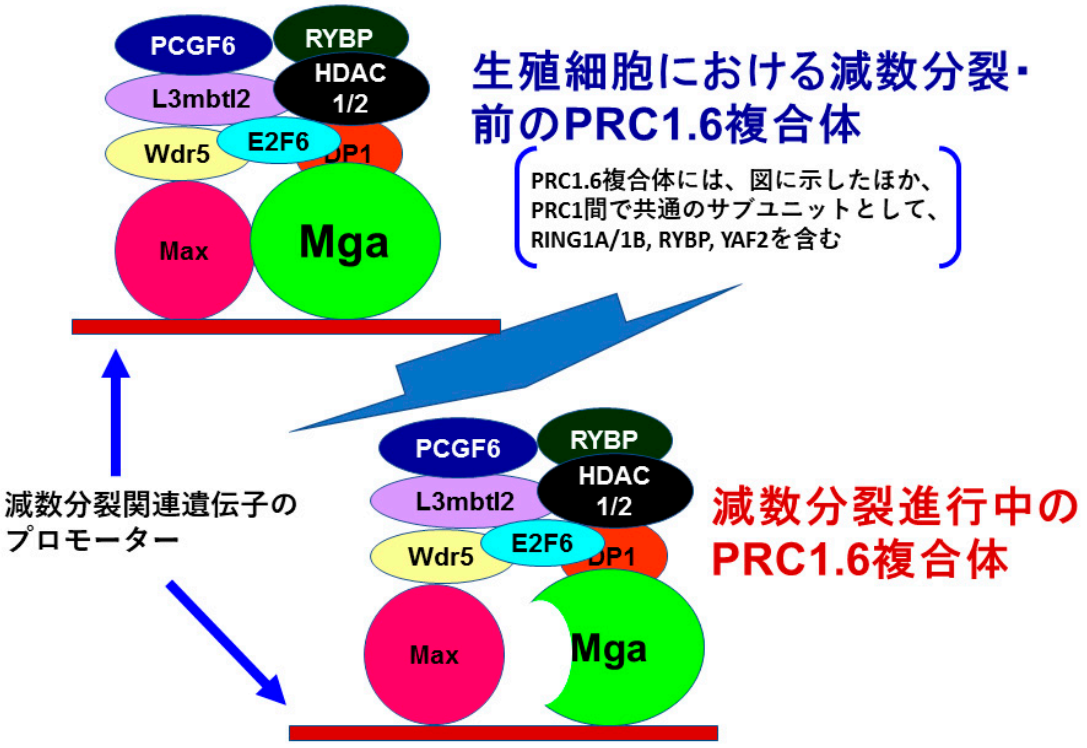
27　がん・精巣抗原遺伝子の非典型的PRC1複合体による抑制	奥田　晶彦

【目的】私たちを含むいくつかの研究グループは、最近、PRC1 複合体の中の 1 つのサブタイプである PRC1.6 が生殖細胞における減数分裂関連遺伝子の発現を抑制しており、生殖細胞は、減数分裂を開始するに先立って、この複合体の機能を破綻させていることを示した。本研究では、一つには、そのメカニズムの解明を目指した。さらには、その解明する分子メカニズムが、様々ながん細胞におけるがん・精巣抗原遺伝子の発現の機構にも同じメカニズムが当てはまる可能性について検討した。

【方法】生殖細胞の減数分裂誘導前と後で、PRC1.6 複合体を構成するサブユニットをコードする遺伝子の発現の差、バリアントの存在等について調べた。また、マウス線維芽細胞とメラノーマ細胞の間で PRC1.6 複合体のサブユニットの量を比較した。

【結果】PRC1.6 複合体では、MGA と MAX が相互作用し、複合体のコアを形成するが、cDNA の解析から、MAX とは相互作用できない MGA タンパク質をコードする Mga バリアントが生殖細胞特異的に発現していることを見出した。マウス正常線維芽細胞とメラノーマ細胞では、後者において PRC1.6 複合体のタンパク質量が少ないことが確認された。

