

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06843

研究課題名(和文)哺乳類生殖細胞の減数分裂開始機構の解明

研究課題名(英文)Uncovering the regulatory mechanism of meiotic entry in mammalian germ cells

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MAXを含むPRC1.6複合体が減数分裂関連遺伝子の発現抑制に関わっており、生殖細胞における体細胞分裂から減数分裂への移行を制御する可能性について着目した。MAX遺伝子の生殖細胞特異的ノックアウトにより、雄雌ともに性分化前の始原生殖細胞で減数分裂が惹起されることを明らかにした。さらに、減数分裂開始に先立ち、MAXタンパク質量が顕著に低下することを見出した。これらの成果は、生殖細胞の運命決定や配偶子形成の基礎的理解につながるだけでなく、不妊症やがんなどの疾患の原因解明にも寄与すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、MAXによる減数分裂遺伝子の抑制メカニズムの解明を通して、生殖細胞の運命決定や配偶子形成の基礎的理解を深めることを目的としている。この研究により、減数分裂開始の分子基盤が明らかになれば、体外での配偶子作成技術の向上や不妊症の新たな治療法の開発につながることを期待される。さらに近年、減数分裂遺伝子が腫瘍の発生や悪性化に関与していることが報告されているため、生体内での減数分裂遺伝子の抑制機構の理解は、がんの発生・悪性化のメカニズム解明にも役立つと考えられる。したがって将来的には、がんの予防法や治療法の進歩にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the PRC1.6 complex, which includes MAX, and its role in regulating the transition from mitosis to meiosis in germ cells. We demonstrated that germ cell-specific knockout of MAX induces meiosis in both male and female primordial germ cells before sexual differentiation and found that MAX protein levels decrease significantly prior to meiotic initiation.

We worked on elucidating the control mechanism of meiotic initiation by MYC/MAX and MGA/MAX (PRC1.6) complexes, identifying a genomic region (MUR) involved in MAX expression regulation. These findings contribute to our understanding of the molecular basis of the mitosis-to-meiosis transition in germ cells and are expected to help clarify the causes of reproductive disorders. In the future, we aim to further elucidate the mechanisms of meiotic initiation and its disruption.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学

キーワード：Max PRC1.6 Myc 減数分裂 生殖細胞

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起こる現象であり、体細胞では決して起きないと長らく考えられてきた。ところが、私たちの研究グループは、MAX 遺伝子の発現を抑制した ES 細胞において、生殖細胞でないにも関わらず減数分裂が誘導されるという驚くべき発見をした(Suzuki et al., Nature Communications 2016, 図 1)。このことは、ES 細胞が生殖細胞のように減数分裂を開始できる潜在能力を持っていることを示唆するものであった。

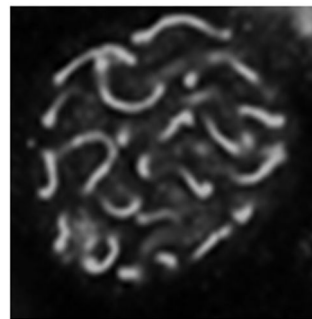


図1 MaxノックアウトES細胞が呈する減数分裂前期に特異的なシナプトネマ様の複合体

さらに私たちは、生殖細胞における減数分裂の開始時期と MAX の発現量に着目した。その結果、減数分裂開始に先立って MAX の発現量が一過的に減少することを見出した。また、精巣由来の生殖幹細胞(GS 細胞)においても MAX の発現を抑制すると減数分裂が誘導されることを確認した。これらの知見から、MAX が生理的な減数分裂の開始を抑制する因子として機能している可能性が浮上してきた。

MAX はもともと、MYC ファミリーのタンパク質とヘテロ二量体を形成し、細胞増殖や代謝に関連する多数の遺伝子の発現を活性化する転写因子として同定されていた。しかし私たちは、MAX が MYC とは別のパートナーである MGA と結合し、ポリコム群タンパク質の一種である PRC1.6 複合体を形成することで、減数分裂関連遺伝子の発現を抑制していることを突き止めた。つまり、MAX は細胞増殖を促進する一方で、生殖細胞では減数分裂の開始を抑制する二面性を持つ因子であることが明らかになったのである。

そこで本研究では、「MAX を含む PRC1.6 複合体が、減数分裂関連遺伝子の発現抑制を介して生殖細胞の減数分裂開始を制御している」という仮説を立て、その検証を目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、次の 3 点を明らかにすることに着目した。

