

マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞およびマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞における EGAM1 ホメオタンパク質群の一過性強制発現による *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導

伊波 百恵^{1,*}・小野 陽子^{1,*}・佐藤 匠¹・森 祐貴¹・春日 和²・小嶋 郁夫²・小林 正之^{1,**}

秋田県立大学大学院生物資源科学研究科

¹動物分子工学研究室, ²生物化学研究室

秋田県秋田市下新城野 〒010-0195

2011 年 7 月 8 日受付, 2011 年 7 月 26 日受理

要 約

マウス初期胚における最初の細胞分化は, 受精 2.5 日後の 8 細胞期から 3 日後の桑実期にかけて開始する。胚盤胞期になると, 将来, 胎仔を形成する内部細胞塊と胎盤を形成する栄養外胚葉に分化する。我々はマウスの個体形成における最初の細胞分化が開始する桑実胚より, EGAM1 ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した。EGAM1 ホメオタンパク質群は転写因子であると推定されるが, 標的遺伝子は同定されていない。本研究では, EGAM1 ホメオタンパク質群の発現が検出されない体細胞株である, マウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞およびマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用い, これらタンパク質群を遺伝子工学的的手法により一過性に単独強制発現させた。その後, マウス初期胚および ES 細胞で発現し, これらの未分化状態の維持に重要な転写因子をコードする *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導について検討した。その結果, EGAM1C の単独強制発現により双方の細胞株において *Oct4* 遺伝子, また, いずれの EGAM1 ホメオタンパク質群の単独強制発現によっても双方の細胞株において *Nanog* 遺伝子の発現が誘導されることが示された。今後は, 両遺伝子のプロモーター領域と EGAM1 ホメオタンパク質群との相互作用について詳細に検討する必要がある。

東北畜産学会報 61(3): 35 ~40 2012

緒 言

マウス初期胚における最初の細胞分化は, 受精 2.5 日後の 8 細胞期から受精 3 日後の桑実期にかけて開始する (Johnson と McConnell, 2004)。早期胚盤胞 (受精 3.5 日後) では, 胎仔を形成する内部細胞塊と, 胎盤を形成する栄養外胚葉へ形態的にも明確に分化する。後期胚盤胞 (受精 4.5 日後) までに卵黄囊を形成する原始内胚葉が内部細胞塊から分化し, 胞胚腔に面した領域に移動する (Yamanaka ら, 2006)。内部細胞塊より, 胚性幹細胞

(embryonic stem cells, ES 細胞 (Evans と Kaufman, 1981)) が樹立された。マウス ES 細胞の未分化状態は, 白血病阻害因子 (LIF) とウシ胎仔血清 (FCS) を添加した培養液により維持することができる。内部細胞塊および ES 細胞の未分化状態の維持には, 転写因子である OCT4 (Nichols ら, 1998) および NANOG (Mitsui ら, 2003; Chambers ら, 2003) が重要であることがよく知られている。また, 体細胞では *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現はほとんど検出されず, 分化誘導後の ES 細胞ではいずれの発現量ともに大きく低下する。

我々は, 胎仔, および妊娠の維持に必須な臓器である胎盤, 卵黄囊等の胚体外組織の形成を制御する分子基盤を明らかにするために, マウス初期胚における 4-8 細胞期から桑実期にかけて発現量が増加する遺伝子を探索

* 両著者は本研究に対して同等に寄与した。

** 連絡者: 小林 正之 (こばやし まさゆき)

(秋田県立大学大学院生物資源科学研究科)

