

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19532

研究課題名（和文）非生殖細胞の異所性に減数分裂を起こす潜在能力とその能力発揮に伴う病態について

研究課題名（英文）The potential of non-germ cells to undergo ectopic meiosis and the pathophysiology associated with this potential

研究代表者

鈴木 歩（Suzuki, Ayumu）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80639708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の減数分裂は生殖細胞のみでおこる現象であり、決して体細胞では起きないと考えられてきた。しかしながら申請者らは、Max遺伝子の発現を抑制すると、ES細胞は生殖細胞ではないにも関わらず、本来起こるはずのない減数分裂が誘導されることを発見した。そこで本研究では非生殖細胞でも減数分裂を開始するポテンシャルを有するか否かをMaxノックアウトマウスを用いて明らかにすることにした。その結果、一部の体細胞組織においてMAXノックアウトに伴い減数分裂遺伝子や癌精巣抗原が上昇することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAXの遺伝子に変異があることにより悪性化するガンは多数報告されているものの、それらの悪性化と減数分裂の関係は知られていない。またMAX遺伝子が欠失したマウスは妊娠初期で流産してしまう。本研究課題は、非生殖細胞における異所性の減数分裂を中心課題に据えたものであるが、減数分裂を起こす潜在能力を規定している分子基盤を解明することは、ガンや流産の発生原因の一端の解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：In mammals, it has been thought that meiosis occurs only in germ cells and never in somatic cells. However, we found that repressing the expression of the Max gene induced a meiosis that should not occur in ES cells, even though they are not germ cells. In the present study, we used Max knockout mice to determine whether non-germ cells have the potential to initiate meiosis. We found that some meiotic genes and cancer testis antigen were up-regulated after MAX ablation in some somatic tissues.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の減数分裂は生殖細胞のみでおこる現象であり、決して体細胞分裂では起きないと考えられてきた。Max 遺伝子の発現を抑制すると、ES 細胞は生殖細胞ではないにも関わらず、本来起こるはずのない減数分裂が誘導されたことから、ES 細胞には生殖細胞のように減数分裂を開始できる潜在能力を有している(図1, Suzuki, Nature Communications 2016)。生理的な減数分裂の過程にも Max の発現の減少が関わっていることは、一般にコピキタスに発現すると考えられてきた Max の発現が、生殖細胞における減数分裂時に一過的に顕著に減少していることや、精巣由来の生殖幹細胞(GS 細胞)で Max の発現を抑制しても減数分裂が誘導されたなどから示唆されている。また Max は、もともと、癌や幹細胞の細胞増殖と深い関わりがある Myc ファミリータンパク質がその機能を発揮するうえで必須のパートナー因子として同定されたタンパク質であるが、減数分裂の抑制に関しては Myc とではなく、Mad ファミリーの一つである Mga と相互作用することで非典型的のポリコム抑制複合体である PRC1.6 を構成して減数分裂関連遺伝子を抑制していることを報告した。つまり Max は体細胞分裂だけでなく減数分裂の開始抑制に働く分子と考えられるが、このような機能が潜在的な多能性を有する ES 細胞や減数分裂前の生殖細胞のみに特異的なものであるのか、それとも一般的な体細胞についても普遍的に見られるものであるのかについては不明である。

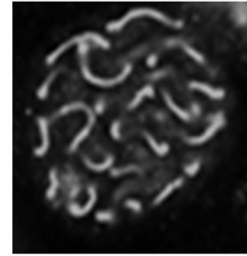


図1 MaxノックアウトES細胞が呈する減数分裂前期に特異的なシナプトネマ様の複合体

## 2. 研究の目的

本研究課題では、今までの研究結果を踏まえ、1つには、まず、体細胞では減数分裂は起きないという固定概念を捨て、マウスで Max を全身でノックアウトすることにより、ES 細胞のように、異所的に減数分裂を惹起することができる潜在能力を持った生体における細胞について、網羅的にスクリーニングした。なお、単純な Max 遺伝子ノックアウトマウスの機能解析に関しては、2000年に既に報告されている(Shen-Li et al., Genes Dev)が、もちろん、その当時は、MAX は、MYC に対するパートナー因子としてのみ認識されていたので、胎生致死というフェノタイプの原因についても、全て MYC の機能低下によるものであると想定されている。但し、MAX が PRC1.6 複合体を介して減数分裂開始を抑制していることを考慮すると、異所性の減数分裂が Max ノックアウトマウスの胎生致死の原因の可能性も考えられる。また、がん組織における遺伝子変異についての情報が集積されたデータベースでは、PRC1.6 複合体の中で Max のパートナーとして機能する Mga の Max との相互作用に関わる領域に変異が数多く報告されている。それ故、それらのがん細胞では、PRC1.6 複合体の機能が破綻していることが当然想定される。初期胚での致死の原因やがんとの関連を解明することも本研究課題の目的のひとつである。