生殖細胞における Mga バリアントの産生を介した PRC1.6 複合体の機能の抑制



27. がん・精巣抗原遺伝子の非典型的 PRC1 複合体による抑制

奥田　晶彦

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門

Key words：がん・精巣抗原，PRC1 複合体，減数分裂，がん細胞，生殖細胞

緒　言

がん・精巣抗原遺伝子とは、正常では精巣でのみ発現している遺伝子の中で、メラノーマを筆頭に、精巣・生殖細胞とは全く無関係な様々な種類のがん細胞において高度に発現している遺伝子群のことである。なお、精原細胞は、HLA Class I 遺伝子を発現していないことから、以前より、これらがん・精巣抗原のいくつかは、そのユニークな発現パターン故に、がん細胞根絶のためのがん免疫療法の有望なターゲットの一つとして考えられており、実際、今までに、一定の成果が見られている。しかしながら、最近の研究では、*MeioB* や *Fate1* 遺伝子など、がん・精巣抗原の少なくともそのいくつかは、腫瘍マーカーであると同時に、がん細胞の活発な細胞増殖であるとか、がん細胞としての特質を規定する上で積極的に寄与していることが明らかにされている。このような理由から、がん・精巣抗原遺伝子のユニークな発現パターンを規定している分子基盤を明らかにすることは、以前よりもその重要度が増していると言える。私は、本研究を遂行する前段階において、生殖細胞では、6 種類の存在が知られている Polycomb Repressor Complex 1（PRC1）の中の最も非典型的 PRC1 として知られている PRC1.6 によって減数分裂関連遺伝子の発現が抑制されており、生殖細胞は減数分裂を開始するに先立って、この PRC1.6 の機能を抑制していることを発見し、報告した。がん・精巣抗原の多くが減数分裂関連遺伝子であることから、私は、自分自身およびその他の研究グループからの研究成果をもとに、がん細胞におけるがん・精巣抗原の発現が、生殖細胞における減数分裂の開始と同様に、PRC1.6 複合体の機能破綻の結果であるのではないかという仮説を持って本研究を遂行した。また、過去の研究成果では、PRC1.6 の機能を破綻させることで、生殖細胞が減数分裂を開始していることは明らかにしているが、その分子メカニズムについては全く分かっていなかったので、その解明のための研究についても本研究の一部として遂行した。その結果、それら 2 つの点の両方について新知見を得ることができたので、それらについて報告する。

方　法

RNA In Situ ハイブリダイゼーションは RNA Scope 法を用いて行った。ウエスタンブロットでの 特異的タンパク質の検出は ECL 法を用いて行った。遺伝子発現の定量については、原則、Taqman プローブを用いた方法で行ったが、*Mga* 遺伝子の発現については Taqman プローブはもちろんのこと、SYBR Green を用いても、野生型と新規に見出したバリアントを区別する方法が無かったので、古典的な semi-quantitative な方法を用いた。

結　果

1. PRC1.6 複合体サブユニットの一つである MGA をコードする *Mga* 遺伝子からのバリアントの発見

PRC1.6 複合体が生殖細胞において減数分裂関連遺伝子の発現を抑制することで、生殖細胞の減数分裂期より以前の段階で減数分裂が起こってしまうことを抑えており、本来の減数分裂期においては、生殖細胞は、この PRC1.6 複合体による転写抑制から減数分裂関連遺伝子を解放している［1］。但し、その抑制の解除のメカニズムに関しては全く分かっていないので、まず、それの解明のための研究を行った。PRC1.6 は、RING1A、RING1B、RYBP、YAPF2 という 6 種類の PRC1 複合体に共通するサブユニットの他、PCGF6、L3MBTL2、MGA、MAX などのタンパク質が PRC1.6

