

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25670147

研究課題名(和文)c-MycによるMax非依存的なアポトーシス誘導機構とその回避メカニズム

研究課題名(英文)Molecular bases and the counteracting strategy for the detrimental phenotype of Max-null ES cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、今までに、Mycタンパク質が機能する上で必須なタンパク質をコードするMax遺伝子のホモ欠失ES細胞が、ES細胞としての未分化性を失うと共に、細胞のviabilityも維持できないこと、かつ、Nanogの強制発現がMax遺伝子のホモ欠失ES細胞が呈する致死的なフェノタイプを全てキャンセルするそのを示して来たが、本研究において、Nanogによるレスキュー効果も含め、Maxホモ欠失ES細胞が呈するフェノタイプを規定する分子メカニズムの一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that homozygous knockout of Max gene encoding indispensable partner protein for MYC family protein in ES cells leads to loss of pluripotent properties and extensive cell death. Furthermore, we have also demonstrated that such detrimental phenotypes of Max-null ES cells can be eased by the forced expression of Nanog encoding one of pluripotency marker proteins. In this research project, we have uncovered a part of the molecular mechanisms underscoring the phenotypes associated with ablation of Max expression in ES cells and the rescue effect attained by Nanog overexpression on Max-null ES cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞 癌細胞 アポトーシス c-Myc Nanog

### 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞と癌細胞は、無限の自己増殖能であるとか、様々な面において類似した細胞であると言える。Myc タンパク質は典型的な癌遺伝子産物であるが、私たちのグループ、及びその他の研究グループからの研究により、Myc タンパク質は、ES 細胞においても重要な働きをタンパク質であることが証明された。事実、私たちは、本研究課題遂行以前の時点で、ES 細胞において3種類の Myc タンパク質(c-Myc, N-Myc, L-Myc)が転写因子として機能する上で必須である Max タンパク質をコードする遺伝子をホモ欠失させたところ、ES 細胞は、ES 細胞としての特質を維持することができず、細胞分化を起こすことを証明していた。かつ、私たちは Max は、ES 細胞としての特質を保つことに必須であるのみならず、細胞の生存においても重要な働きをしており、Max ホモ欠失細胞は完全に死滅してしまうことも示していた。さらには、これら Max 遺伝子の欠失に伴って起こる ES 細胞の致死的なフェノタイプは、Nanog の強制発現により全てキャンセルされることも示していた。

### 2. 研究の目的

上記にあるように、私たちは、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する致死性などのフェノタイプは Nanog の強制発現によりキャンセルできることを見出していた。そして、本研究課題の目標の一つは、Max ホモ欠失 ES 細胞が示す致死的なフェノタイプとそれに対する Nanog の抑制効果を規定する分子メカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

Max ホモ欠失 ES 細胞では、Myc 遺伝子の発現に対して遺伝子操作を下していないので、通常の ES 細胞と同程度のレベルの発現が見られることが想定される。但し、Max タンパク質非存在下において遊離状態にある Myc タンパク質は、何ら生物学的な機能を有していないと想定していた。但し、他の研究室からの c-Myc/N-Myc ダブルノックアウト ES 細胞は、Max ホモ欠失 ES 細胞と同じ目的を持って作製されたにも関わらず、Max ホモ欠失 ES 細胞と同様に ES 細胞としての特質維持に対して破綻するという点に関して共通しているものの、細胞の viability に関しては全く問題がないことが示された。この矛盾を説明する一つの可能性は、Max タンパク質の非存在下で存在する遊離 Myc タンパク質が生物学的な機能を全く持たないという想定が間違いで、実は、細胞のアポトーシスに積極的に関わっているというものである。それ故、その新たな仮説の信憑性を検討すべく、Max ホモ欠失 ES 細胞に対して、c-Myc タンパク質を過剰発現させることで、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈するアポトーシスのフェノタイプが増強し、逆に、Myc 遺伝子の発現レベ

ルをノックダウンさせることにより、減弱するかを検討する。また、マウス線維芽細胞などの正常細胞に対して c-Myc を強制発現させると細胞死が惹起されることが知られているが、その細胞死は、内在性の Max タンパク質と 1:1 の相互作用するには Max の量が不足した為、遊離状態になった c-Myc タンパク質が出現し、それが、細胞死を引き起こしているという可能性が考えられる。かつ、そういった遊離 c-Myc タンパク質の出現に伴って起こるアポトーシスは、Max と一緒に発現させることで、アポトーシスを回避できるか、また、c-Myc と結合することがわかった Nanog が遊離 c-Myc タンパク質を持つ、アポトーシス誘導活性を中和できるかをいなかを検討する。

