

令和 2 年 2 月 25 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860244

研究課題名(和文) ES細胞におけるMax非結合型c-Mycによるアポトーシス誘導機構の解明

研究課題名(英文) Molecular bases of apoptotic phenotype provoked by c-Myc which is liberated from Max control

研究代表者

平崎 正孝(Hirasaki, Masataka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10522154

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)：当研究室は、Mycタンパク質が機能する上で必要であるタンパク質をコードするMax遺伝子のホモ欠失ES細胞がアポトーシスを示す事を報告して来た。本研究では、c-Myc とNanogが相互作用を示す事を見出した。また、非ステロイド性の抗エストロゲン剤であるタモキシフェンで活性が調節できるc-MycERをES細胞へ導入し、安定株を樹立した後、その細胞株にタモキシフェンを添加するとアポトーシスを起こした。これらの結果より、Max欠失ES細胞が示すアポトーシスはMax非結合型c-Mycによるものであり、このc-Mycによるアポトーシスは、Nanogと結合する事で抑制される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES細胞においてMax欠損状態では、生物学的な機能を持たないであろうと考えられていたc-Mycが、アポトーシスを誘導するという思いもよらない現象を引き起こした。そこで申請者は、この現象を規定している分子メカニズムを解明する事は、c-Myc に関して全く新しい分子指標を見出すことに繋がるのではないかと考えている。そして、この研究は、c-Myc を標的としたES細胞のアポトーシス誘導による、未分化状態の細胞を優先的に死滅させる創薬や排除させるシステムの構築の指針なると考えている。

研究成果の概要(英文)：In 2011, our lab reported that extinction of Max gene expression in ES cells provoke cell death. In this study, we found that Nanog is co-precipitated with N-Myc and c-Myc proteins in a Max protein independent manner. Next we performed the experiments with Myc-ER fusion protein and found that activation of Myc activities in ESCs provokes apoptosis like that observed with Max-null ES cells. Indeed, we found that c-Myc-ER stable transfectants of wild-type ESCs show extensive apoptotic phenotype by the addition of 4-hydroxytamoxifen. Based on these findings, we hypothesize that Myc proteins liberated from Max control in Max-KO ESCs attribute to apoptotic phenotype of Max-KO ESCs and Nanog can neutralize apoptosis-promoting activity of Myc proteins by interacting with them.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞

1. 研究開始当初の背景

c-Myc タンパク質は、ES 細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞) の未分化性の維持と自己複製に必須であり、また、iPS 細胞の誘導効率を著しく増大させることが知られている。しかし、c-Myc 遺伝子を導入して樹立した iPS 細胞は、宿主 DNA に組み込まれた c-Myc 遺伝子の再活性化により腫瘍化のリスクが高まる事が報告されている。この問題を回避するために、c-Myc の導入方法の開発や、代替タンパク質の同定等の研究が数多くなされてきた。iPS 細胞の腫瘍化のリスクについては c-Myc の再活性化の問題がクローズアップされる傾向にあるが、ES 細胞あるいは iPS 細胞は、元来未分化の状態で生体に移植すると奇形腫 (テラトーマ) を形成するという性質を有している。それ故に、我々は、安全な再生医療の実現には、多能性の誘導方法の開発のみならず、iPS 細胞が本来もつ腫瘍原性に焦点をあてた研究を進めていくことが重要であると考え。これまで、c-Myc は幹細胞自体のもつ腫瘍原性に深く関与することが報告されているものの、c-Myc が ES 細胞においてどのような役割をもつのかについては、あまりよく調べられてこなかった。申請者の所属する研究室は、Myc のパートナー因子である Max の機能を欠損させた ES 細胞を樹立し、ES 細胞における Myc の役割について検討・報告して来た。その結果、Max 欠損 ES 株ではアポトーシスを示すことを報告した。申請者がさらに研究を進めた結果、ES 細胞において、Max 非結合型 c-Myc はアポトーシスの原因になる。c-Myc と Nanog タンパクは直接相互作用する。Max 欠損 ES 細胞株の示すアポトーシスは、Esrrb の強発現によって抑制される。以上の未発表データを新たに見出ししていた。

2. 研究の目的

ES 細胞および iPS 細胞は、未分化の状態で生体に移植されると奇形腫 (テラトーマ) を形成するという性質を有し、この性質が再生医療への応用を阻む大きな障壁となっている。当研究室は、c-Myc のパートナー因子である Max を欠損させた ES 細胞がアポトーシスを起こし、この表現型は Nanog の強発現によって抑制される事を報告してきた。更なる解析の結果、c-Myc と Nanog は直接相互作用する事を、また、Max 欠損 ES 細胞の示すアポトーシスは、Max 非結合型 c-Myc が原因であり、Esrrb の強発現によっても抑制される事を見出した。この現象を規定している分子メカニズムを解明する事で、c-Myc に関して全く新しい分子指標を見出すことに繋がるのではないかと期待した。ES 細胞におけるアポトーシスの解明は、

未分化状態の細胞の優先的に死滅させるシステムの構築に繋がると考えた。

3. 研究の方法

本申請の目的は、ES 細胞における Max 非結合型 c-Myc によるアポトーシスの分子メカニズムを解明する事である。そこで、ES 細胞における Max 非結合型 c-Myc が他のタンパクをどのように認識しているかを明らかにする為、c-Myc と Nanog の各種 deletion form を作製し c-Myc と Nanog が結合する領域の決定を行う。Esrrb の強発現によっても Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスは抑制された。そこで、Esrrb を強発現させた Max 欠損 ES 細胞の解析を行う。Nanog や Esrrb のそれぞれが独自に c-Myc と結合するために、Max 非結合型 c-Myc の減少によってアポトーシスは抑制されている可能性を考えた。Nanog 強発現による Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスの抑制は、c-Myc/Nanog 複合体による Esrrb の発現上昇によるという可能性を考えた。そこで、Esrrb はの発現をノックダウンする事で、Nanog 強発現による Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスの抑制は変化するか調べる計画を立てた。