複合体のみのサブユニットとして組み込まれている。それ故、まず最初に、生殖細胞における減数分裂時の PRC1.6 複合体の機能破綻の結果が、PRC1.6 複合体の特異的サブユニットをコードする遺伝子の発現の低下によるという可能性を検討した。しかしながら、生殖細胞の減数分裂の前後で *Max* 遺伝子については若干差が認められたが、PRC1.6 複合体の機能破綻を説明できるほどの発現の低下ではなく、*L3mbtl2* 遺伝子などその他の遺伝子の発現については全く差が認められなかった。そこで、次の可能性として、オールタナティブスプライシングにより PRC1.6 複合体のサブユニットとして機能できないタンパク質が作られる可能性を検討した。その結果、公開されている次世代シーケンサーによる網羅的な mRNA の発現解析の結果を PRC1.6 のサブユニットをコードする遺伝子について解析した。その結果、24 個のエキソンを有する巨大遺伝子である *Mga* 遺伝子の第 18 イントロンの一部が、エキソンとなって mRNA に組み込まれている特殊な Mga mRNA のサブタイプが存在することがわかった（図 1A）。さらに興味深いことには、その Mga mRNA バリアントは、マウスの各種組織の中で精巣で特異的に作られていることがわかった（図 1B）。なお、MGA タンパク質は PRC1.6 複合体の中で MAX タンパク質と相互作用することで PRC1.6 複合体の DNA への結合能を付与しているが、新たに見つかった Mga バリアントは、新規エキソンの挿入に伴いストップコドンが挿入されており、その為、MAX との相互作用に必要なドメインを欠いている。従って、この Mga mRNA バリアントからのタンパク質が組み込まれている PRC1.6 複合体は、本来の機能が破綻されていることが十分に期待される。

