

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580413

研究課題名(和文) EGAM1 タンパク質群による胎仔と胚体外組織の形成を制御する新たな分子基盤の研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating formation of the embryo proper and the extraembryonic tissues by EGAM1 homeoproteins

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たち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、EGAM1ホメオタンパク質群が有するそれぞれの機能について解明した。加えて、当該タンパク質群の構造と機能の関連について解明した。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前駆細胞群(胎仔前駆細胞・胎盤前駆細胞・卵黄嚢前駆細胞)の形成のみならず、心筋分化に例示される終末分化にも影響することが明らかになった。またEGAM1ホメオタンパク質群は、核に局在することにより転写因子として細胞機能を制御すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we found the structurally related homeoproteins in both preimplantation mouse embryos and mouse ES cells. To identify roles of EGAM1 homeoproteins on embryogenesis, mouse ES cells stably expressing respective EGAM1 homeoproteins were generated. Upon exogenous expression in mouse ES cells, these homeoproteins can act as positive or negative regulators of differentiation, cell growth, and induction of gene expression involved in specific cellular functions of differentiated cell types. EGAM1 homeoproteins not only affect the generation of progenitor cells that arise during early embryogenesis, but also the progression of terminal differentiation, such as cardiomyogenesis, in mouse ES cells. Because EGAM1 homeoproteins are localized to the nuclei of mouse ES cells, it is probable that these proteins act as transcription factors. These results suggest that EGAM1 homeoproteins are crucial for progression of embryogenesis.

研究分野：動物分子生殖生理学

キーワード：繁殖 ES細胞 初期胚 発生 転写因子 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

マウス胚において、最初の細胞分化は受精3日後の桑実胚で開始し、4日後の胚盤胞では内部細胞塊（胎仔前駆細胞）と栄養外胚葉（胎盤前駆細胞）が形成される。5日後には、内部細胞塊から原始内胚葉（卵黄囊前駆細胞）が分化する。胚の正常な着床と妊娠維持には、胎仔と胚体外組織（胎盤と卵黄囊）の形成を担う転写因子群が重要である。これまでに内部細胞塊を培養して得た ES 細胞を用い、細胞分化に関与する重要な転写因子（OCT4, NANOG など）が発見された。しかし、それぞれの胚葉や組織の形成は複雑な過程を経ることは判っているが、それぞれの素過程を担う転写因子や、転写因子の活性を調節する補助因子の多くは不明である。

そこで私たちは、最初の細胞分化が開始する桑実胚そのものから新規転写因子を同定することを考案した。その結果、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（Saito, Kobayashi *et al.*, Biol Reprod 2010）。マウス胚盤胞から樹立される幹細胞（ES 細胞, 胎盤幹細胞, 卵黄囊幹細胞）では、3 種の mRNA は三種三様の独特な発現パターンを示すことがわかり、当該タンパク質群とそれぞれの幹細胞がもつ特性との関連が示唆された。全く予期せぬことに、EGAM1 は目で強く発現すること、分娩直前の胎盤で EGAM1C 発現量が急激に高まり、妊娠の維持や泌乳を調節する胎盤性ホルモン遺伝子群の発現が促進されることを発見した（Saito, Kobayashi *et al.*, Reproduction 2011）。しかし、EGAM1 ホメオタンパク質群が有するそれぞれの機能については、その多くが不明であった。

2. 研究の目的

EGAM1 ホメオタンパク質群が有するそれぞれの機能について解明する。加えて、当

該タンパク質群の構造と機能の関連について解明する。これにより、子宮への家畜胚やヒト胚の着床の安定化、その後の流産防止や不妊治療へと展開するための基盤を固める。

3. 研究の方法

(1) 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。EGAM1 ホメオタンパク質群それぞれを個別に、恒常的に発現するマウス ES 細胞を開発し、ES 細胞の未分化状態の維持、細胞分化、また、これらに関連する遺伝子発現、タンパク質発現について解析した。

