

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05066

研究課題名（和文）MYC-MAX-MGAネットワークによる減数分裂開始制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of MYC-MAX-MGA network in meiotic onset of mouse

研究代表者

鈴木 歩 (Suzuki, Ayumu)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：80639708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,800,000円

研究成果の概要（和文）：減数分裂は酵母からヒトまで有性生殖生物に広く保存された特別な細胞分裂様式である。哺乳類では生殖細胞のみが減数分裂を行い、精子や卵子が作られる。生殖細胞は減数分裂に先立ち体細胞分裂により数を増やすが、どのように体細胞分裂から減数分裂へと切り替わるのかについては、いまだ明らかでない部分が多い。我々は近年、Max遺伝子を抑制することによりES細胞から減数分裂様の細胞を誘導することに成功した。しかしMaxが実際生体内においても減数分裂を抑制する作用を担っているかについては不明である。そこで本研究課題では、生体内での減数分裂開始機構におけるMaxの機能の解明を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞分裂から減数分裂への切り替えは哺乳類ではほとんどわかっておらず、Maxがこれを制御することが生体内できちんと証明されることはこの分野の理解を大きく進めることが期待される。さらに哺乳類の減数分裂は、生殖細胞という生体内のごく限られた細胞で生じる現象であるため、一般的に解析には技術的な困難を伴う。しかしながら減数分裂開始の分子基盤の解明に関してES細胞を用いていることは、極めて複雑な精子、もしくは卵子の形成を司る分子基盤の中で、減数分裂のみに特化し、その他の配偶子形成に関わる分子メカニズムを排除した実験系を提供することができる。

研究成果の概要（英文）：In mammal, Germ cells undergo meiosis to differentiate into sperm and eggs. Although germ cells increase in number by mitosis prior to meiosis, it is still unclear how they switch from mitosis to meiosis. We have previously succeeded in inducing meiotic-like cells by repressing the Max gene in ES cells. The main objective of this project was to prove that the in vivo phenomena observed in ES cells can also be observed in vivo.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 MAX MYC MGA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

bHLH-LZ 型の転写因子である MAX は MYC ファミリー (c-MYC, N-MYC, L-MYC) と 2 量体を形成することで、細胞増殖や代謝に関わる遺伝子の発現を活性化することができる。一方 MAX の MYC 結合部位は 6 種類ある MAD ファミリーのメンバーとも相互作用するが、これらの MAD/MAX 複合体は、専ら、転写抑制複合体として機能する。私たちは、ドキシサイクリン(Dox)の添加により *Max* の発現を誘導的に消失させることができるマウス ES 細胞を用いて、細胞増殖速度低下といった MYC/MAX 転写複合体の機能の消失が原因であるフェノタイプを観察したが、そのみならず、ES 細胞が、減数分裂前期の細胞と酷似した細胞へと変換するという、全く予期していなかった現象に遭遇した(図1, Suzuki et al., Nature Communications 30;7:11056, 2016)。

*Max* ノックアウト ES 細胞 (*Max* KO ESC) から誘導された減数分裂様の変化は、始原生殖細胞分化に必須な *Blimp1* 遺伝子がホモ欠失された ES 細胞でも問題なく観察されたことから、ES 細胞が、*Max* の発現の消失に伴い、始原生殖細胞への分化を経ることなしに、直接、減数分裂を開始したことが示唆された。なお、これらの結果は、上記に記したように、元来、減数分裂とは無縁である ES 細胞を用いて得られた実験結果であったが、そのことが、本来での生殖細胞における生理的な現象の一部を忠実に反映していることを示唆するデータとして、雄雌いずれの場合も、減数分裂に先立って、内在性の MAX タンパク質の量が顕著に減少していることや、精巣に存在する精原幹細胞由来の生殖幹細胞(GS 細胞)で *Max* の発現を抑制してもやはり減数分裂様の細胞が誘導されることを確認した。また、分子生物学的な解析から、*Max* の発現の減少に依存した減数分裂の誘導は、MAD ファミリーのうちのひとつである MGA を含むポリコーム抑制複合体 PRC1.6 の機能の破綻の結果であることを突き止めた。

