

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15223

研究課題名(和文) 非生殖細胞である分化多能性幹細胞における異所性の減数分裂と胎生致死との関連

研究課題名(英文) Exploration of the possibility of involvement of ectopic meiosis in lethal phenotype of Max knockout embryos

研究代表者

奥田 晶彦 (OKUDA, AKIHIKO)

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は減数分裂を開始する際にPRC1.6複合体の機能を破綻させる必要があるが、その分子メカニズムの解明と人工的なPRC1.6複合体の機能の抑制が異所性の減数分裂を惹起を引き起こすかについて解析した。その結果、PRC1.6複合体の機能を破綻させることが想定される生殖細胞特異的Mgaバリエーションの同定及びMaxノックアウト雄始原生殖細胞での減数分裂遺伝子発現上昇の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Germ cells need to disrupt transcription repressing function of PRC1.6 to onset meiosis. In this study, I investigated the molecular bases of impairment of PRC1.6 function. I also tried to examine whether forced disruption of the function of PRC1.6 is accompanied with ectopic onset of meiosis. With these studies, I identified germ cell specific Mga variant which is supposed to disrupt the function of PRC1.6. Furthermore, I observed up-regulation in expression levels of meiosis-related genes in male primordial germ cells by homozygous knockout of Max gene.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：生殖細胞 減数分裂 PRC1 MAX MGA

1. 研究開始当初の背景

分化多能性を持った着床前及びその直後の胚の細胞では体細胞系列の細胞と生殖系列の細胞では区別されておらず、胚の着床後に起こる始原生殖細胞の誕生が、明確に精子もしくは卵子産生の為の細胞として運命づけられた細胞である。但し、その始原生殖細胞は精子・卵子形成に至るまで極めて複雑な過程を経る必要がある。他の発生過程にはない精子・卵子形成過程における最も特異的な現象は、通常の染色体の数を半分に減らす減数分裂である。但し、生殖細胞といっても、この減数分裂を開始するまでの過程においては、通常の体細胞と同様に体細胞分裂を繰り返すことで、その細胞数を増やす。但し、生殖細胞がどのような分子メカニズムでもって細胞分裂の様式を体細胞分裂から減数分裂に切り替えているかについてはほとんど解明されていない。このような状況の中で私たちの研究グループは、本研究を遂行するに先立ち、この体細胞分裂からの減数分裂への細胞分裂の様式の変換には専ら MYC 転写因子のパートナー因子として知られている MAX タンパク質が MYC とは無関係に減数分裂に対する強力な抑制因子としての機能を有することを見出し報告している。さらにこの報告では、生殖細胞とはある程度遺伝子発現パターンに類似性は認められるものの、生殖細胞とは全く関係のない ES 細胞も生殖細胞と同様に減数分裂を開始する製剤能力を有し、但し、ES 細胞では MAX に依存した減数分裂抑制機能が解除されることはないことを証明している。さらには、その論文では、MAX 依存的な減数分裂に対する抑制機能は、6 種類存在することが知られている Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) の中の最も非典型的な PRC1 複合体と称される PRC1.6 複合体の中の 1 つのサブユニットとしての機能を反映していることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、一つには、生殖細胞が減数分裂を開始する際の MAX をサブユニットして含む PRC1.6 複合体の減数分裂に対する抑制からの解除の分子メカニズムの解明及び 2000 年に既に報告されている Max 遺伝子ノックアウトマウスの胎生致死というフェノタイプにどれだけ異所性の減数分裂が関わっているかについて探った。さらには、雄・雌で減数分裂の時期が異なることはよく知られた事実であるが、そこに MAX がどのように関係しているかについても解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

PRC1.6 複合体を構成する 13 個のサブユニットの中で、MAX タンパク質等、6 種類存在する PRC1.6 複合体特異的なサブユニットをコードする遺伝子の生殖細胞特異的なバリア

ントについて公開されているデータベースを基に同定し、そのバリエーション産生の減数分裂開始に及ぼす影響について検討する。

既存の Max 遺伝子ノックアウトマウスの胎児期における雄の始原生殖細胞における Max 遺伝子のノックアウトに伴って本来は起こらない減数分裂が開始するかどうかを検討する。逆に本来減数分裂を起こす雌の始原生殖細胞での Max 遺伝子の過剰発現が及ぼす影響について検討する。