(2) 開発した遺伝子組換えマウス ES 細胞を用い、EGAM1 ホメオタンパク質群により発現量が変動する mRNA を DNA マイクロアレイ法により網羅的に同定し、当該タンパク質群の直接的な標的遺伝子（候補）のカタログを作成した。

(3) EGAM1 ホメオタンパク質群の特性を明らかにするために、細胞内における当該タンパク質群の局在部位について検証した。

(4) マウス胚の発生における EGAM1 ホメオタンパク質群の機能を明らかにするために、アンチセンスモルフォリノオリゴを使った標的 mRNA 発現のノックダウンマウス胚を作製するための基盤技術を開発した。

(5) EGAM1 ホメオタンパク質群と結合する転写因子群を探索するために、GST プルダウン法を適用した。

4. 研究成果

(1) EGAM1 は、原始内胚葉への分化を促進することが明らかになった。未分化状態の維持培養において、EGAM1N および EGAM1C とともに、マウス ES 細胞の未分化状態を安定化した。また、細胞増殖を促進すると共に、細胞死を抑制した。レチノイン酸分化誘導においては、EGAM1N および EGAM1C とともに、分化を抑制した。さらに、EGAM1N および EGAM1C とともに、胚発生の初期段階のみならず、心筋分化に例示される終末分化にも影響することを示

した。

(2) 当該タンパク質群を強制的に発現させたマウス ES 細胞株を樹立し、それぞれから調製した cDNA、および対照 ES 細胞から調製した cDNA を用いてマイクロアレイ分析に供した。その結果、mRNA 発現量が変化する多数の遺伝子を同定することに成功した。

(3) EGAM1 ホメオタンパク質群が核に局在すること、C 末端側のホメオドメイン内に核移行シグナルが存在すること、核移行には適切なタンパク質コンフォメーションの維持が重要であることを明らかにした。すなわち、EGAM1 ホメオタンパク質群が核に局在することにより、転写因子として細胞機能を制御すると考えられる。

(4) FITC 標識モルフォリノオリゴと遺伝子導入試薬 Endo-Porter をマウス初期胚と保温したところ、3 時間以内に効率的に細胞内に取り込まれることが判明した。この技術を応用して、遺伝子破壊法により胚発生において既にその重要性が確立している *Oct4* 遺伝子の発現阻害を試みた。アンチセンス *Oct4* モルフォリノオリゴをマウス初期胚に導入したところ OCT4 タンパク質産生が大きく減弱し、その結果として胚発生が阻害されることが判明した。この表現型は、既に報告されている *Oct4* 遺伝子破壊胚の表現型によく一致する。すなわち、アンチセンスモルフォリノオリゴ法による遺伝子ノックダウン技術により、遺伝子破壊法と比較して格段に簡便に、胚発生における EGAM1 ホメオタンパク質群の機能を解明できる見通しが立った。

(5) EGAM1 ホメオタンパク質群と結合する転写因子群を探索するために、GST 融合 EGAM1 ホメオタンパク質群と結合する多能性維持転写因子を探索した。その結果、OCT4・NANOG・SOX2 をその候補として見出すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

[CA]は責任著者を示す。

1. Sato Shiori, Nakazawa M., Kihara Y., Kubo Y., Sato Yuki, Kikuchi T., Nonaka A., Sasaki

A., Iwashita J., Murata J., Hosaka M. and **Kobayashi M.** [CA] (2015): Partial inhibition of differentiation associated with elevated protein levels of pluripotency factors in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1N homeoprotein. 査読有, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120: 562-569. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.001

2. Leslie J., Huang S., Opp J., Nagy M., **Kobayashi M.**, Young V., and Spence J. (2015): Persistence and toxin production by *Clostridium difficile* within human intestinal organoids results in disruption of epithelial paracellular barrier function. 査読有, *Infection and Immunity*, 83: 138-145. DOI: 10.1128/IAI.02561-14.