私は、上記に記載したように減数分裂の開始には MGA/MAX の機能が低下することが重要であることを見出したが、それに加えて、この *Max* 遺伝子の発現の減少に依存した現象が見られる為には、体細胞分裂活性と関わりが深い MYC/MAX の機能も同時に低下していることも重要であることを示唆するデータを得ている。したがって申請者は、MAX を中心に据えた体細胞分裂からの減数分裂への切り替えの為の MYC-MAX-MGA ネットワークモデルを提唱した。すなわち、体細胞分裂を行う細胞では MYC/MAX が下流の体細胞分裂促進遺伝子を活性化すると同時に、MGA/MAX(PRC1.6)は減数分裂遺伝子を抑制しているが、一方体細胞分裂から減数分裂へと移行する際には、MAX レベルが低下することに伴い MYC/MAX も MGA/MAX もその機能を喪失して、体細胞分裂の停止と減数分裂遺伝子の発現上昇が同時に MAX という一つのファクターの制御により起こるとするものである(図2参照)。本研究は、このモデルの妥当性を検討することを最終的な目的としているが、それに先立ち Max が生体内において、確かに減数分裂の制御に関わることをマウス生体内において証明することをまず大きな目的とした。

### 2. 研究の目的

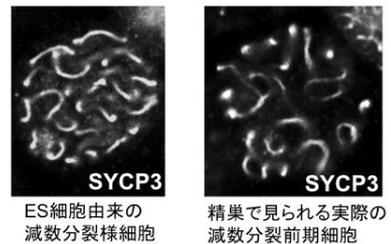
本研究では、上記に記載したように、哺乳類の生殖細胞において、どのように体細胞分裂から減数分裂へと切り替わるのか、そのメカニズムを明らかにする。これまで申請者はマウス ES 細胞で *Max* 遺伝子をノックアウトすると、始原生殖細胞への分化を経ることなしに、ES 細胞から直接減数分裂が誘導されること、また MAX が、MYC ではなくて MGA とパートナーを組むことにより形成されるポリコーム抑制複合体 PRC1.6 が減数分裂関連遺伝子の発現の抑制することを *in vitro* の系で明らかにしている。そこで私は MAX が体細胞分裂と減数分裂の両方を一度に調節することで、この 2 種類の細胞分裂様式の切り替えを制御するという仮説のもと、Max による減数分裂抑制が生理的な現象であること、Myc-Max-Mga ネットワークが体細胞分裂から減数分裂への移行の局面においてどのような機能を果たすのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) MAX コンディショナルノックアウトマウスおよびノックインマウスの作成

私が提唱する体細胞分裂から減数分裂への切り替えの為の MYC-MAX-MGA ネットワークとは、MAX という一つの分子が体細胞分裂と減数分裂という相異なる 2 つの現象の両方を同時に調節するというものである。すなわち、体細胞分裂と減数分裂のそれぞれに対してアクセルとブレーキに相当する MYC、及び MGA は、いずれも機能発揮において MAX を必要としているので、MAX の

図1 *Max*ノックアウトES細胞では減数分裂が誘導される



ES細胞由来の減数分裂様細胞

精巣で見られる実際の減数分裂前期細胞

図2 MYC-MAX-MGAネットワークによる減数分裂開始制御モデル



量の減少、もしくは消失は、それら両方の機能の破綻を引き起こす。そして、そのことが、減数分裂の開始に必要であるというものである。そこで、ノックアウト及びトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 実験を中心に解析を進めることで、その仮説の妥当性を検証することにした。コンディショナルノックアウトマウスについては、CreERT2 を生殖細胞で機能する *Oct4* のプロモーター制御下で発現するマウス (*Oct4-dPE-CreERT2*) と loxP 配列により挟まれた *Max* コンディショナル KO マウス (*Max ckO*) を用いて、始原生殖細胞で *Max* をノックアウトする。タモキシフェンは E8.5、もしくは E10.5 で投与し、継時的に gonad を回収し、mRNA の発現解析、および *Max* ノックアウトに伴う SYCP3 などの減数分裂マーカーの発現を観察した。

ノックインマウスは *Rosa26* 遺伝子が持つ発現調節領域によって *Max* が発現されるようにマウスに遺伝子操作を加え (*Rosa26/flxed-EGFP-Max knock-in mouse*)、*Oct4-dPE-CreERT2* マウスと掛け合わせして、タモキシフェン投与により *Oct4* 陽性の生殖細胞において *MAX* を過剰発現させることが可能なマウスを作成した。

