

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06373

研究課題名（和文）新規転写因子EGAM1ホメオタンパク質群を主軸とする胚発生制御の統合的理解

研究課題名（英文）Study on the role of EGAM1 homeoproteins during mammalian embryogenesis

研究代表者

小林 正之（Kobayashi, Masayuki）

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50211909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究代表者はマウス初期胚より，構造上深い関連性を有する新規転写因子EGAM1ホメオタンパク質群（3種）を発見した。本研究では，胚発生における当該タンパク質群の役割と標的遺伝子を解明し，胚発生や細胞機能を制御する新たな分子基盤の確立を目指した。その結果，EGAM1ホメオタンパク質群は胚発生の初期に形成される胎盤前駆細胞（栄養外胚葉）の形成に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGAM1ホメオタンパク質群は初期胚に含まれる胎仔前駆細胞と胎盤前駆細胞の維持もしくは形成に重要であることより，初期胚の形成とその後の胚着床に重要である。すなわち，初期胚全体の形成もしくは維持に關与する，稀な転写因子であると考えられる。これらのことより，EGAM1ホメオタンパク質群の発現異常は，初期流産の一因になると考えられる。本研究の発展は，産婦人科領域・産業動物の生産等，人類の持続的な発展に大きく寄与する。

研究成果の概要（英文）：Recently, we identified the structurally related EGAM1 homeoproteins in both preimplantation mouse embryos and embryonic stem (ES) cells. In this study, we investigated the roles of EGAM1 homeoproteins in the formation of pluripotent cells and the generation of trophoblast stem (TS) cells. EGAM1N can promote the generation of mouse iPS cells, suggesting that EGAM1N probably support the formation or maintenance of inner cell mass. In addition, we generated mouse ES cell lines stably expressing respective EGAM1 homeoproteins. From these ES cell-transfectants expressing exogenous EGAM1N or EGAM1C, stable TS like-cell lines were induced. These results suggested that EGAM1N and EGAM1C are crucial for formation or maintenance of the trophectoderm in preimplantation embryos.

研究分野：動物分子生殖生理学

キーワード：繁殖 EGAM1ホメオタンパク質群 初期胚 ES細胞 発生 転写因子 遺伝子発現

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

マウス胚では、「最初の細胞分化（胎盤形成）」が受精3日後の桑実胚で開始し、4日後の胚盤胞では胎仔前駆細胞と胎盤前駆細胞・卵黄嚢前駆細胞が形成される。胚の着床と妊娠維持には、胎仔と胚体外組織（胎盤と卵黄嚢）の形成を担う転写因子が決定的に重要である。胎仔前駆細胞を培養して得たES細胞を用い、これに関与する重要な転写因子群が発見された。一方、個別の組織の形成は複雑な過程を経るが、これらの素過程を担う転写因子の実態は不明である。

申請者は、「最初の細胞分化」が開始する桑実胚そのものから胚発生に重要な新規転写因子を探索することを着想した。その結果、第7染色体に座乗する単一の遺伝子からスプライシングバリエント・トランスクリプトバリエントとして発現する、構造上深い関連性を有するEGAM1ホメオタンパク質群（3種）を発見した（Saito, Kobayashiら Biol Reprod 2010）。現在の社会情勢は、高度不妊治療への需要、動物性タンパク質の効率的・安定供給への需要が増している。本研究では、当該タンパク質群についてまだ解明されていない基礎研究を完成し、子宮への胚着床の安定性と、その後の流産との関連を追求するための基盤を固める。特に、胚発生における当該タンパク質群の本質的な役割と、転写因子として機能する分子メカニズムに加え、具体的な組織形成との関連を解明する。本研究の「学術的問い」は、当該タンパク質群を中心とした、胚発生における新規な遺伝子発現制御機構の軸を提示すること、である。一方、申請者が当該タンパク質群の発見に係る原著論文を発表してからまだ10年にも満たず、基礎研究レベルで未解明な点が多い。また、動物生理・病態との関連を追求する上でも多くの準備研究を必要とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物の繁殖効率向上を目指し、EGAM1ホメオタンパク質群を主軸として胚発生制御を統合的に理解すること、である。申請者は2010年春に最初の論文を発表する以前より研究を展開しており、研究をリードしている。応用面ではヒト・ラット・ウシ・ブタ・イヌ・ネコなどにもパラログ遺伝子が見出され、また、子宮への胚着床の安定性、その後の流産との関連が想定されるので、波及効果は非常に大きい。事実、マウスEGAM1ホメオタンパク質群とヒト・パラログ遺伝子であるTPRX1は、機能的にも共通していることを明示した（Mori, Kobayashiら Biotech Biotechnol Eq 2018）。