4. 研究成果

転写因子 c-Myc と Nanog が、protein interaction を示す事は、HEK293 細胞への共導入後の共免疫沈降によって見出ししていた。そこで、まず、ES 細胞を用い内在性の c-Myc と Nanog が、protein interaction を示すかを調べた、その結果、Nanog は、c-Myc とのみならず N-Myc とも protein interaction を示す事が見出された。c-, N-Myc は Max と複合体を形成する事で機能するが、Nanog との相互作用は、Max 非依存的であった。

Nanog が c-Myc のどの領域に結合しているかを調べた。HA tagged c-Myc deletion form が挿入されているプラスミドベクターを作成した。その HA-c-Myc deletion ベクターと Flag-Nanog を HEK293 細胞へ共導入し、共免疫沈降によって結合の有無を調べた。その結果、Nanog は、c-Myc の N 末端に結合している事が見いだされた。

非ステロイド性の抗エストロゲン剤であるタモキシフェンで活性が調節できる c-MycER を ES 細胞へ導入し、安定株を樹立した。その細胞株にタモキシフェンを添加すると、劇的な細胞死を示し、アポトーシスを起こしている事が見いだされた。しかし、その細胞死は N 末端を欠失させると抑制された。

c-Myc が Nanog のどの領域に結合しているかを調べた。Flag tagged Nanog deletion form が挿入されているプラスミドベクターを作成した。HA-c-Myc ベクターと Flag-Nanog deletion ベクターを HEK293 細胞

胞へ共導入し、共免疫沈降によって結合の有無を調べた。しかし、明確に結合領域を決定する事は出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. **Hirasaki M**, Hiraki-Kamon K, Kamon M, Suzuki A, Katano M, Nishimoto M, Okuda A. **2013**. Striking similarity in the gene expression levels of individual Myc module members among ESCs, EpiSCs, and partial iPSCs. PLoS One. 8, e83769. (査読有)
2. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, **Hirasaki M**, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Ema M, Takahashi S, Kato H, Okuda A. **2013**. In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. PLoS One. 8, e68119. (査読有)
3. Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, **Hirasaki M**, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. **2014**. Identification of ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. Stem Cells Dev. 15;23(18):2170-9. (査読有)
4. Numamoto M, Sasano Y, **Hirasaki M**, Sugiyama M, Maekawa H, Harashima S. **2014**. The protein phosphatase Siw14 controls caffeine-induced nuclear localization and phosphorylation of Gln3 via the type 2A protein phosphatases Pph21 and Pph22 in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biochem. In press (査読有)
5. Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Katano M, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, **Hirasaki M**, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Hishida-Nozaki Y, Vazquez-Ferrer E, Sancho-Martinez I, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. **2014**. Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. Stem Cells. In press (査読有)
6. Katano M, Ema M, Nakachi Y, Mizuno Y, **Hirasaki M**, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Takahashi S, Okazaki Y, Okuda A. Forced expression of nanog or esrrb preserves the esc status in the absence of nucleostemin expression. Stem Cells. In press (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. **平崎 正孝**、片野 幸、鈴木 歩、西本 正純、奥田 晶彦 Myc モジュール遺伝子群は ES 細胞と Epiblast 幹細胞の両者で高い発現の類似性を示す 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日~6 日 兵庫県神戸市・神戸ポートアイランド
2. **平崎 正孝**、片野 幸、鈴木 歩、西本 正純、奥田 晶彦 Myc モジュール遺伝子群は ES 細胞と Epiblast 幹細胞の両者で高い発現の類似性を示す 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム 2013 年 11 月 22~23 日 埼玉県日高市・埼玉医科大学 30 周年記念講堂
3. 鈴木 歩、菱田 友昭、**平崎 正孝**、曾我 朋義、奥田 晶彦 Max ノックアウト ES 細胞の激しい細胞死はヌクレオチド欠乏に伴う複製ストレスにより引き起こされる。第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日~6 日 兵庫県神戸市・神戸ポートアイランド
4. **平崎 正孝**、上田 篤、片野 幸、鈴木 歩、西本 正純、奥田 晶彦 Nanog は、Max 非結合型 Myc によるアポトーシスを抑圧するか? 「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」研究領域 平成 26 年度領域ミーティング 2014 年 10 月 28 日~29 日 兵庫県淡路島市・兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
5. **Masataka H**, Atsushi U, Miyuki K, Ayumu S, Masazumi N, Akihiko O. Does Nanog neutralize the apoptosis-promoting activity of c-Myc liberated from Max control? 第 12 回 RCGM フロンティアシンポジウム 2014 年 10 月 31~11 月 1 日 埼玉県日高市・埼玉医科大学 30 周年記念講堂
6. 片野 幸、水野 洋介、仲地 豊、**平崎 正孝**、鈴木 歩、西本 正純、岡崎 康司、奥田 晶彦 マウス ES 細胞において Nucleostemin ノックアウトによる未分化性の消失は Nanog もしくは Esrrb タンパク質強制発現により回避される 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日~27 日 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平崎 正孝 (HIRASAKI Masataka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10522154