## (2) MYC/MAX の恒常的な活性化に伴う減数分裂開始機構への影響の評価

減数分裂開始時には、一般に体細胞分裂は抑制されているが、これが MYC/MAX の機能低下によるものであるという仮説を持って研究を行う。そこで MYC の機能のみを維持する目的で変異型 MYC/MAX のペアーを *Max* ノックアウト ES 細胞に導入し、体細胞分裂が継続させた条件で、*Max* ノックアウトに伴う減数分裂が開始するかどうか、またそのときの遺伝子の変化を観察した。さらに MGA ノックアウト ES 細胞を作成することにより、MYC/MAX が活性を持つ条件において PRC1.6 が破綻された場合、減数分裂が起きるかどうか、また減数分裂遺伝子の発現がどうなるか観察した。

## 4. 研究成果

(1) *Max* は性分化前の始原生殖細胞において減数分裂の開始を抑制した。

哺乳類では胎児期にはメスでのみ減数分裂が開始する。E8.5 から PGC は hind gut を通り、E10.5 あたりで genital ridge へ移動し、そこで gonad を形成する。E11.5 あたりで体細胞の性分化が始まるが、まだこのときには PGC の性決定は行われておらずオスにもメスにもならえる bipotential な状態である。減数分裂は E13.5 のメスの PGC で開始し、オスは出生後に開始する。これまで *MAX* の免疫染色によりその局在をみたところ E11.5 ではオスでもメスでも顕著に PGC では *MAX* が存在するが、E13.5 のメスでは顕著に *MAX* の核局在は消失していた。一方オス E13.5 PGC では *MAX* は顕著に核に局在していた。そこで E8.5 にタモキシフェンを投与することにより、E11.5、E12.5、E13.5 の PGC で *MAX* ノックアウトの影響を観察した。まず E12.5 の PGC においておよそ 50% の割合で *Max* がノックアウトされていることを確認した。またそのような条件で E12.5 の PGC ではオスでもメスでも *MAX* ノックアウトに伴い、減数分裂遺伝子の上昇が確認された。ところが E13.5 で確認したところ、*Max* ノックアウトに伴う減数分裂遺伝子群の mRNA の発現上昇は、コントロールと比較し、大きな影響は見られなかった。またオスでは E12.5 までは *Max* ノックアウトに伴い SYCP3 の核内シグナルの増強がみられるものの、E13.5 ではそのようなシグナルを有する細胞の割合が減少し、また減数分裂前期に特徴的なファイバー状のシナプトネマ構造も見られなかった。つまり、性分化前においては雄でも *MAX* ノックアウトに伴い減数分裂関連の遺伝子は顕著に上昇するが、性分化後ではそれらの上昇はキャンセルされてしまうことがわかった。驚くべきことに、genital ridge へ移動途中の PGC でも *MAX* が KO されると SYCP3 シグナルが観察されたことから、*MAX* は移動途中から性が決定される E12.5 頃まで減数分裂関連遺伝子の発現を抑制していることがわかった(論文投稿準備中)。一方で *MAX* を過剰発現させた場合、メスの減数分裂が抑制されるフェノタイプを期待していたが、E14.5 で *MAX* 過剰発現された PGC において減数分裂が開始していることが見られたため、減数分裂の開始には *MAX* 以外の要素による PRC1.6 複合体の機能破綻を導く機構が存在することが示唆された。減数分裂遺伝子は確かに性分化前では *MAX* に抑制されているものの、おそらく性分化後には *MAX* があったとしても別の因子が PRC1.6 の機能を抑制する可能性が考えられた。

(2) MYC の活性は減数分裂の開始を阻害した。

減数分裂の開始に先立ち、体細胞分裂が抑制されることが必要であるかどうかを検証するため、ES 細胞に変異型の MYC/MAX ペアーを過剰発現させた。この変異型ペアーは PRC1.6 の *MAX* には影響しないため、*MAX* をノックアウトすることにより MYC/MAX の活性がオンで MGA/MAX の活性がオフの条件を作り出すことができる。その結果、MYC の活性があると *MAX* をノックアウトしたとしても減数分裂は起こらず、体細胞分裂が継続したことから、減数分裂の開始には MYC/MAX の活性低下も必要であることが示唆された。このとき PRC1.6 制御下の減数分裂遺伝子の中には MYC の活性により低下されるものが存在したため、これらの遺伝子が抑制されることが減数分裂の開始抑制につながっているのではないかと思われる。どうような結果は MGA ノックアウト ES 細胞においてもみられ、PRC1.6 の機能だけでなく、MYC/MAX による体細胞分裂促進作用も抑制されることが体細胞分裂から減数分裂へと移行するには重要であることが示唆された。