Max ノックアウトマウス (ヘテロ) の掛け合わせにより 4 分の 1 の確率で生ずる Max ノックアウトマウス (ホモ) の初期胚で減数分裂関連遺伝子の発現の上昇が見られるかどうかを検討する。

4. 研究成果

PRC1.6 複合体を構成するサブユニットの中で、PRC1.6 特異的なサブユニットである L3mbtl2、Mga、Max 遺伝子の精巣特異的なバリエーションの有無について公開されているデータベースを検索した。その結果、Mga をコードする遺伝子の第 18 番目のイントロンの一部が精巣特異的なエキソンとなっているバリエーションが存在することが示唆された。

正常な Mga 遺伝子のエキソン・イントロン構造

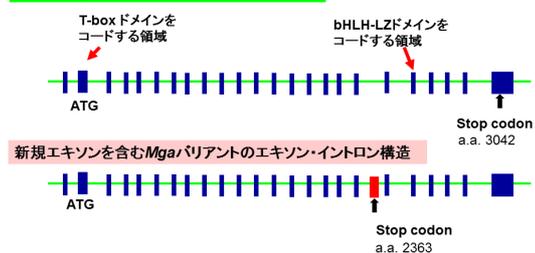


図1 野生型およびバリエーション Mga におけるエキソン・イントロン構造

そのデータをもとに、精巣由来の RNA から新規エキソンを含む領域をクローニングし、その配列を決定した。その結果、このエキソンは 145 基からなり、かつすべてのフレームにおいて終始コドンを含むため、新規エキソンの下流に存在する 6 エキソンに含まれる遺伝情報は無意味なものになっていることが分かった (図 1)。このことは、新規 Mga バリエーションがコードするタンパク質は、MAX

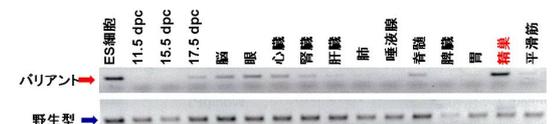


図2 野生型 Mga 及び Mga バリエーションの各臓器における発現

タンパク質との相互作用に必須な basic-helix-loop-helix leucine zipper ドメインを欠いていることを意味する。同定した Mga バリエーションの精巣特異的な発現パターンを確認するため様々な組織からの RNA 由来の

cDNA を鋳型として、その新規エキソンを含む領域について PCR を行った。その結果、予想通り、脳、肺、脾臓等様々な組織で新規エキソンを含む転写産物の発現が確認されたのは精巣のみであることが確認された。なお、興味深いことには、ES 細胞においても、Mga バリエントの発現が確認された (図 2)。

次に精巣特異的発現を示す Mga バリエントの精巣の中での発現パターンを明らかにする為に RNA Scope 法を用いた RNA In Situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、通常の Mga は精巣全体での発現が確認されたが、新規 Mga バリエントについては、精細管の中の生殖細胞でのみ発現が認められ、精細管と精細管の間に存在する間質細胞では全く発現が認められなかった。さらに詳細な解析を行ったところ、新規 Mga バリエントの発現は、生殖細胞の中でも減数分裂時期にある細胞にかなり特異的に発現していることが確認された。さらには、生殖細胞としては成熟した精子しか存在しない精巣上体では、新規 Mga バリエントの発現は、全く認められないことが分かった。MGA タンパク質と MAX タンパク質からなる二量体は、PRC1.6 複合体の中の骨格に相当するものであるため、生殖細胞が、減数分裂期に MAX とは相互作用できない MGA タンパク質をコードする Mga バリエントを産生することは、生殖細胞の減数分裂の開始に大いに関わっていることを強く示唆している。

胎生期にある雄の始原生殖細胞における Max 遺伝子のホモ欠失が雄の始原生殖細胞における減数分裂を惹起するかの研究については Max コンディショナルノックアウトマウスと Oct3/4 遺伝子プロモーターによって CRE/ERT2 融合タンパク質をコードする cDNA を発現するトランスジェニックマウスとの掛け合わせ及びタモキシフェン投与により、Max 遺伝子を始原生殖細胞特異的に欠失



図3 雌始原生殖細胞でのMax遺伝子過剰発現に伴う生殖隆起の形態変化の可能性

させた。その結果、Sycp3 タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色実験では、減数分裂時期に特徴的なシナプトネマ複合体の形成こそ見られなかったが遺伝子解析では、雄の野生型の始原生殖細胞よりも Max 遺伝子ノックアウト雄始原生殖細胞の方が、Ddx4 などの減数分裂関連遺伝子の発現が高いことが確認された。一方、雌の始原生殖細胞での MAX 遺伝子の過剰発現では、減数分裂関連遺伝子

