

大腸菌により生産した 6x Histidine-tag 付加ブタ線維芽細胞増殖因子 4 タンパク質 (HispFGF4) による細胞増殖促進機構に関する解析

菅原彩子¹・佐藤梓織¹・佐藤由貴¹・春日 和¹・小嶋郁夫¹・福田智一²・小林正之^{1*}

¹ 秋田県立大学大学院生物資源科学研究科

秋田県秋田市下新城野 〒010-0195

² 東北大学大学院農学研究科

宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 〒981-8555

2013 年 9 月 4 日受付, 2013 年 12 月 5 日受理

要 約

マウスの発生において, 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 4 は FGF 受容体 (FGFR) 2 を介して栄養外胚葉の細胞増殖を促進することにより, 胎盤形成に直接的に関与する重要な細胞増殖因子である。しかし, ブタの発生における FGF4 の役割はほとんど報告されていない。最近, 我々は, 品種が明らかなブタの *FGF4* 遺伝子に由来するタンパク質コード領域の全塩基配列を明らかにした。また, この塩基配列情報を応用して 6x Histidine-tag を付加した遺伝子組換え成熟型ブタ FGF4 (proline³¹-leucine²⁰⁶, HispFGF4) を大腸菌により生産することに成功し, かつ, HispFGF4 は細胞増殖促進活性を示すことを明らかにした。そこで本研究では, 遺伝子工学的な変化がなされている HispFGF4 は, FGFR の活性化を介して標的細胞に作用するか検討した。ブタ胎仔線維芽細胞株 PEF SV40 細胞の培養系に HispFGF4 と FGFR 阻害剤 PD173074 を同時に添加したところ, PD173074 添加量に依存して HispFGF4 による細胞増殖促進効果が明確に阻害された。また, PEF SV40 細胞において *FGFR2* mRNA が発現していることが示された。すなわち, HispFGF4 は, FGFR2 に例示される FGFR の活性化を介してブタに由来する細胞の増殖を促進することが示唆された。また, HispFGF4 はマウス胎仔線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞の細胞増殖を促進できることも判明した。これらの結果は, HispFGF4 はブタにおける FGF4 の作用やその作用機構を解明する上で有用であること, HispFGF4 はブタ細胞のみならず, 他の哺乳動物種の細胞増殖も促進できることを示す。

東北畜産学会報 63(3): 38 ~ 43 2014

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。栄養外胚葉は, 内部細胞塊と接している極栄養外胚葉とそれ以外の壁栄養外胚葉から構成されている。線維芽細胞増殖因子 (FGF) 4 は内部細胞塊から分泌され, 極栄

養外胚葉の増殖を促進する。FGF 受容体 (*FGFR*) 2 欠損マウス胚では胎盤が形成されないことから, FGF4 は FGFR2 を介して作用することが示されている (Arman ら, 1998)。また, *Fgf4* ノックアウトマウス胚では胎盤が形成されないことより, FGF4 は胎盤の形成において重要な細胞増殖因子であることが証明された (Feldman ら, 1995)。

一方, 体細胞クローンウシにおいて胎盤形成の異常が高頻度で認められることが判明した (Cibelli ら, 1998; Kato ら, 1998)。体細胞クローンウシ胚盤胞では, 体内受精胚と比較して *FGF4* mRNA 発現量が有意に低いことも報告された (Amarnath ら, 2007; Fujii ら, 2010)。すなわち, FGF4 はマウスのみならず, ウシの発生にも

* 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動物分子工学研究室)
Tel 018-872-1596, Fax 018-872-1676
E-mail makoba@akita-pu.ac.jp