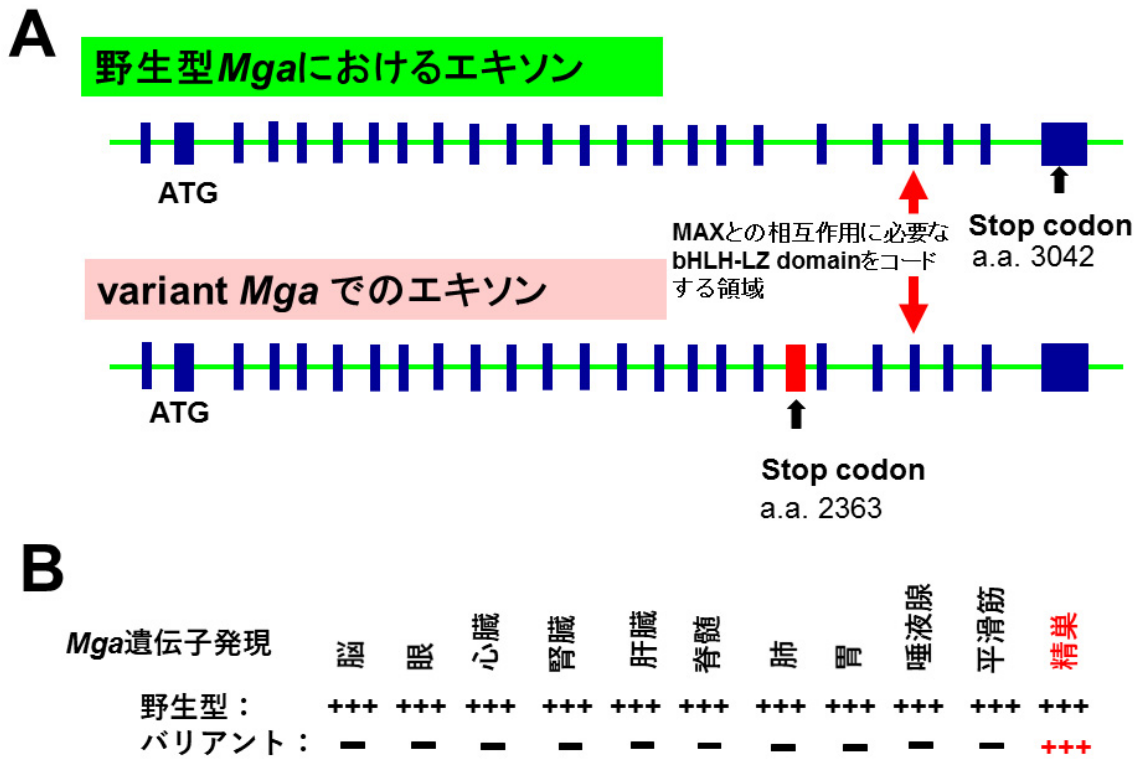


図 1. *Mga* 遺伝子からの新規エキソンを含むバリアントの同定と発現解析

(A) *Mga* 遺伝子から生み出される野生型およびバリアント RNA におけるエキソンの模式図

(B) 野生型およびバリアント Mga RNA の semi-quantitative PCR による各組織での発現解析

2. Mga mRNA バリアントの生殖細胞特異的発現

Mga バリアントの発現が、様々な組織の中で精巣特異的に見られることがわかったが、次のステップとして、精巣の中のどのような細胞種で発現しているかについての情報を得る為に、精巣切片に対して、野生型およびバリアント Mga RNA について RNA *In Situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、野生型の Mga RNA は、精巣において生殖細胞のみならず体細胞でも発現しており、また、精巣上体でも発現していることが確認された。一方、Mga バリアントについては、精巣の中では、体細胞では発現が認められず、生殖細胞に限定的に発現していることがわかった。また、精巣上体では、野生型の Mga RNA とは異なり、ほとんどその発現が確認されなかった。すなわち、野生型の Mga は、精巣の中でも生殖細胞と体細胞の両方において広汎に発現しており、一方、Mga バリアントの発現は生殖細胞に限定的にみられることがわかった（図 2）。さらには、Mga バリアントの発現について RNA *In Situ* ハイブリダイゼーションからの画像を詳細に分析したところ、円形精子まで発現が残ってはいるが、基本的に減数分裂期にある細胞にかなり限定的に発現していることが確認された。

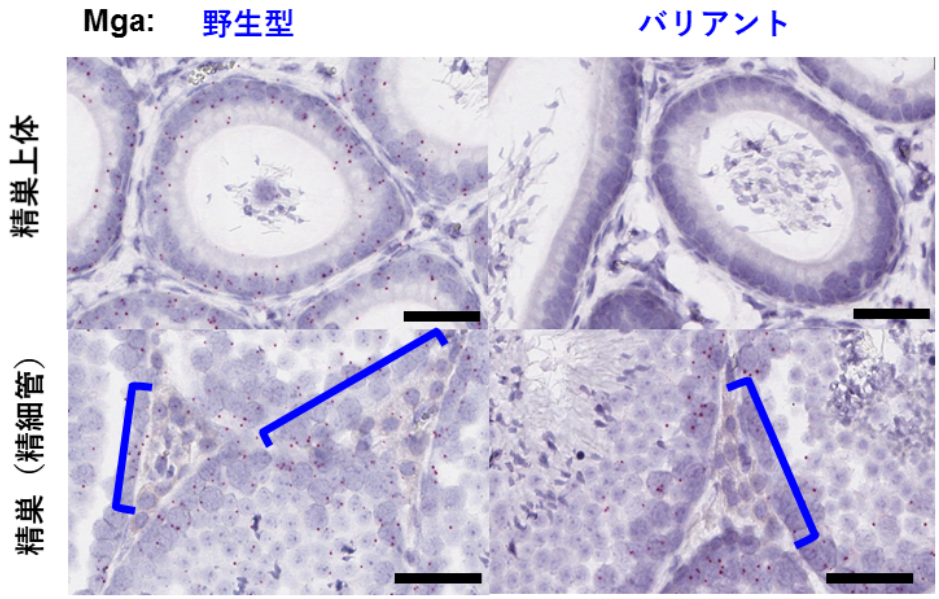


図 2. 野生型およびバリアント Mga の精巣上体および精巣（精細管）での発現解析

マウス精巣切片に対して、野生型およびバリアント Mga の発現を RNA In Situ ハイブリダイゼーション法により検討した。野生型の Mga は精巣の中の生殖細胞のみならず精細管と精細管の間の体細胞部分（青で示した部分）でも発現が認められ、精巣上体でも発現が認められた。一方、Mga バリアントは、精巣の中で生殖細胞のみに発現が確認され、精巣上体では発現がほとんど認められなかった。スケールバー = 50 µm