の発現レベル及びシナプトネマ複合体の形成のいずれに対しても検知できる変化が見られなかったが、生殖隆起の横幅が広がっているといった、雄化を思わせる変化が見られた (図 3)。

Max 遺伝子ノックアウトマウス (ヘテロ) 間での掛け合わせでの Max 遺伝子ノックアウトマウス (ホモ) での異所性の減数分裂についてはそれを示唆するデータを得ることができなかった。そのデータについては初期胚での Max 遺伝子のノックアウトでは ES 細胞とは違って異所性の減数分裂は起こらないことを示しているのがあるいはその変化が微妙なため検出限界以下であるのか結論はつけられなかった。

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 7 件)

1. Hirasaki M, Ueda A, Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Kohda M, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Sharif J, Koseki H, Okuda A. Identification of the coiled-coil domain as an essential Mbd3 element for preserving lineage commitment potential of embryonic stem cells. *Stem Cells in press* Doi: 10.1002/stem.2849 査読あり
2. Fukuda K, Okuda A, Yusa K, Shinkai Y. A CRISPR knockout screen identified SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. *Genome Res* 28, 846-858, 2018 Doi: 10.1101/gr.227280.117 査読あり
3. Endoh M, Endo TA, Hayashi K, Sharif J, Shinga J, Endoh T, Nakayama M, Ishikura T, Farcas A, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of embryonic stem cells by silencing meiosis-related genes. *Elife* 6, e21064, 2017. Doi: 10.7554/eLife.27970 査読あり
4. Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Hirasaki M, Nishimoto M, Okuda A. Link between embryonic stem cell pluripotency and homologous allelic pairing of *Oct4* loci. *Dev Growth Differ* 59, 501-514, 2017. Doi: 10.1111/dgd.12403 査読あり
5. Okuda A, Uranishi K, Suzuki A. Discovery of a new role for the p53 family in the onset of mesendodermal differentiation of embryonic stem cell. *Stem Cell Investig* 4, 24, 2017. Doi: 10.21037/sci.2017.03.07 査読なし
6. Suzuki A, Hirasaki M, Okuda A. Does MAX open up a new avenue for meiotic research? *Dev Growth Differ* 59, 61-69, 2017. Doi:10.1111/dgd.12344 査読あり
7. Okuda A, and Suzuki A. Unexpected link

between MAX and meiotic onset. Cell Cycle 15, 2235-2236, 2016. Doi:10.1080/15384101.2016.1194137 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 鈴木 歩、平崎正孝、浅賀正充、浦西洸介、西本正純、奥田晶彦 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 第 40 回日本分子生物学会 2017 年 12 月 6 日~9 日 (兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
2. 平崎正孝、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、西本正純、奥田晶彦 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 第 40 回日本分子生物学会 2017 年 12 月 6 日~9 日 (兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
3. 浅賀正充、平崎正孝、西本正純、鈴木 歩、浦西洸介、奥田晶彦 Nucleostemin 欠損 ES 細胞における Oct3/4 転写因子の DNA 結合特性の変化 第 40 回日本分子生物学会 2017 年 12 月 6 日~9 日 (兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
4. 鈴木 歩、平崎正孝、浅賀正充、浦西洸介、西本正純、奥田晶彦 体細胞分裂から減数分裂への切り替えを制御する Myc/Max/Mga ネットワーク 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
5. 平崎正孝、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、西本正純、奥田晶彦 Mbd3/NuRD 転写抑制複合体による ES 細胞への分化多能性賦与機構の解明 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
6. 西本正純、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、平崎正孝、奥田晶彦 Yap による細胞の形質転換における miR129 を介さない経路の重要性 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)

〔図書〕(計 2 件)

1. 奥田晶彦 最近の MYC 研究の世界の動向を踏まえて 実験医学 36 巻 4 号 488-493, 2018
2. 鈴木 歩、奥田晶彦 ES 細胞と生殖細胞における MYC-MAX-MGA ネットワーク 実験医学 36 巻 4 号 528-533, 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ(研究室)
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div03_DB/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者
奥田 晶彦 (OKUDA AKIHIKO)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：60201993

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし ()