビキチン化し、遺伝子発現の抑制を行う PRC1 複合体のうち、非典型的な PRC1.6 の構成因子となっている。Mga は PRC1.6 複合体の中でも、DNA 結合能を持つタンパク質であることから、複合体の標的選択性に大きな影響を与えると考えられる。しかし、Mga はその巨大さ故に研究が進んでおらず、下流標的遺伝子などの同定は未だに進んでいないのが現状である。そこで、本項目では、MgaSV の機能をより深く検証するために、CRISPR-Cas9 の系を用いて Mga の機能ドメインである T-box 領域と bHLH-LZ 領域を欠損した Mga を発現する ES 細胞を作製し、様々な分子生物学的手法を用いて Mga の機能解析を行う。

(2)MgaSV の機能解析

MgaSV は生殖細胞特異的にスプライシングされる Exon19a が挿入されることによって、終止コドンが挿入され、2363 アミノ酸残基の C 末端が欠損した Mga が翻訳される mRNA が作られる。これにより、C 末端にある機能ドメインである bHLH-LZ を欠いたバリエーションとなるが、bHLH-LZ や C 末端を欠損したことにより、PRC1.6 の構築に変化があるのか、野生型の Mga にとってこのバリエーションはどのように機能するのかが未だ不明である。そこで、本項では、MgaSV と他の PRC1.6 構成因子を共発現し、共免疫沈降を行うことによって、MgaSV が PRC1.6 複合体を構築できるか否か、および、マウス ES 細胞に MgaSV を過剰発現することによって、遺伝子発現や PRC1.6 の動態が変化するかを QRT-PCR や ChIP assay を用いて検証する。加えて、なぜ減数分裂を行っている細胞でのみ MgaSV が産出されているか、そのメカニズムを解明する。

(3)MgaSV ノックアウトマウスの作製

MgaSV が実際に生体内の生殖細胞において何らかの機能を持っているかどうかを検証するために、Exon19a を標的とした CRISPR-Cas9 をマウスに受精卵に導入し、生まれたマウスを掛け合わせることによって Mga Exon19a ホモ欠損マウス(MgaSV KO マウス)を作製し、MgaSV KO マウスの掛け合わせで妊孕性に何か変化があるのか、また、生後に精巣や精巣上体を採取し、免疫染色や QRT-PCR を行うことによって MgaSV KO マウスでは生殖細胞に何らかの変化が起こっているかを検証し、MgaSV の精子形成における機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) ES 細胞における Mga の機能解析

Mga の Exon2(T-box) と Exon20(bHLH-LZ) を標的とした Cas9 をマウス ES 細胞に導入することによって T-box を欠損した Mga を発現する ES 細胞株(Mga Δ T-box ES 細胞)と bHLH-LZ 領域を欠損した Mga を発現する ES 細胞株(Mga Δ bHLH-LZ ES 細胞)を樹立した。まず、これらの機能部位欠損 Mga 変異体が PRC1.6 複合体を形成できるかどうかを免疫沈降によって検証したところ、Mga 抗体による免疫沈降によって PRC1.6 の構成因子が沈降されていることがウェスタンブロットによって確認されたので、Mga Δ T-box および Mga Δ bHLH は PRC1.6 複合体を形成できることが明らかとなった。また、これらの ES 細胞と野生型の ES 細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて網羅的に検証したところ、Mga Δ T-box ES 細胞と Mga Δ bHLH-LZ ES 細胞では上昇する遺伝子が大きく異なることが明らかになった。加えて、これらの遺伝子群の機能を検証するために遺伝子オントロジーエンリッチメント解析を行ってみた所、興味深いことに、どちらの遺伝子群も減数分裂関連の機能をもつ遺伝子が集積していることがわかった。これらの結果により、Mga は T-box と bHLH-LZ 領域で異なる減数分裂遺伝子群を制御していることが明らかとなった。また、これらの遺伝子群の制御領域に存在するヒストン修飾を ChIP-assay および ChIP-sequence によって検証したところ、発現が変動した遺伝子群の制御領域にある抑制的ヒストン修飾である H2A K119ub や H3K27me³ が低下し、遺伝子発現の活性化に重要である H3K27Ac 修飾が亢進していることが明らかとなった。これらの結果から、Mga は保有する 2 種類の DNA 結合領域を用いて、多くの減数分裂関連遺伝子の制御領域周辺にあるヒストンに抑制的ヒストン修飾を導入することによって遺伝子発現を抑制していることが明らかとなった。減数分裂起程にはレチノイン酸シグナルによる Stra8 上昇が重要であることが報告されているため、これらの機能部位欠損 Mga 発現 ES 細胞のレチノイン酸への感受性を検証したところ、野生型 ES 細胞や、Mga Δ T-box ES 細胞ではレチノイン酸を添加しても減数分裂開始に重要な遺伝子である Meiosin 遺伝子やその他の減数分裂関連遺伝子の上昇は確認されなかったが、Mga Δ bHLH-LZ ES 細胞ではレチノイン酸添加によって Meiosin 遺伝子の上昇や、bHLH-LZ 領域欠損によって上昇した遺伝子群のさらなる発現上昇が見られた。加えて、Sycp3 の免疫染色を行うと、レチノイン酸を添加した Mga Δ bHLH-LZ ES 細胞において、pre-meiotic な Sycp3 染色像が確認された。これらの結果より、Mga の bHLH-LZ 領域は、Meiosin 遺伝子の発現を強固に抑える事によって Meiosin-Stra8 のポジティブフィードバックループ形成を抑制し、減数分裂開始を抑制していることが明らかとなった。