## 3. 研究の方法

減数分裂を開始する潜在能力をもった細胞を明らかにするために、全身で MAX をノックアウトすることのできるマウスを作成した。全身で Cre リコンビナーゼが活性化される CreER を恒常的に発現するマウスと、Max の第4エキソンが loxP に挟まれたコンディショナルノックアウトマウスを掛け合わせて、タモキシフェン依存的に MAX をノックアウトした。その際の減数分裂や CTA 遺伝子の mRNA の変化や減数分裂細胞マーカーである SYCP3 で免疫染色を行なった。

## 4. 研究成果

全身で MAX をノックアウトしたマウスは胚性致死であるため、コンディショナルに MAX をノックアウトことにした。まず胎児組織から MEF を作成して、試験管内でタモキシフェンを投与することにより、MAX が確かにノックアウトされているかどうかを PCR による Genotyping や MAX に対する免疫染色で確認した。Max がノックアウトされると第4エキソンがゲノムから抜ける状態となり、mRNA は第3エキソンと第5エキソンが連結する形となるが、ゲノムに結合する bHLH 部位を失うため MAX は本来の機能を失う。この場合第5エキソンからはフレームシフトが起こるため、MAX タンパク質は途中から本来の MAX とは異なるアミノ酸配列になることが予想されるが、様々な MAX 抗体を検討することにより、MAX ノックアウトに伴い、タモキシフェン投与により組み換えが起こった後の MAX の C 末部位は MAX 抗体により認識されることが確認できた。その結果、培養条件下でタモキシフェンを投与して MAX をノックアウトした MEF では MAX が確かにノックアウトされているにも関わらず SYCP3 のシグナルは生じず、減数分裂前期に見られるようなシナプトネマル構造様のパターンは見られなかった。一方、生体内において MAX をノ

ックアウトしたところ、減数分裂関連遺伝子や CTA 遺伝子である Taf71 などの若干の上昇が見られたものの、やはりタンパク質レベルで SYCP3 が検出されるほどではなく減数分裂様の変化を細胞学レベルで起こしている細胞は見当たらなかった。生体内においては減数分裂関連遺伝子が MAX により抑制されている可能性があるが、体細胞における多くの減数分裂遺伝子の脱抑制は、生殖細胞で MAX ノックアウトした場合における減数分裂遺伝子の脱抑制レベルと比較すると大きな変化ではなかった。

これらの違いが、MAX のゲノム結合に対する違いかどうかを検討するために、MAX や PRC1.6 複合体のメンバーである PCGF6 や MGA などの免疫クロマチン沈降シーケンス(ChIP-seq)のデータを解析したところ、体細胞タイプの細胞では MAX や PRC1.6 複合体のメンバーは減数分裂関連遺伝子の多くには結合していないが、ES 細胞や iPS 細胞など多能性細胞においては、PRC1.6 複合体は減数分裂関連遺伝子の TSS に顕著に結合していることがわかった。減数分裂遺伝子が PRC1.6 により抑制されているのは多能性を有する細胞に特徴的であるか調べるために、iPS 細胞誘導時のクロマチン修飾因子の変化を解析すると、MEF では減数分裂関連遺伝子にはポリコームによる抑制マーカ-の H3K27me3 はほとんど見られないが、iPS 細胞に近づくにつれて H3K27me3 の沈着がみられることがわかった。体細胞が減数分裂を起こし得ないかどうかについては今後さらなる検討が必要であり結論を出すには不十分であるものの、もしかしたら MAX は多能性細胞特異的に減数分裂関連遺伝子において一過的な抑制的エピジェネティック修飾をクロマチンに書き込む作用を担っている可能性があり、このようなエピジェネティック修飾が多能性細胞に対して減数分裂を開始するポテンシャルを与えているのかもしれないと考えている。

潜在的な多能性を有する細胞は、生体内においては基本的に生殖細胞のみであるが、発生胚においては生殖細胞が分化する前の段階の細胞でも内部細胞塊細胞や、エピプラスト細胞において Nanog や Oct3/4 など多能性を規定する分子群が発現されているほか、がんにおいても同様の分子が高発現することが知られている。本研究期間内においては、初期胚での MAX ノックアウトの影響やがんにおける MAX および PRC1.6 複合体のメンバーの変異の関係については検討できなかったが、MAX が減数分裂抑制を果たすためには多能性因子を発現していることが必要条件であることが示唆されたので、今後はそれらのことに注目して研究を進めたいと考えている。

## 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 1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 該当する

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, 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ドメインが欠損した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
---------	---------------------------	-----------------------	----