3. Sugawara S., Ito T., Sato Shiori, Sato Yuki, Sasaki A., Fukuda T., Yamanaka K., Sakatani M., Takahashi M. and **Kobayashi M.** [CA] (2015): Generation of aminoterminally truncated, stable types of bioactive bovine and porcine fibroblast growth factor 4 in *Escherichia coli*. 査読有, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62: 164-172. DOI: 10.1002/bab.1251

4. Donai K., Inagaki A., So K-H., Kuroda K., Sone H., **Kobayashi M.**, Nishimori K. and Fukuda T. (2015): Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. 査読有, *Cytotechnology*, 67: 191-197. DOI: 10.1007/s10616-013-9686-8

5. Tomotsune K., Kasuga K., Tsuchida M., Shimura Y., **Kobayashi M.**, Agematsu H., Ikeda H., Ishikawa J., and Kojima I. (2014): Cloning and sequence analysis of the cellulase genes isolated from two cellulolytic Streptomyces and their heterologous expression in *Streptomyces lividans*. 査読有,

International Journal of the Society of Materials Engineering for Resources, 20: 213-218

6. Sugawara S., Ito T., Sato Shiori, Sato Yuki, Kasuga K., Kojima I. and **Kobayashi M. [CA]** (2014): Production of an aminoterminally truncated, stable type of bioactive mouse fibroblast growth factor 4 in *Escherichia coli*. 査読有, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117: 525-530.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.10.009

7. Sugawara S., Ito T., Sato Shiori, Sato Yuki, Kasuga K., Kojima I. and **Kobayashi M. [CA]** (2014): Identification of site-specific degradation in bacterially expressed human fibroblast growth factor 4 and generation of an aminoterminally truncated, stable form. 査読有, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172: 206-215.

DOI: 10.1007/s12010-013-0544-0

8. Donai K., Kuroda K., Guo Y., So K-H., Sone H., **Kobayashi M.**, Nishimori K. and Fukuda T. (2013): Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. 査読有, *Analytical Biochemistry*, 443: 104-112.

DOI: 10.1016/j.ab.2013.08.014

9. Shioya T., Nakamura H., Ishii N., Takahashi N., Sakamoto Y., Ozaki N., **Kobayashi M.**, Okano K., Kamada T. and Muraguchi H. (2013): The *Coprinopsis cinerea* septin Cc.Cdc3 is involved in stipe cell elongation. 査読有, *Fungal Genetics and Biology*, 58-59: 80-90.

DOI: 10.1016/j.fgb.2013.08.007

10. Sato Sho, Morita S., Iha M., Mori Y., Sugawara S., Kasuga K., Kojima I., Ozaki N., Muraguchi H., Okano K., Iwashita J., Murata J., Hosaka M. and **Kobayashi M. [CA]** (2013): Intact structure of EGAM1

homeoproteins and basic amino acid residues in the common homeodomain of EGAM1 and EGAM1C contribute to their nuclear localization in mouse embryonic stem cells. 査読有, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116: 141-146.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.007

11. Sugawara S., Ito T., Sato Sho, Yokoo Mari, Mori Y., Kasuga K., Kojima I., Fukuda T., Yamanaka K., Sakatani M., Takahashi M. and **Kobayashi M. [CA]** (2013): Production of bioactive bovine fibroblast growth factor 4 in *E. coli* based on the common nucleotide sequence of its structural gene in three breeds. 査読有, *Animal Science Journal*, 84: 275-280.

DOI: 10.1111/asj.12036

12. Kasuga K., Nitta A., **Kobayashi M.**, Habe H., Nojiri H., Yamane H., Omori T. and Kojima I. (2013): Cloning of *dfdA* genes from *Terrabacter* sp. strain DBF63 encoding dibenzofuran 4,4a-dioxygenase and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. 査読有, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 4485-4498.

DOI: 10.1007/s00253-012-4565-3

13. Sugawara S., Ito T., Suzuki H., Takahashi T., Konishi J., Kobayashi Masaki, Sato Sho, Mori Y., Kasuga K., Kojima I., Fukuda T. and **Kobayashi M. [CA]** (2013): 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*. 査読有, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77: 173-177.