(2) MgaSV の機能解析

MgaSV の相互作用の変化を検証するために、HEK293FT 細胞に MgaSV および PRC1.6 の構成因子を共発現させ、共免疫沈降を行い、MgaSV が PRC1.6 複合体を形成できるか否かを検証した。その結果、MgaSV は Max との相互作用に重要である bHLH-LZ を欠損しているため、Max 遺伝子との相互作用が失われていることが明らかとなった。一方で、他の因子とは野生型と同様に相互作用が可能であった。次に、ES 細胞における MgaSV の機能を検証するためにマウス ES 細胞に MgaSV を過剰発現した所、Mga Δ bHLH-LZ ES 細胞で上昇が見られた遺伝子群の上昇が見られ、さらに ChIP assay によって、それらの遺伝子群への PRC1.6 複合体の構成因子である Pcgf6 の集積の減少が見られた。これらのことから、MgaSV は、自身の bHLH-LZ 領域を欠損させ、ゲノム上の E-box 配列に結合できなくすると同時に、野生型 Mga から PRC1.6 構成因子を競合的に奪うことによってドミナントネガティブに働き、Mga の bHLH-LZ 領域によって制御される減数分裂関連遺伝子の発現を正に制御していることが明らかとなった。

MgaSV mRNA は Exon19a が挿入されることによって終止コドンが挿入されるため、本来であればナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(NMD)によって、その mRNA は分解されると考えられる、その分解機構はタンパク質の翻訳依存的に行われているので、タンパク質の翻訳の阻害を行うシクロヘキシミドを培地に添加し、細胞から mRNA を回収して MgaSV の mRNA の量を RT-PCR で比較したところ、既に MgaSV が発現している Spermatogonia や、Spermatocyte では殆ど変化は見られなかったが、MgaSV の発現が見られない ES 細胞や MEF において、MgaSV の mRNA 量が増加した。このことから、MgaSV の発現はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構によって制御されることが明らかとなった。

(3) MgaSV ノックアウトマウスの解析

Mga の Exon19a を標的とした CRISPR-Cas9 を B6 マウスの受精卵に導入し、生まれてきたマウスを B6 マウスと掛け合わせることによって MgaSV ヘテロマウスを作製した。MgaSV ヘテロマウス同士を掛け合わせて生まれたマウスを Genotyping した所、野生型とヘテロマウスとホモノックアウトマウスがメンデル遺伝の法則通りほぼ 1:2:1 の割合で得られた。また、生まれた MgaSV KO マウスと野生型の B6 マウスを 8 週齢で掛け合わせて妊孕性の検証を行ったところ、MgaSV KO マウスも野生型と同様の妊孕性を維持していることが明らかとなった。加えて、8 週齢の MgaSV KO 雄マウスから精巣や精巣上体を採取し、精子幹細胞や精子の数を検証してみたが、違いは見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mochizuki K, Sharif J, Shirane K, Uranishi K, Bogutz AB, Janssen SM, Suzuki A, Okuda A, Koseki H, Lorincz MC.	4. 巻 12(1)
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 7020
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 該当する
1. 著者名 Uranishi K, Hirasaki M, Kitamura Y, Mizuno Y, Nishimoto M, Suzuki A, Okuda A.	4. 巻 39(11)
2. 論文標題 Two DNA binding domains of MGA 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 Kitamura Y, Uranishi K, Hirasaki M, Nishimoto M, Suzuki A, Okuda A.	4. 巻 11(1)
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 9737
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 Yoneda R, Ueda N, Uranishi K, Hirasaki M, Kurokawa R.	4. 巻 295(17)
2. 論文標題 Long noncoding RNA pncRNA-D reduces cyclin D1 gene expression and arrests cell cycle through RNA m 6 A modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5626-5639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011556.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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bHLHZ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回分子生物学会年会
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回分子生物学会年会
4. 発表年 2021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 Kitamura Y, Uranishi K, Hirasaki M, Nishimoto M, Suzuki A and Okuda A
2. 発表標題 Identification of meiotic germ cell-specific Mga splice variant that functions as a negative regulator of non-canonical PRC1 leading to the promotion of meiotic onset
3. 学会等名 ISSCR 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kitamura Y, Uranishi K, Hirasaki M, Nishimoto M, Suzuki A and Okuda A
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

〔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
---------	---------