3. PRC1.6 と特異的サブユニットのマウス正常胎児線維芽細胞とメラノーマ細胞でのタンパク質量の比較

マウス正常線維芽細胞とメラノーマ細胞の間で、PRC1.6 複合体特異的サブユニットをコードする遺伝子の発現量の比較および生殖細胞特異的 Mga バリアントの発現の有無をチェックしたところ、いずれのデータに関してもネガティブな結果であった。それ故、タンパク質の安定性による制御の可能性について検討する為に、ウエスタンブロット法を用いてこれら 2 つの細胞種間でのそれぞれのタンパク質量について比較検討した。

その結果、内在性の発現を検出することができた 3 種類のタンパク質（PCGF6、Wdr5、L3mbtl2）のいずれについても、正常線維芽細胞よりもメラノーマ細胞においてタンパク質の量が低いことが確認された(図 3)。

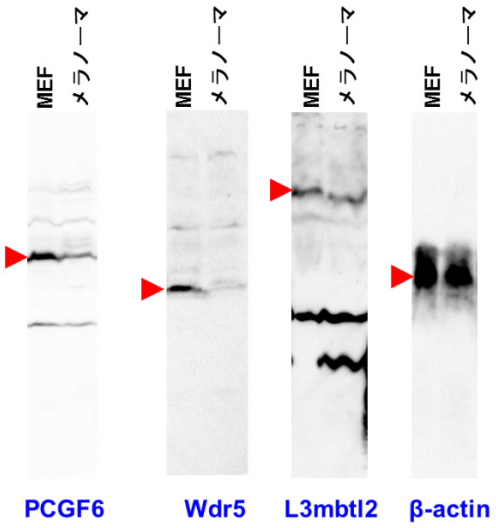


図 3. マウス線維芽細胞とメラノーマ細胞における PRC1.6 複合体特異的サブユニットのタンパク質量の比較
マウス正常胎児由来の線維芽細胞およびメラノーマ細胞からそれぞれ全細胞抽出液を調製し、PRC1.6 複合体に特異的なサブユニットである PCGF6、Wrd5、L3mbtl2 についてそれぞれ特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。赤の矢頭は、それぞれのタンパク質に相当する特異的バンドを指しており、その他のバンドは非特異的なバンドである。

考　察

本研究の成果の一つとして、Mga バリアントの生殖細胞特異的な発現による PRC1.6 複合体の減数分裂関連遺伝子の発現抑制する機能を低下させるという分子メカニズムを一つ明らかにすることができた。但し、このメカニズムは、メラノーマ細胞でのがん・精巣抗原の発現の為のメカニズムとしては使われていないようである。その代わりに、メラノーマ細胞では、少なくとも PRC1.6 複合体を構成する 3 つのサブユニットのタンパク質の量が低下しているようである。但し、どのタンパク質の減少が PRC1.6 複合体の機能の低下においてプライマリーな原因であり、どのタンパク質の低下が、単位、複合体が壊れた結果の後に起こった二次的な変化を反映しているかなど、まだ、不明な点が多く残されており、今後、更なる解析が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行する上で多大なる協力を頂いた研究室の鈴木 歩助教、平崎正孝 助教、および本研究の遂行のために支援していただいた上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Suzuki A, Hirasaki M, Hishida T, Wu J, Okamura D, Ueda A, Nishimoto M, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Matsui Y, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. Nat Commun 2016 Mar 30;7:11056. PMID: 27025988 DOI: 10.1038/ncomms11056