重要であると考えられる。しかし、ブタの発生における *FGF4* 遺伝子および FGF4 タンパク質の役割はほとんど報告されていない。

そこで我々は、まず、品種が明らかなブタ（ランドレース種、デュロック種）に由来する *FGF4* 遺伝子のタンパク質コード領域全塩基配列（GenBank accession No. AB745732）を決定した。この塩基配列情報を応用して、6x Histidine-tag を付加した遺伝子組換え成熟型ブタ FGF4 (proline³¹-leucine²⁰⁶, HispFGF4) を大腸菌により生産した (Sugawara ら, 2013)。ブタ胎仔線維芽細胞株を用いて HispFGF4 の細胞増殖促進活性を検討したところ、大腸菌発現ヒト FGF4 とほぼ同程度の活性を示すことが判明している。そこで本研究では、遺伝子工学的な改変がなされている HispFGF4 は、一般的に知られている FGF シグナル伝達経路、すなわち FGFR の活性化を介して標的細胞に作用するか検討した。

材料および方法

1. ブタ胎仔線維芽細胞株 PEF SV40 細胞とマウス胎仔線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞の培養

PEF SV40 細胞 (Fukuda ら, 2012) は 10% ウシ胎仔血清 (Biological Industries) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 4.5 g/l グルコース, Sigma) を用いて培養 (37°C, 5% CO₂) した。Balb/c 3T3 細胞は 10% ウシ胎仔血清添加 DMEM (1 g/l グルコース, Sigma) を用いて培養した。これらの細胞を 96 穴プレート (TPP) に播種後 (PEF SV40 細胞は 3,000 cells/200 μ l \cdot well, Balb/c 3T3 細胞は 2,000 cells/200 μ l \cdot well), 一晚培養した。0.4% 仔ウシ血清 (Sigma) を添加した DMEM に交換後、さらに 24 時間培養した。引き続き、HispFGF4 または大腸菌発現ヒト FGF4 (RhFGF4, Sigma) とヘパリン (1 μ g/ml, Sigma) を添加した 0.4% 仔ウシ血清添加 DMEM (100 μ l/well) に交換後、72 時間培養した。また、必要に応じて FGFR 阻害剤 PD173074 (BioVision) を FGF4 と同時に添加した。培養液を除去せずに細胞増殖測定試薬 WST-1 (10 μ l/well, Takara-Bio) を添加・攪拌し、さらに 3 時間保温 (37°C, 5% CO₂) した。すぐにマイクロプレートリーダー (モデル 550, Bio-Rad) を用いて 450 nm と 655 nm の吸光度 (A) を測定し、 $A_{450} - A_{655}$ 値を算出した。

または、24 穴プレート (Greiner) に細胞を播種後 (PEF SV40 細胞は 17,300 cells/2 ml \cdot well, Balb/c 3T3 細胞は 11,500 cells/2 ml \cdot well), 一晚培養し、0.4% 仔ウシ血清を添加した DMEM (1 ml) に交換後、さらに 24 時間培養した。引き続き、HispFGF4 とヘパリンを添加し

た 0.4% 仔ウシ血清添加 DMEM (1 ml/well) に交換後、さらに 72 時間培養した。トリプシン処理により細胞をプレートから剥離し、分散した後、コールターカウンター (モデル Z2, Beckman-Coulter) により細胞数を計数した。

2. PCR

PEF SV40 細胞より、RNeasy kit (Qiagen) を用いて RNA を精製した。既報 (Saito ら, 2011; Iha ら, 2012) にもとづき、精製 RNA、逆転写酵素 (ReverTra Ace, 東洋紡) とプライマー (オリゴ dT₂₀ プライマー: ランダム N9 プライマー = 1:10) を用いて cDNA を合成し、プライマーセット (5'-GAAAAACGGAAGGAATTTAAGCAGGAACA-3', 5'-AACTCCACGTCGCCCCCAACC-3') を用いて PCR 法により *FGFR2* cDNA を増幅した。なお、得られた PCR 増幅産物の塩基配列を決定することにより、*FGFR2* mRNA に由来した cDNA であることを検証した。