### 4. 研究成果

Max ホモ欠失 ES 細胞での c-Myc 遺伝子の強制発現及びノックダウンによる発現抑制により、この ES 細胞が呈するアポトーシスのフェノタイプが、それぞれ、増強、及び減弱することを確認できた。また、マウス線維芽細胞での c-Myc 遺伝子の過剰発現は、この細胞の激しい細胞死を誘導し、一方、Nanog も併せて発現させると、c-Myc の発現依存的に起こる細胞死のフェノタイプがある程度抑制されることが確認できた。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, Matsui Y. Max was identified as a repressor of germ-cell related gene expression in mouse embryonic stem cells. Nat. Commun. 4: 1754, 2013 査読あり
2. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. Proc Natl Acad Sci USA 110: 6412-6417, 2013 査読あり
3. Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Katano M, Soga T, Nakanuma Y, Okuda A, Hirao A. Abundant nucleostemin expression supports the malignant properties of germ cell tumors Am J Pathol 183: 592-603, 2013 査読あり
4. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, Hirasaki M, Nabeshima Yok, Nabeshima Yo-i, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Ema M, Takahashi S, Kato H, Okuda A. *In vivo* function and evolution

of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1 PLoS One 8, e68119, 2013 査読あり

5. Hirasaki M, Hiraki-Kamon K, Kamon M, Suzuki A, Katano M, Nishimoto M, Okuda A. Striking similarity in the gene expression levels of individual Myc module members among ESCs, EpiSCs, and partial iPSCs. PLoS One e83769, 2013 査読あり
6. Kamon M, Katano M, Hiraki K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 23: 2170-2179, 2014 査読あり
7. Muramatsu M, Okuda A, and Okazaki Y. Genomic Aspects of Common Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452: 211-212, 2014 査読なし
8. Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, and Katagiri T. Establishment of a novel model for chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying mutant ALK2 associated with fibrodysplasia ossificans progressive. *Biochem Biophys Res Commun* 455: 347-352, 2014 査読あり
9. 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. Functional crosstalk between Myc and PI3K signaling for supporting unlimited self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells* 33:713-725, 2015 査読あり
10. 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* DOI: 10.1002/stem.1918 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

1. Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Tanimoto Y, Sugiyama F, Yagami K, Okuda A, Okazaki Y. Jarid2 improves the kinetics and efficiency of transcription-based reprogramming. 11<sup>th</sup> ISSCR annual meeting, 2013年6月12日~15日 Boston, USA
2. Okuda A. Underlying the molecular bases of cell death phenotype of Max-null embryonic stem cells. Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic

Reprogramming. Asia-2013 Meeting 2013年11月25日~26日 東京都文京区 東京大学内山上会館

3. 平崎正孝、片野 幸、鈴木 歩、西本正純、奥田晶彦 Myc モジュール遺伝子メンバーのほとんどが、ES 細胞と Epiblast 幹細胞の両方で同レベルの発現を示す。第 36 回日本分子生物学会 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. 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 2013年12月3日~6日 兵庫県神戸市神戸ポートアイランド
5. 加藤英政、平木啓子、栄徳勝光、清澤秀孔、奥田晶彦 ヒト分化多能性細胞の分化の改善。第 36 回日本分子生物学会 2013年12月3日~6日 兵庫県神戸市神戸ポートアイランド
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 2014年11月25日~27日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜
7. 西本正純、奥田晶彦、大西芳秋 真獣類の発生過程における Per2 と CKIε の発現は概日リズム形成に重要である。第 37 回日本分子生物学会 2014年11月25日~27日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜
8. 木下善仁、徳澤佳美、神田将和、森山陽介、水野洋介、菅原(山下)泉、田丸俊輔、栃木秀乃、上原奈津美、仲地 豊、八塚由紀子、入月浩美、鈴木聡美、Nurun Nahar Borna、平田智子、的場奈々、加藤英政、奥田晶彦、森 雅人、安嶋まさみ、原嶋宏子、山崎太郎、村山 圭、大竹 明、岡崎康司 ミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺伝子の包括的大規模解析。第 37 回日本分子生物学会 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

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

片野 幸 (KATANO Miyuki)  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究者番号：60521060