既に判明していることは、当該タンパク質群は細胞の未分化状態の維持・増殖・分化・細胞形態に関与することだけではない。全く予期せぬことに、EGAM1とEGAM1Cは目・胎盤に例示される、終末分化細胞でも細胞機能に関与する（Saito, Kobayashiら Reproduction 2011; Saito, Kobayashiら Biotech Biotechnol Eq 2012）。このように多様な生命現象に関与する転写因子は世界的にもほとんど類例がなく、ES細胞の未分化状態の維持・細胞増殖・エネルギー代謝に関与することが報告されたc-MYC（Cell 2012）とRONIN（Cell 2008）を例示するにとどまる。予備的データとして、マウス胚においてEGAM1ホメオタンパク質群の遺伝子機能を阻害した場合、胚盤胞を構成する細胞数が明らかに減少した。これは、初期胚の発生において、当該タンパク質群は重要であることを明示している。当該タンパク質群による遺伝子発現調節メカニズムに係る全体像の解明は、様々な遺伝子の転写因子として機能している特徴を如実に描き出すことができると予測している。

3. 研究の方法

- (1) 初期胚に含まれる胎仔前駆細胞（未分化細胞）の形成と維持におけるEGAM1ホメオタンパク質群の機能を検証するために、マウスiPS細胞の樹立システムを応用した。またこの時、遺伝子機能を詳細に検証するために、外来遺伝子の発現を調節できる新たな遺伝子発現調節システムを開発した。
- (2) マウス胚の発生過程で形成される未分化細胞のモデル細胞として、マウスES細胞を選択した。これまでの研究により作出した、EGAM1ホメオタンパク質群それぞれを個別に発現するマウスES細胞に対し、マウス胚盤胞から胎盤幹細胞（TS細胞）を樹立する培養条件を基盤とした種々の培養条件を適用した。これにより、ES細胞からTS細胞に分化転換を誘導できるか検証した。得られたTS様細胞（iTSC細胞）の遺伝子発現、タンパク質発現、エピゲノム状態を検証し、完全なTS細胞に分化転換を誘導できたか検証した。

4. 研究成果

- (1) EGAM1タンパク質群による多能性の獲得機構について解析する。
- 1) マウス iPS 細胞の誘導における、当該タンパク質群の機能を詳細に解析する必要がある。そこで、従来より知られている Tet システムに加え、Cumate システムにより作出したマウス iPS 細胞（CumiPS 細胞）について、胚様体形成法により三胚葉への分化能を検証した。その結果、複数の分化マーカー遺伝子とタンパク質の発現を検証したところ、三胚葉への分化能を示すことを実証した（Sato, Kobayashi ら, Anal Biochem 2020）。
- 2) マウス iPS 細胞の誘導における、当該タンパク質群の影響を検証した。山中 4 因子に当該タンパク質群を 1 種ずつ加え、マウス線維芽細胞に同時に遺伝子導入し、iPS 細胞の誘導効率を比較した。その結果、対照（山中 4 因子+コントロールベクター）に比較して、EGAM1N 発現ベクターまたは EGAM1C 発現ベクターを同時に遺伝子導入した場合、iPS 細胞の誘導効率が有意に向上した。すなわち、当該タンパク質群は、多能性の獲得を促進することが示された。また、ウシ iPS 細胞の誘導における当該タンパク質群の効果を検証するため、ウシ iPS 細胞の誘導に必要な遺伝子群と発現ベクターを構築した。
- 3) ウシ線維芽細胞にマウスやヒト iPS 細胞誘導遺伝子群（既知）を遺伝子導入することにより、ウシ iPS 細胞が誘導できるか検討した。その結果、マウス iPS 細胞に比較して、誘導効率は非常に低いことが判明した。すなわち、ウシ iPS 細胞の場合、マウスやヒト iPS 細胞の誘導遺伝子群では作出が困難であると考えられる。ウシ iPS 細胞を作出する系は、当該タンパク質群と多能性獲得機構の関連を検証する上で非常に有効であるので引き続き検討する必要がある。また、2018 年に報告されたウシ ES 細胞の作出法（Bogliotti ら, PNAS 2018）により、ウシ ES 様細胞を得られるこ