Tel. 018-872-1596 Fax. 018-872-1676

E-mail makoba@akita-pu.ac.jp

し、EGAM1 (Expressing gene at morula stage-1) ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した (Saito ら, 2010)。Egam1 mRNA は第7染色体にコードされる *Crxos* 遺伝子座から転写され、Egam1n mRNA は Egam1 mRNA のスプライシングバリエーションとして生成される。また、Egam1c mRNA は *Crxos* 遺伝子座から転写されるトランスクリプトバリエーションである。マウス初期胚のモデル細胞としてマウス ES 細胞を用いることにより、EGAM1 は分化促進、EGAM1N は未分化状態の維持に関与することが示された (Saito ら, 2010)。一方、マウス ES 細胞における EGAM1C の機能は現在のところ不明であるが、分娩直前の胎盤において胎盤性プロラクチンファミリー遺伝子群の発現促進に関与することが判明している (Saito ら, 2011)。成体マウスでは生殖腺、目、胸腺を除く各種の臓器、および代表的な体細胞株であるマウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞において、EGAM1 ホメオタンパク質群 mRNA またはタンパク質の発現は検出されることが判明している (Saito ら, 2010)。一方、EGAM1 ホメオタンパク質群はマウス初期胚および ES 細胞の未分化状態および細胞分化に関与する転写因子であると推定されるが、標的遺伝子は同定されていない。

そこで本研究は、EGAM1 ホメオタンパク質群の発現が検出されない培養体細胞株と遺伝子工学技術を用い、これらタンパク質群を強制発現させることにより、マウス初期胚および ES 細胞で発現している重要な遺伝子の発現との関連について検討した。具体的には、いずれも体細胞に由来する NIH3T3 細胞およびマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞においてそれぞれの EGAM1 ホメオタンパク質群を個別に強制発現させ、*Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導について検討した。

材料および方法

1. NIH3T3 細胞および C2C12 細胞の培養および遺伝子導入

NIH3T3 細胞は 10% FCS (Hyclone) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 日本製薬)、C2C12 細胞は 10% FCS、高グルコース添加 (4.5 g/L) DMEM を用いて培養 (37°C, 5% CO₂) した。NIH3T3 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより入手後 (継代数不明) に本研究室において 10% FCS 添加 DMEM により 10 回継代培養し (継代数 10 とする)、その後、継代数 22 までの細胞を用いた。また、C2C12 細胞は DS ファーマバイオメディカルより入手後 (継代数 13)、継代数 22 までの細胞を用いた。いずれの細胞

株ともに、凍結融解後は継代培養 10 回 (約 1 ヶ月) 以内に実験に用いた。

既報 (Kobayashi ら, 1998) にもとづき、リポフェクション法により遺伝子導入を行った。EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターは、CAG プロモーターを有する発現ベクター pMK10 (Kobayashi ら, 1996; Abe ら, 2011) にそれぞれの cDNA を組込んだ pMK10/Egam1, pMK10/Egam1n, pMK10/Egam1c を用いた (Saito ら, 2010)。これら EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクター、または対照として Empty ベクターを遺伝子導入した 2 日後に、SDS-PAGE 用サンプルバッファーまたは Isogen (ニッポンジーン) を用いて細胞溶解液を調製した。

2. マウス初期胚の培養

既報 (Kobayashi ら, 2011) にもとづいて過剰排卵処理を施した CD-1 雌マウス (6 週令以上、日本チャールスリバー) と同系雄マウス (8 週令以上) を交配後、卵管かん流により 2 細胞期卵を回収した。体外培養をおこない、桑実胚を得て、Isogen を用いて細胞溶解液を調製した。

3. ウェスタンブロットティング

既報 (Saito ら, 2010) にもとづき、サンプルバッファーに溶解した細胞溶解液をウェスタンブロットティング法により分析した。1 次抗体として Can Get Signal Solution 1 (東洋紡) により希釈したウサギ抗 EGAM1N (Saito ら, 2010) または抗 EGAM1C (Saito ら, 2011) ポリクローナル抗血清 (20,000 倍希釈)、2 次抗体として Can Get Signal Solution 2 により希釈した Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (800,000 倍希釈, Chemicon) を用いた。基質として ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用い、LAS-4000 イメージアナライザー (富士フイルム) により化学発光を検出した。また、ウサギ抗ヒト β -ACTIN 抗体 (20,000 倍希釈, Imgenex) を用いて β -ACTIN タンパク質を検出し、ローディングコントロールとした。

4. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

Isogen により調製した細胞溶解液より、既報 (相馬ら, 2011) にもとづいて RNA の精製、cDNA の合成、および RT-PCR をおこなった。cDNA を用いて *Oct4*、*Nanog*、ハウスキーピング遺伝子 *Gapdh* cDNA を PCR により増幅した。なお、用いたプライマーは次の通りである。*Oct4*: 5'-AGCACGAGTGGAAAGCAAC-3', 5'-CCTTCTCTAGCCCAAGCTGA-3' (PCR 産物のサイズ

は509 bp), *Nanog*; 5'-GCAGGTTAAGACCTGGTTTC-3', 5'-CACTGTCTCCCAAAGCCTAGA-3' (同1119 bp), *Gapdh*; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (同452 bp)。また, PCR 増幅産物の塩基配列を決定し, 標的配列であることを確認した。

結果

まず最初に, EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターの導入2日後におけるタンパク質の一過性強制発現について, ウエスタンブロッティング法により定性的に検討した (Fig. 1)。NIH3T3 細胞および C2C12 細胞いずれにおいても, Empty ベクター導入細胞において EGAM1 ホメオタンパク質群は検出されなかった。一方, 発現ベクターを導入したこれらの細胞株では, EGAM1, EGAM1N, EGAM1C タンパク質の発現が明確に検出された。

次に, *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導について RT-PCR 法により定性的に検討した (Fig. 2)。NIH3T3 細胞および C2C12 細胞いずれにおいても, Empty ベクター導入細胞において *Oct4* mRNA の発現は検出されなかった。一方, EGAM1C を強制発現させた NIH3T3 細

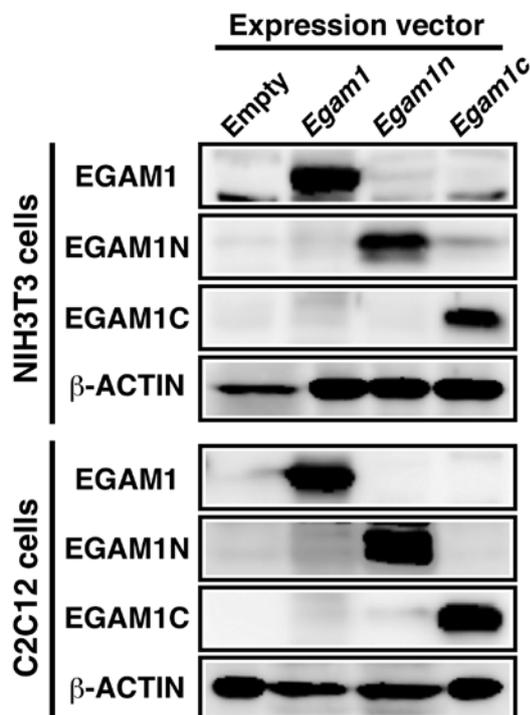


Fig. 1. Ectopic expression of EGAM1 homeoproteins in mouse fibroblast NIH3T3 cells and mouse myoblast C2C12 cells. NIH3T3 and C2C12 cells were transiently transfected with the respective expression vectors. Two days after transfection, the expression of EGAM1 (29 kDa), EGAM1N (14 kDa), and EGAM1C (17 kDa) was analyzed by Western blotting. β -ACTIN was detected as a loading control.

胞および C2C12 細胞においては, *Oct4* mRNA の発現が検出された。しかし, EGAM1 または EGAM1N を強制発現させたいずれの細胞株においても, *Oct4* mRNA の発現は検出されなかった。さらに, Empty ベクターを導入した NIH3T3 細胞および C2C12 細胞において *Nanog* mRNA は検出されなかったが, 双方の細胞株において, いずれの EGAM1 タンパク質群を強制発現させた場合でも *Nanog* mRNA の発現が検出された。

なお, それぞれの実験を独立して2回おこなったところ, ほぼ同一な結果が得られた。従って, 代表的な1回の実験結果について図示した。また, PCR 増幅産物の塩基配列は標的配列と一致していた。

考察

我々は, EGAM1 または EGAM1N タンパク質をマウス ES 細胞において強制発現させた場合, 細胞分化または未分化状態の維持に影響を及ぼすことを見出した (Saito ら, 2010)。また, 胎盤構成細胞への分化能を保持しているマウス栄養膜幹細胞株 TS7 細胞 (細井ら, 2010) において EGAM1C を強制発現させた場合, 胎盤

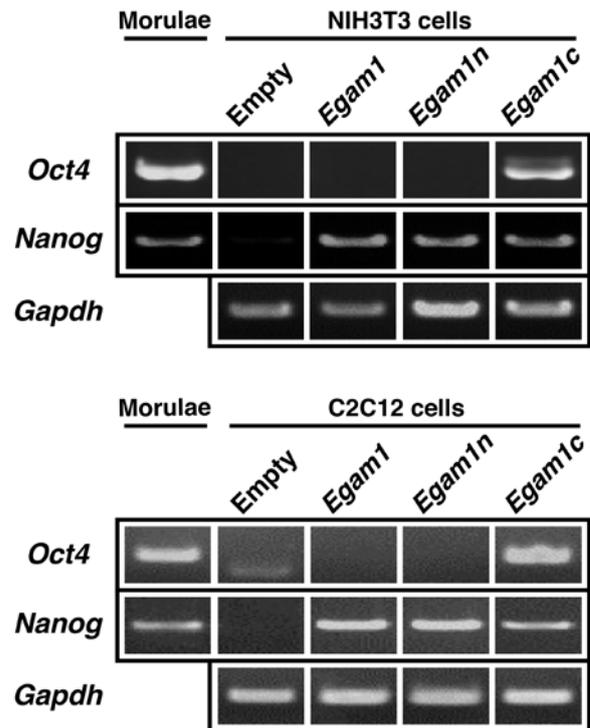


Fig. 2. Expression of mRNAs for *Oct4* and *Nanog* in NIH3T3 and C2C12 cells after the transfection with expression vectors for EGAM1 homeoproteins. NIH3T3 and C2C12 cells were transiently transfected with the respective expression vectors. Two days after transfection, the expression of mRNAs for *Oct4* (509 bp) and *Nanog* (1119 bp) was analyzed qualitatively by RT-PCR. Expression of *Gapdh* (452 bp) was analyzed as a housekeeping gene. Expression of *Oct4* and *Nanog* in morulae was also detected as a positive control.

性プロラクチンファミリー遺伝子群の発現が増強されることを見出した (Saito ら, 2011)。また一般に、ホメオタンパク質は転写因子として機能することが知られている (Gehring ら, 1994)。以上のことは、EGMAM1 ホメオタンパク質群は転写因子であることを強く示唆している。本研究により、代表的な体細胞株である NIH3T3 細胞, C2C12 細胞において EGAM1 ホメオタンパク質群を一過性に強制発現させた場合、双方の細胞株において EGAM1C 強制発現により *Oct4* 遺伝子, 双方の細胞株においていずれの EGAM1 ホメオタンパク質の強制発現によっても *Nanog* 遺伝子の発現を誘導できることが示された。本来、これらの細胞株において EGAM1 ホメオタンパク質群の発現は検出されないこと, EGAM1 ホメオタンパク質群の単独強制発現により発現誘導されたことより, EGAM1 ホメオタンパク質群と *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導との間に直接的な関係が存在する可能性が考えられる。

Fig. 3 に示すように, EGAM1 ホメオタンパク質群には一次構造上, 深い関連が認められる。ホメオドメインは DNA 結合ドメインとして機能するが, EGAM1N, EGAM1C のホメオドメインはそれぞれペアード (paired) タイプ, エングレイルド (engrailed) タイプと最も相同性が高く (Saito ら, 2010), アミノ酸レベルでの互いの相同性は約 25% である。また EGAM1 は, どちらのホメオドメインとも保持している。なお, 現在までのところ EGAM1 ホメオタンパク質群において, ホメオドメイン以外の機能ドメインは見出されていない。本研究においていずれの EGAM1 ホメオタンパク質群の強制発現によっても *Nanog* 発現が誘導されたことより, EGAM1N, EGAM1C が保持するホメオドメインいずれも *Nanog* 遺伝子の発現誘導に関与できると考

えられる。一方, *Oct4* 遺伝子の発現誘導は EGAM1C を強制発現させた場合においてのみ認められた。EGAM1 も EGAM1C に認められるホメオドメインを保持していることを考慮すると, *Oct4* 遺伝子の発現誘導に関しては, EGAM1C のホメオドメインと EGAM1C 分子内のみ存在する他の領域との相互作用が考えられる。その候補としては, EGAM1C 分子内に特異的に存在するアミノ酸配列 (Fig. 3, black box にて示した領域, アミノ酸位置番号 1-12) があげられる。一方, ホメオタンパク質はホモ二量体, または他のタンパク質分子とヘテロ二量体を形成して転写制御活性を示すことが報告されている (Gehring ら, 1994)。すなわち, 複合体を形成することにより転写因子としての特異性が現れる可能性も考えられる。これらのことを明らかにするためには, *Oct4* および *Nanog* プロモーターを単離し, 欠失変異体や点変異体を含む EGAM1 ホメオタンパク質群が示すプロモーター領域への結合活性の有無, 転写制御活性等を検討する必要がある。

近年, 山中ら (Takahashi と Yamanaka, 2006; Okita ら, 2007) は, 転写因子遺伝子群 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を体細胞であるマウス胎仔線維芽細胞に同時に遺伝子導入することにより, *Oct4*, *Nanog* 遺伝子を含む ES 細胞特異的な遺伝子群を発現し, かつ, ES 細胞と同等な分化能を保持する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立できることを報告した。本研究では EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターの導入 2 日後において *Oct4*, *Nanog* 遺伝子の発現誘導について検討したが, 今後は EGAM1 ホメオタンパク質群を長期間にわたり発現させた時の ES 細胞特異的な遺伝子群の発現誘導について検討する予定である。また, EGAM1 ホメオタンパク質群を安定的に発現させることにより, 体細胞からの

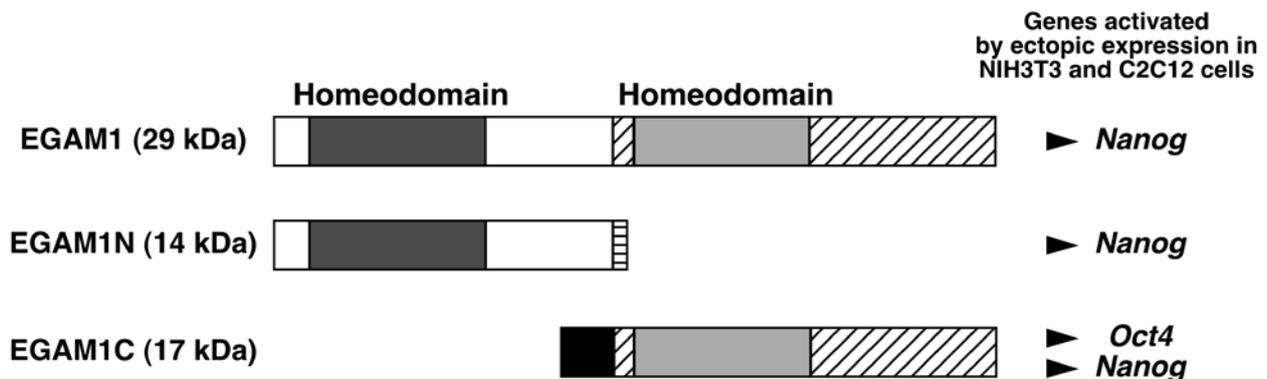


Fig. 3. Schematic diagram of the primary amino acid sequence for EGAM1 homeoproteins in combination with results obtained in this study. Amino acid sequences of EGAM1, EGAM1N, and EGAM1C proteins were compared. Boxes filled with the same patterns, including white boxes, indicate the regions matching completely in each protein. Note that a black box in EGAM1C indicates a unique region among EGAM1 homeoproteins. Arrowheads indicate genes activated in NIH3T3 and C2C12 cells when transiently transfected with expression vectors for the respective EGAM1 homeoproteins.

iPS 細胞の樹立効率を向上させることができる可能性も考えられる。

以上のように、EGAM1 ホメオタンパク質群を体細胞に由来する NIH3T3 および C2C12 細胞において一過性に単独強制発現させた場合、*Oct4* または *Nanog* 遺伝子の発現が誘導されることが判明した。今後は、両遺伝子のプロモーター領域と EGAM1 ホメオタンパク質群との相互作用について詳細に検討する必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、秋田県立大学学長プロジェクトによる研究助成を受けて行われた。

引用文献

- Abe H, Nakazawa M, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. The CAG promoter is more active than the CEF promoter for the expression of transgenes in a mouse ES cell line E14-derived EB3 cells. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 25: 2301-2304. 2011.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655. 2003.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156. 1981.
- Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*, 63: 487-526. 1994.
- Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 15: 583-597. 2004.
- Kobayashi M, Saito K, Tamogami S, Takashima J, Kasuga K, Kojima I. Identification of a 2-cell stage specific inhibitor of the cleavage of preimplantation mouse embryos synthesized by rat hepatoma cells as 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Zygote*, 19: 117-125. 2011.
- Kobayashi M, Yamauchi Y, Tanaka A. Stable expression of antisense Rb-1 RNA inhibits terminal differentiation of mouse myoblast C2 cells. *Exp Cell Res*, 239: 40-49. 1998.
- Kobayashi M, Yamauchi Y, Tanaka A, Shimamura S. Improved dicistronic mRNA expression vectors for efficient selection of transfectants highly expressing foreign genes. *Biotechniques*, 21: 398-402. 1996.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K., Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113: 631-642. 2003.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95: 379-391. 1998.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-317. 2007.
- Saito K, Abe H, Nakazawa M, Irokawa E, Watanabe M, Hosoi Y, Soma M, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. Cloning of complementary DNAs encoding structurally related homeoproteins from preimplantation mouse embryos: their involvement in the differentiation of embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 82: 687-697. 2010.
- Saito K, Ogawa A, Toyofuku K, Hosoi Y, Soma M, Iha M, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. Relationships between homeoprotein EGAM1C and the expression of the placental prolactin gene family in mouse placentae and trophoblast stem cells. *Reproduction*, 141: 259-268. 2011.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. 2006.
- Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*, 235: 2301-2314. 2006.
- 細井勇輔, 相馬未来, 齊藤耕一, 荒川恵美, 安藤裕美, 森田早苗, 大津亜紀, 春日和, 小嶋郁夫, 小林正之. マウス胚盤胞からの栄養膜幹細胞株および胚体外内胚葉細胞株の樹立と遺伝子発現解析. *東畜会報*, 60: 6-12. 2010.
- 相馬未来, 齊藤耕一, 細井勇輔, 伊波百恵, 春日和, 小嶋郁夫, 小林正之. マウス胚盤胞から樹立された3種の幹細胞におけるEGAM1ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現解析. *東畜会報*, 60: 39-54. 2011.

Ectopic expression of EGAM1 homeoproteins induces the expression of *Oct4* or *Nanog* in mouse fibroblast NIH3T3 and myoblast C2C12 cells

Momoe IHA^{1,*}, Yoko ONO^{1,*}, Sho SATO¹, Yuki MORI¹, Kano KASUGA²,
Ikuo KOJIMA² and Masayuki KOBAYASHI¹

¹Laboratory for Advanced Animal Cell Technology and ²Laboratory for Biological Chemistry,
Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,
Shimoshinjoh Nakano, Akita 010-0195, Japan

Corresponding: Masayuki KOBAYASHI, (Fax: +81 (0) 18-872-1676, e-mail: makoba@akita-pu.ac.jp)

*These authors contributed equally to this work.

Recently, we identified EGAM1 homeoproteins (EGAM1, EGAM1N, and EGAM1C) in preimplantation mouse embryos. The mRNAs and its encoded proteins also expressed in mouse embryonic stem (ES) cells are capable of regulating the maintenance and/or differentiation of ES cells. These proteins are considered to act as transcription factors from their structural features, while direct target genes are still unknown. In the present study, we transiently transfected the respective expression vectors for EGAM1 homeoproteins into NIH3T3 and C2C12 cells. Two days after transfection, the expression of mRNAs for *Oct4* and *Nanog*, crucial genes encoding transcription factors to sustain the pluripotency of preimplantation embryos and ES cells, was analyzed qualitatively by RT-PCR. In both cell lines, upregulation of *Oct4* mRNA was induced by forced expression of EGAM1C protein. On the other hand, upregulation of *Nanog* mRNA was induced by all respective EGAM1 homeoproteins in both cell lines. These results demonstrated that ectopic expression of EGAM1 homeoproteins induced the expression of *Oct4* or *Nanog* in cell lines derived from somatic cells, including NIH3T3 and C2C12 cells. Interactions between EGAM1 homeoproteins and promoter regions of *Oct4* and *Nanog* should be analyzed in future experiments.

Key words: EGAM1 homeoproteins, Gene expression, *Nanog*, *Oct4*, Somatic cells