体細胞分裂から減数分裂へと移行する仕組み

本研究の成果として、MAX による減数分裂遺伝子抑制が生理的な減少であることを証明できた。またこれまで我々以外のグループから MAX 以外の PRC1.6 の要素である Ring1 や E2F6, RYBP, PCGF6, MGA などにおいて減数分裂遺伝子の抑制に働いていることが主に ES 細胞を用いたノックアウト実験によって明らかにされている(Kehoe et al., 2008, Hisada et al., 2012, Endo et al., 2017, Stielow et al., 2018)。またマウスにおいては canonical および noncanonical な PRC1 で共通している Ring1A/B のノックアウトマウスにおいて減数分裂開始のタイミング制御に関わることがわかっている(Yokobayashi et al., 2013)が、我々の研究では PRC1 のうち noncanonical な PRC1.6 が減数分裂の制御に関わることを示している。我々の研究結果は、減数分裂が開始する前には、MYC/MAX の機能低下も必要であることを示唆している。MYC-MAX-MGA ネットワークが体細胞分裂から減数分裂を制御するとの仮説は概ね正しいと思われるが、MAX の過剰発現実験では、MAX mRNA の発現レベルを過剰にしても減数分裂開始には影響が見られなかったため、mRNA 以外の MAX 制御メカニズムや、MAX 以外の PRC1.6 のメンバーの制御も減数分裂関連遺伝子の発現制御には関係しているのかもしれない。今後は、そのような PRC1.6 の構築と破綻を制御するメカニズムを明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirasaki M, Ueda A, Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Kohda M, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Sharif J, Koseki H, Okuda A.	4. 巻 Sep;36(9)
2. 論文標題 Identification of the Coiled-Coil Domain as an Essential Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3 Element for Preserving Lineage Commitment Potential of Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1355-1367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2849.	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 Okuda Akihiko, Uranishi Kousuke, Suzuki Ayumu	4. 巻 4
2. 論文標題 Discovery of a new role for the p53 family in the onset of mesendodermal differentiation of embryonic stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Investigation	6. 最初と最後の頁 24 ~ 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/sci.2017.03.07	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 Masataka Hirasaki, Atsushi Ueda, Masamitsu N. Asaka, Kousuke Uranishi, Ayumu Suzuki, Masakazu Kohda, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Masazumi Nishimoto, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Akihiko Okuda	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Identification of the coiled-coil domain as an essential Mbd3 element for preserving lineage commitment potential of embryonic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2849	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 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ayumu Suzuki, Kitamura Yuka, Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Nishimoto Masazumi Akihiko OKUDA
2. 発表標題 「Is the regulation of meiotic onset controlled by Myc-Max-Mga network in mouse germ cells?」
3. 学会等名 The 16th RCGM international Symposium of Academic Frontier
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 歩, 平崎 正孝, 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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 Mga遺伝子の新規スプライシングバリエントによる減数分裂制御機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 歩, 平崎 正孝, 浅賀 正充, 浦西 洸介, 西本 正純, 奥田 晶彦
2. 発表標題 Maxは体細胞分裂から減数分裂への切り替えを制御するか
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平崎 正孝, 鈴木 歩, 浦西 洸介, 浅賀 正充, 西本 正純, 奥田 晶彦
2. 発表標題 MBDドメインが欠失したMbd3バリエントによるES細胞の分化多能性賦与機構の解明
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅賀 正充、平崎 正孝、西本 正純、鈴木 歩、浦西 洸介、奥田 晶彦
2. 発表標題 Nucleostemin欠損ES細胞におけるOct3/4転写因子のDNA結合特異性の変化
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木 歩、奥田 晶彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 実験医学2018年 3月号 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 ES細胞と生殖細胞におけるMyc-Max-Mgaネットワーク	

〔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