とが判明した。ウシ ES 細胞の樹立と当該遺伝子群の関連を検証する実験系として非常に有効である。

(2) EGAM1 ホメオタンパク質群と組織形成との関連について、*in vitro* 胎盤形成モデル系を構築することにより解明する。

- 1) ES 細胞は、胎盤形成に重要な転写因子を強制発現させない限り、胎盤幹 (TS) 細胞に分化転換できないことが知られている。これまでの研究成果により、EGAM1N もしくは EGAM1C を強制発現させた ES 細胞から TS 細胞に酷似した細胞 (分化転換 TS 細胞, iTS 細胞) が得られている。一方, iTS 細胞は継代培養することができないため, 細胞特性を詳細に調べることができなかった。そこで, 得られた iTS 細胞の培養条件を検討した。その結果, Wnt シグナル阻害剤 XAV939 とアクチビン A , FGF4 を添加した培養液を用いることにより, 継代培養することに成功した。
- 2) iTS 細胞の胎盤構成細胞への分化能を検証した。その結果, 栄養膜巨細胞, 海綿状栄養膜細胞, 迷路層栄養膜細胞のマーカー遺伝子の発現が大きく誘導されることが判明した。すなわち, 分化転換 TS 細胞は, 胎盤細胞への分化能を保持すると考えられる。
- 3) iTS 細胞の DNA メチル化状態について検証した。その結果, Nanog 遺伝子, Oct4 遺伝子について, マウス胚盤胞から樹立した TS 細胞とほぼ同一な DNA メチル化状態にあることが示唆された。すなわち, EGAM1 ホメオタンパク質群は, マウス ES 細胞から TS 細胞を誘導できる転写因子である可能性がある。すなわち, マウスの初期発生において, EGAM1 ホメオタンパク質群は胎盤細胞の形成に関与する, 重要な転写因子であると考えられる。ただし, TS 細胞の成立を示す, Elf5 遺伝子のメチル化状態については引き続き検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kumagai Yuki, Kikuchi Takahiro, Nonaka Asumi, Hiraide Misuzu, Sato Suguru, Sakuraoka Mizuki, Sasaki Akira, Kobayashi Masayuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Site-directed mutagenesis of cysteine to serine residues affects heparin binding and mitogenicity in fibroblast growth factor 4 produced in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology & Biotechnological Equipment	6. 最初と最後の頁 498 ~ 503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13102818.2019.1590161	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 Sato Suguru, Kikuchi Takahiro, Nishimura Yuka, Yugami Yoshimi, Sakuraoka Mizuki, Kita Yuto, Fukuda Tomokazu, Kobayashi Masayuki	4. 巻 599
2. 論文標題 Generation of mouse iPS cells using an inducible expression of transgenes via the cumate gene-switch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113748 ~ 113748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2020.113748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井美里, 西村優花, 喜多悠斗, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS細胞の安定した未分化状態維持ができる培養条件の開発
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井美里, 西村優花, 喜多悠斗, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS細胞から始原生殖細胞への分化誘導の試み
3. 学会等名 第71回 東北畜産学会宮城大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村優花, 喜多悠斗, 藤井美里, 小林正之
2. 発表標題 神経幹細胞様の特性を持つウシiPS細胞の作出
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村優花, 佐藤卓, 菊地貴裕, 桜岡みづき, 喜多悠斗, 湯上佳美, 小林正之
2. 発表標題 Cumate誘導型遺伝子発現調節システムを応用したマウスiPS細胞の作出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多悠斗, 平出美鈴, 西村優花, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS細胞の未分化状態維持に適した培養条件に関する検討
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多 悠斗, 西村 優花, 小林 正之
2. 発表標題 ウシES細胞の樹立培養 (Bogliotti et al., 2018) を応用したウシiPS細胞の作出
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 優花, 喜多 悠斗, 横尾 正樹, 小林 正之
2. 発表標題 Bogliottiらの方法 (2018) によるウシES様細胞樹立の試み
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多悠斗, 平出美鈴, 桜岡みづき, 西村優花, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS細胞の未分化状態維持に適した培養条件に関する検討
3. 学会等名 日本畜産学会第127回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜岡みづき, 佐藤梓織, 喜多悠斗, 小林正之
2. 発表標題 EGAM1ホメオタンパク質群によるマウスES細胞から胎盤幹細胞への分化転換とエピゲノム就職との関連
3. 学会等名 日本畜産学会第127回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村優花, 佐藤卓, 桜岡みづき, 喜多悠斗, 湯上佳美, 小林正之
2. 発表標題 Cumate誘導型の遺伝子発現調節システムを応用したマウスiPS細胞の樹立
3. 学会等名 日本畜産学会第127回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田智一, 片山雅史, 谷哲弥, 小林正之
2. 発表標題 All in oneトランスポゾンベクターを用いたブタiPS細胞の樹立と生物学的解析
3. 学会等名 日本畜産学会第127回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多悠斗, 平出美鈴, 桜岡みづき, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS様細胞における遺伝子発現に関する研究
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桜岡みづき, 佐藤梓織, 喜多悠斗, 小林正之
2. 発表標題 EGAM1ホメオタンパク質群と栄養外胚葉関連遺伝子群との関連, 遺伝子発現およびDNAメチル化の解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜多悠斗, 平出美鈴, 桜岡みづき, 小林正之
2. 発表標題 ウシiPS細胞様細胞の分化多能性に関する研究
3. 学会等名 第69回東北畜産学会山形大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桜岡みづき, 佐藤梓織, 喜多悠斗, 小林正之
2. 発表標題 EGAM1ホメオタンパク質群と胎盤前駆細胞の形成との関連に関する研究
3. 学会等名 第69回東北畜産学会山形大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

makoba.Lab@APU http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/biochem/makoba/index.html

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

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
---------	---------