3. 統計解析

2 群の平均値の差は *t* 検定により分析した。

結果および考察

我々の研究により、6x Histidine-tag を付加した遺伝子組換え成熟型ブタ FGF4 (HispFGF4) は細胞増殖促進活性を示すことが示されている (Sugawara ら, 2013)。しかし、遺伝子工学的な改変がなされている、HispFGF4 による細胞増殖促進機構は不明であった。そこで本研究では、代表的な FGFR 阻害剤としてその特異性がよく検証されている PD173074 (Skaper ら, 2000; Yang ら, 2011) を用い、HispFGF4 の細胞増殖促進効果が減弱されるか検討した。

我々による以前の研究結果によく一致して (Sugawara ら, 2013), 72 時間の HispFGF4 (1 nM) 添加培養により、PEF SV40 細胞の細胞数は有意 ($P < 0.01$) に増加した (Fig. 1A)。一方、PD173074 (0.01 μ M) のみを添加した場合、FGF4 \cdot PD173074 とともに非添加であった場合と比較して細胞数に差は認められなかった。すなわち、0.01 μ M PD173074 は細胞毒性を示さないことが判明した。そこで HispFGF4 (1 nM) と同時に PD173074 (0.01 μ M) を添加したところ、HispFGF4 による細胞数の増加はほぼ認められなくなった。

引き続き、HispFGF4 作用の阻害に対する PD173074 濃度依存性について、WST-1 法を用いて更に検討した (Fig. 1B)。HispFGF4 (0.1 nM) を添加した場合、PEF SV40 細胞の増殖は有意 ($P < 0.01$) に促進された。一

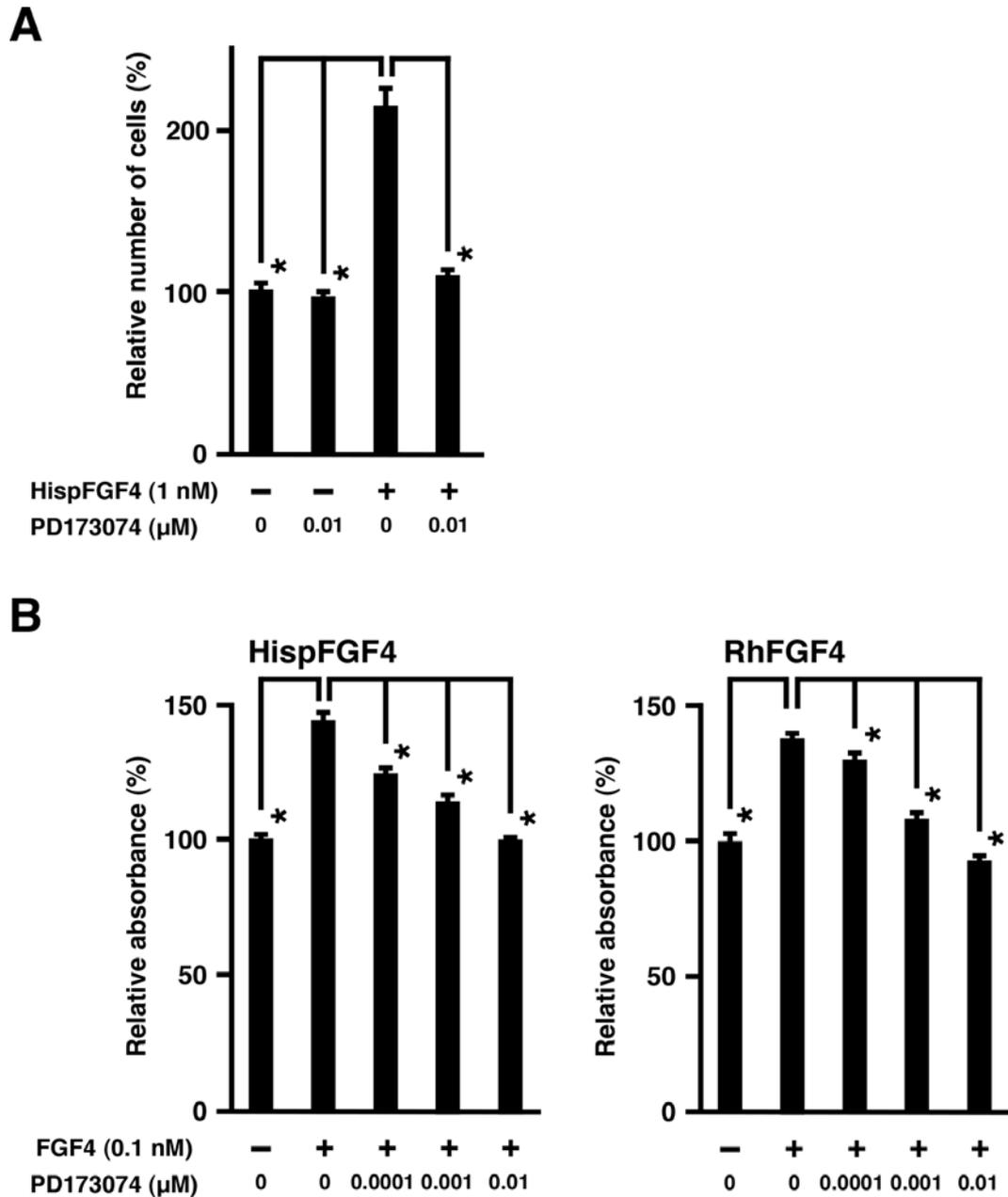


Fig. 1. Effect of PD173074, an FGF receptor inhibitor, on the growth-promoting activity of HispFGF4 in porcine embryonic fibroblast PEF SV40 cells.

(A) PEF SV40 cells were precultured with 10% fetal calf serum in a 24-well plate overnight. Then the cells were further cultured with 0.4% calf serum (CS) for a 1-day culture period. The growth-promoting activities of 1 nM HispFGF4 were analyzed in the presence of PD173074 (0.01 μM) for a 3-day culture period with 0.4% CS. Then, cell numbers were counted. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$ independent wells). $*p < 0.01$; significantly different between the presence and absence of HispFGF4 or PD173074. The panel is representative of two independent trials.

(B) PEF SV40 cells were cultured in a 96-well plate as indicated in A. The growth-promoting activities of 0.1 nM HispFGF4 and RhFGF4 were analyzed in the presence of varying concentrations of PD173074 for a 3-day culture period with 0.4% CS. WST-1 reagent was added to each well and incubated for an additional 3-hour period. The absorbance was measured using a microplate reader at 450/655 nm. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 8$ independent wells). $*p < 0.01$; significantly different between the presence and absence of FGF4 or PD173074. The panel is representative of two independent trials.

方, HispFGF4 と同時に PD173074 を添加することにより, PD173074 添加量に依存 (0.0001 - 0.01 μ M) して細胞増殖促進効果は有意 ($P < 0.01$) に阻害された。また, RhFGF4 (0.1 nM) を添加した場合にも PEF SV40 細胞の細胞増殖は有意 ($P < 0.01$) に促進され, PD173074 添加量に依存してこの細胞増殖促進効果は有意 ($P < 0.01$) に阻害された。

そこで, 代表的な FGFR である FGFR2 の遺伝子発現について検討したところ, PEF SV40 細胞において当該遺伝子 mRNA の発現が検出された (Fig. 2)。これらの結果より, HispFGF4 は FGFR2 に例示される FGFR の活性化を介して作用することにより, ブタに由来する細胞の増殖を促進すると考えられる。

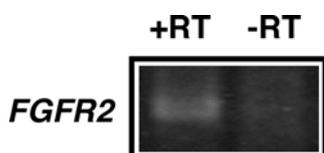


Fig. 2. Expression of *FGFR2* transcripts in PEF SV40 cells.

The expression of *FGFR2* transcripts in PEF SV40 cells was analyzed qualitatively by PCR using cDNA (with reverse transcriptase reaction, +RT) as a template and RNA prepared from the cells as a negative control (without reverse transcriptase reaction, -RT). The size of the PCR product was 252 bp.

次に, HispFGF4 はブタ以外の哺乳動物種の細胞増殖も促進できるか明らかにするために, 代表的な線維芽細胞株である, マウス胎仔線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞の増殖に対する効果を検討した。Fig. 3A に示すように, 72 時間の HispFGF4 添加培養により, Balb/c 3T3 細胞の細胞数は有意 ($P < 0.01$) に増加した。WST-1 法を用いてより詳細に HispFGF4 による細胞増殖促進効果を検討したところ (Fig. 3B), 0.001 nM 以上の HispFGF4 添加により, 細胞増殖は有意 ($P < 0.01$) に促進されることが判明した。我々の以前の研究においても, 0.001 nM 以上の HispFGF4 添加により PEF SV40 細胞の増殖が有意に促進されている (Sugawara ら, 2013)。これらの結果は, HispFGF4 はブタ細胞のみならず, 他の哺乳動物種の細胞増殖も促進できることを示している。事実, 成熟型ブタ FGF4 (GenBank accession No. AB745732) とマウス (同 NM_002006)・ヒト (同 NM_002006)・ウシ (同 AB633206) に由来する成熟型 FGF4 とのアミノ酸レベルの相同性はそれぞれ 85・93・95% であり, 高い数値を示す。

以上に示したように, 遺伝子工学的な改変がなされている HispFGF4 は, 一般的に知られている FGF シグナル伝達経路, すなわち, FGFR の活性化を介して標

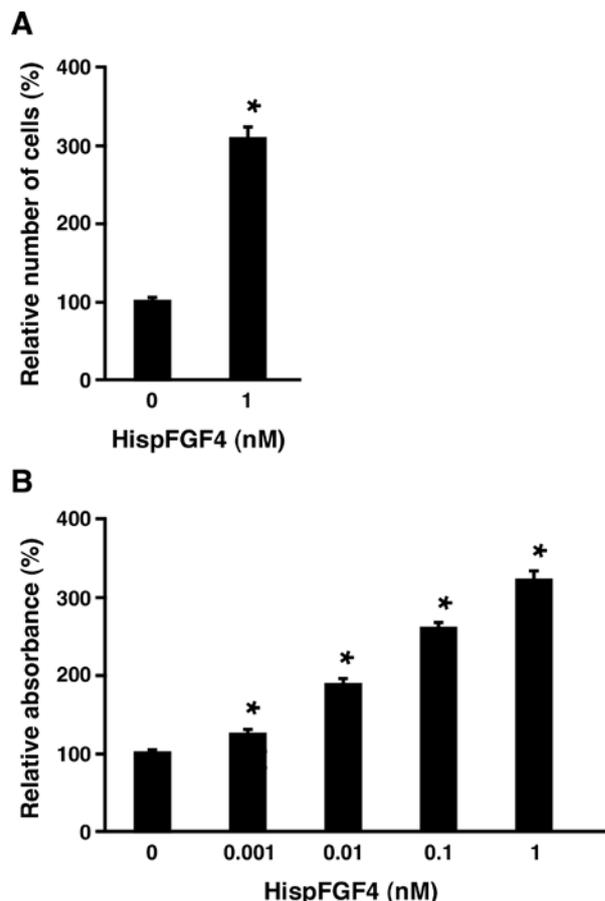


Fig. 3. Effect of HispFGF4 on cell growth of mouse embryonic fibroblast Balb/c 3T3 cells.

(A) Effects of 1 nM HispFGF4 on cell growth of Balb/c 3T3 cells were analyzed as described in the legend of Fig. 1A. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$ independent wells). * $p < 0.01$ versus the control (HispFGF4, 0 nM). The panel is representative of two independent trials.

(B) Effects of HispFGF4 on cell growth of Balb/c 3T3 cells were analyzed as described in the legend of Fig. 1B. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 8$ independent wells). * $p < 0.01$ versus the control (HispFGF4, 0 nM). The panel is representative of two independent trials.

的細胞に作用することが示唆された。これらのことより, HispFGF4 はブタにおける FGF4 の作用やその作用機構を解明する上で有用であると考えられる。今後は HispFGF4 を用いることにより, ブタ胚における FGF4 と胎盤形成との関連について検討する予定である。

謝 辞

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金 (JSPS KAKENHI No. 24580413) および秋田県立大学学長プロジェクト (H24Kendai-chi No. 44, H25Kendai-chi No. 79) による研究助成を受けて行われた。

引用文献

- Amarnath D, Li X, Kato Y, Tsunoda Y. Gene expression in individual bovine somatic cell cloned embryos at the 8-cell and blastocyst stages of preimplantation development. *J Reprod Dev*, 53: 1247-1263. 2007.
- Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5082-5087. 1998.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280: 1256-1258. 1998.
- Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267: 246-249. 1995.
- Fujii T, Moriyasu S, Hirayama H, Hashizume T, Sawai K. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram*, 12: 617-625. 2010.
- Fukuda T, Katayama M, Yoshizawa T, Eitsuka T, Mizukami H, Nakagawa K, Ito H, Komagata H, Song S, Roh S, Hoshino Y, Sato E, Hanada H, Nishimori K, Miyazawa T, Uchida T. Efficient establishment of pig embryonic fibroblast cell lines with conditional expression of the simian vacuolating virus 40 large T fragment. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76: 1372-1377. 2012.
- Iha M, Watanabe M, Kihara Y, Sugawara S, Saito K, Soma M, Sato S, Mori Y, Kasuga K, Kojima I, Sasamura R, Murata J, Kobayashi M. Effect of ectopic expression of homeoprotein EGAM1C on the cell morphology, growth, and differentiation in a mouse embryonic stem cell line, MG1.19 cells. *Reproduction*, 143: 477-489. 2012.
- Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 15: 583-597. 2004.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098. 1998.
- 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.
- Skaper SD, Kee WJ, Facci L, Macdonald G, Doherty P, Walsh FS. The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects. *J Neurochem*, 75: 1520-1527. 2000.
- Sugawara S, Ito T, Suzuki H, Takahashi T, Konishi J, Kobayashi M, Sato S, Mori Y, Kasuga K, Kojima I, Fukuda T, Kobayashi M. Common amino acid sequences deduced from coding exons of the porcine *FGF4* gene in two breeds and production of the encoded protein in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77: 173-177. 2013.
- Yang QE, Fields SD, Zhang K, Ozawa M, Johnson SE, Ealy AD. Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocyst outgrowths. *Biol Reprod*, 85: 946-953. 2011.

Growth-promoting activity of bacterially expressed, 6x histidine-tagged porcine fibroblast growth factor 4 (HispFGF4) in porcine-derived cells cultured *in vitro*: a potential mechanism

Saiko SUGAWARA¹, Shiori SATO¹, Yuki SATO¹, Kano KASUGA¹, Ikuo KOJIMA¹,
Tomokazu FUKUDA² and Masayuki KOBAYASHI¹

¹Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,
Shimoshinjoh Nakano, Akita 010-0195, Japan

²Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
Tsutsumidori-amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan

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

Summary

Fibroblast growth factor 4 (*FGF4*) is considered a crucial gene in the development of mammalian embryos. We recently determined the coding exons of porcine *FGF4* in identified breeds, and produced HispFGF4, a 6x histidine-tagged porcine FGF4 (proline³¹–leucine²⁰⁶), in *Escherichia coli*. Here, we demonstrated a possible mechanism underlying HispFGF4 action in porcine-derived cells. The growth-promoting activity of HispFGF4 was potently inhibited by PD173074, a representative FGF receptor inhibitor, in porcine embryonic fibroblast PEF SV40 cells expressing a transcript encoding FGF receptor 2. HispFGF4 also stimulated cell growth of mouse embryonic fibroblast Balb/c 3T3 cells. Taken together, we suggest that HispFGF4 is capable of promoting cell growth of porcine-derived cells via an authentic FGF signaling pathway, as well as murine-derived cells. We consider that HispFGF4 is useful for analyzing the effects of FGF4 and the molecular mechanisms underlying FGF4 actions in the pig.

Key words: cell growth, fibroblast growth factor 4, fibroblast growth factor receptor, PD173074, pig