(1) 生殖細胞における MAX 遺伝子の機能の解明

MAX が生殖細胞で減数分裂関連遺伝子の発現を抑制しているという私たちの仮説を検証するため、MAX 遺伝子を生殖細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製し、その表現型を解析する。これにより、MAX が生殖細胞の運命決定や減数分裂開始のタイミングを制御する因子であるかどうかを直接的に評価できる。

(2) 減数分裂開始に伴う MAX タンパク質量の動態の解明

ES 細胞や GS 細胞の解析から、MAX の発現量の低下が減数分裂の誘導に重要であることが示唆されている。そこで、実際の生殖細胞において、減数分裂開始前後で MAX タンパク質量がどのように変

動するかを詳細に解析する。これにより、減数分裂の開始を引き金する因子としての MAX の役割がより明確になると期待される。

(3) MAX の発現制御機構の解明

MAX の発現量が減数分裂開始の鍵を握ると考えられることから、MAX 遺伝子の発現がどのように制御されているかを理解することは重要である。そこで、ES 細胞や生殖細胞で MAX の発現制御に関与する領域をゲノム上で探索し、その機能解析を行う。これにより、生殖細胞運命の決定や分化過程におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の一端が明らかになるはずである。

これらの解析を通じて、MAX を介した減数分裂開始の制御機構を生殖細胞の発生過程の中で統合的に理解することを目指した。その成果は、生殖細胞の基礎生物学のみならず、不妊症などの生殖関連疾患の理解や治療法の開発にも資することが期待される。

3. 研究の方法

(1) MAX 遺伝子の生殖細胞特異的ノックアウトマウスの作製と解析

MAX 遺伝子の生殖細胞における機能を明らかにするため、MAX の第 4 エクソンを loxP 配列で挟んだコンディショナルノックアウトマウスと、生殖細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Oct4-CreERT2 トランスジェニックマウスを交配した。得られたノックアウトマウスについて、生殖巣の形態や生殖能力を評価するとともに、生殖細胞における減数分裂関連遺伝子の発現を RT-qPCR で、減数分裂の進行を SYCP3 などの減数分裂マーカーの免疫染色により解析した。

(2) 生殖細胞における MAX タンパク質量の発生段階特異的な解析

胎仔期から新生仔期までの様々な発生段階の雄および雌の生殖巣切片を作製し、MAX 抗体を用いた免疫染色を行った。得られた染色像をもとに、生殖細胞における MAX のタンパク質量を定量化し、減数分裂開始前後での動態を詳細に解析した。

(3) MAX の発現制御領域の同定と機能解析

MAX の発現制御に関与するゲノム領域を同定するため、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)のデータを活用した。具体的には、多能性幹細胞や生殖細胞において、MAX 遺伝子座への様々な転写制御因子の結合やヒストン修飾の enrichment を指標とし、MAX 発現制御に重要な領域を絞り込んだ。同定された領域については、ゲノム編集により欠失マウスを作製し、その表現型を解析することで機能を検証した。

4. 研究成果

(1) MAX は性分化前の生殖細胞で減数分裂開始を抑制する

MAX 遺伝子の生殖細胞特異的ノックアウトマウスを解析した結果、性分化前では始原生殖細胞の数には異常はなかったが、性分化後の生殖細胞では、雄雌ともに生殖細胞の数が著しく減少していた。さ

らに、減数分裂開始前の始原生殖細胞において、Stra8 や Sycp3 などの減数分裂関連遺伝子の発現上昇が認められた。免疫染色の結果、これらの細胞では SYCP3 タンパク質の凝集や染色体の凝縮など、前減数分裂期の細胞に特徴的な核の構造変化が観察された。以上のことから、MAX は雄雌の生殖細胞で共通して減数分裂開始を抑制することで、タイミングを適切に制御していると考えられた。一方、ロックアウト個体では減数分裂が完了せず、最終的には生殖細胞のアポトーシスが誘導された。このことは、減数分裂開始後の MAX の発現回復も正常な配偶子形成に必要であることを示唆している。

(2) 減数分裂開始に先立つ MAX タンパク質量の急激な低下の発見

胎生期の始原生殖細胞における MAX 免疫染色の結果、雄雌ともに生殖細胞では MAX が恒常的に発現していた。ところが、減数分裂開始前の時期に MAX のシグナルが急激に減弱し、ほぼ消失するという劇的な変化が観察された。特に雌では、生殖巣の前方から後方に向かって波状に減数分裂が開始されるが、これに呼応して MAX の消失も前方から始まることが明らかになった。これらの結果は、MAX タンパク質の発現量の急激な低下は、生殖細胞が持つ内在的な減数分裂開始プログラムの引き金になっている可能性が高いと考えられた。

(3) 生殖細胞の MAX 発現維持に必須のエンハンサー領域の同定

ChIP-seq データの解析から、MAX 遺伝子上流約 3-4kb の領域 (Max Upstream Region, MUR)が、ES 細胞や生殖細胞での MAX 発現に重要であることが予想された。そこで、この領域を欠失させたマウス (MUR) を作製したところ、生殖細胞での MAX の発現量が周辺の体細胞レベルにまで有意に低下した。しかし、MAX 完全欠損マウスとは異なり、減数分裂関連遺伝子の脱抑制は起こらず、雄雌ともに妊孕性も保たれていた。したがって、MUR 領域は生殖細胞での MAX 発現の一部に関与しているが、それだけでは減数分裂開始に十分な発現抑制は起こらないと考えられた。MAX 制御には他の制御領域や翻訳後制御機構なども関与している可能性があり、さらなる解析が必要である。今後は、PRC1.6 複合体による減数分裂関連遺伝子の抑制機構のエピジェネティクスを含めたより詳細な解析や、MAX-MYC のバランスの変化が与える影響の解明などを通じ、生殖細胞特異的な減数分裂開始プログラムの全容解明を目指したい。

本研究は、MAX による減数分裂遺伝子の抑制メカニズムの解明を通して、生殖細胞の運命決定や配偶子形成の基礎的理解を深めることを目的とし、その成果は、Scientific Reports 誌に原著論文として発表した[1]。今後、減数分裂開始の分子基盤がさらに明らかになれば、体外での配偶子作成技術の向上や不妊症の新たな治療法の開発につながることを期待される。さらに近年、減数分裂遺伝子が腫瘍の発生や悪性化に関与していることが報告されている。したがって生体内での減数分裂遺伝子の抑制機構の理解は、がんの発生・悪性化のメカニズムの解明や、将来的には、がんの予防法や治療法の進歩にも貢献できる可能性がある。

参考文献

- [1] Suzuki A, Uranishi K, Nishimoto M, Mizuno Y, Mizuno S, Takahashi S, Eisenman RN, Okuda A. MAX controls meiotic entry in sexually undifferentiated germ cells. Scientific Reports. 2024; 14:5236. doi: 10.1038/s41598-024-55506-7

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 Kitamura Yuka, Suzuki Ayumu, Uranishi Kousuke, Nishimoto Masazumi, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Okuda Akihiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Alternative splicing for germ cell specific Mga transcript can be eliminated without compromising mouse viability or fertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 409 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12806	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 Mochizuki Kentaro, Sharif Jafar, Shirane Kenjiro, Uranishi Kousuke, Bogutz Aaron B., Janssen Sanne M., Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko, Koseki Haruhiko, Lorincz Matthew C.	4. 巻 12
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 -
1. 著者名 Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Kitamura Yuka, Mizuno Yosuke, Nishimoto Masazumi, Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko	4. 巻 39
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 Yuka, Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Nishimoto Masazumi, Suzuki Ayumu, Okuda Akihiko	4. 巻 11
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木歩、浦西洸介、北村友佳、西本正純、水野聖哉、高橋智、奥田晶彦
2. 発表標題 減数分裂遺伝子の発現抑制はMaxにより制御される
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 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-Atf7ipの相互作用は減数分裂関連遺伝子領域の構造的ヘテロクロマチン化に寄与する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayumu Suzuki, Uranishi Kousuke, Kitamura Yuka, Nishimoto Masazumi, Akihiko Okuda
2. 発表標題 Max regulates meiotic entry in mouse germ cells
3. 学会等名 札幌国際がんシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kousuke Uranishi, Yuka Kitamura, Ayumu Suzuki, Masataka Hirasaki, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda
2. 発表標題 Mga inhibits meiotic initiation by regulating Meiosin-Stra8 signaling through the bHLHZ domain.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayumu Suzuki, Kousuke Uranishi, Yuka Kitamura, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda
2. 発表標題 Molecular mechanisms for the initiation of meiosis in mouse germ cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	奥田 晶彦 (Okuda Akihiko) (60201993)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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		
米国	Fred Hutchinson Cancer Research Center	Seattle	United States