DOI: 10.1271/bbb.120698

14. Saito K., Abe H., Nakazawa M., Irokawa E., Kasuga K., Kojima I., Murata J. and **Kobayashi M. [CA]** (2012): Ontogenic expression patterns of transcripts encoding EGAM1 homeoproteins during murine

organogenesis. 査読有, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26: 3321-3323.

DOI: 10.5504/bbeq.2012.0079

15. Iha M., Soma M., Sato Sho, Mori M., Sugawara S., Kasuga K., Kojima I., Yamada S., Sakaki S. and **Kobayashi M. [CA]** (2012): Severe inhibition of *in vitro* cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells ectopically expressing EGAM1C homeoprotein. 査読有, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 1410-1412.

DOI: 10.1271/bbb.120146

16. Soma M., Iha M., Kihara Y., Sato Shiori, Sato Yuki, Sato Sho, Mori Y., Sugawara S., Kasuga K., Kojima I. and **Kobayashi M. [CA]** (2012): Preferential emergence of cell types expressing markers for primitive endoderm lineages in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1 homeoprotein. 査読有, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114: 342-346.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.04.012

17. Iha M., Watanabe M., Kihara Y., Sugawara S., Saito K., Soma M., Sato Sho, Mori Y., Kasuga K., Kojima I., Sasamura R., Murata J. and **Kobayashi M. [CA]** (2012): Effect of ectopic expression of homeoprotein EGAM1C on the cell morphology, growth, and differentiation in a mouse embryonic stem cell line, MG1.19 cells. 査読有, *Reproduction*, 143: 477-489.

DOI: 10.1530/REP-11-0379

18. Sato Sho, Takahashi T., Nishinomiya H., Katoh M., Itoh R., Yokoo Masaki, Yokoo Mari, Iha M., Mori Y., Kasuga K., Kojima I. and **Kobayashi M. [CA]** (2012): Common nucleotide sequence of structural gene encoding fibroblast growth factor 4 in eight cattle derived from three breeds. 査読有, *Animal Science Journal*, 83: 260-262.

DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.01000.x

[学会発表] (計 11 件)

1. 熊谷 友希, 菊地 貴裕, 野中 愛純, 佐々木 玲, 高橋 利清, 小林 正之, FGF4 により, 初期胚に含まれる胎盤前駆細胞の形成を促進する: 構造と生物活性の関連, 第 121 回日本畜産学会, 日本獣医生命科学大学, 東京都武蔵野市, 平成 28 年 3 月 27 日.

2. 菊地 貴裕, 野中 愛純, 熊谷 友希, 佐々木 玲, 福田 智一, 小林 正之, マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1C による iPS 細胞の樹立促進効果, 第 121 回日本畜産学会大会, 日本獣医生命科学大学, 東京都武蔵野市, 平成 28 年 3 月 27 日.

3. 野中 愛純, 菊池 貴裕, 熊谷 友希, 佐々木 玲, 小林 正之, マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1N は, 転写因子 NANOG とヘテロ複合体を形成する, 第 121 回日本畜産学会大会, 日本獣医生命科学大学, 東京都武蔵野市, 平成 28 年 3 月 27 日.

4. 熊谷 友希, 菊地 貴裕, 野中 愛純, 佐々木 玲, 小林 正之, 動物胚の受胎率向上を目指した遺伝子組換え FGF4 の開発: 生物活性に重要な領域の同定のための N 末端短縮型マウス FGF4 の生産, 第 108 回日本繁殖生物学会, 宮崎大学, 宮崎県宮崎市, 平成 27 年 9 月 17 日.

5. 菊地 貴裕, 野中 愛純, 熊谷 友希, 佐々木 玲, 福田 智一, 小林 正之, EGAM1 ホメオタンパク質群の共発現がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響, 第 108 回日本繁殖生物学会大会, 宮崎大学, 宮崎県宮崎市, 平成 27 年 9 月 17 日.

6. 野中 愛純, 吉田 美智子, 菊池 貴裕, 熊谷 友希, 佐々木 玲, 小林 正之, ホメオタンパク質 EGAM1N の強制発現がマウス ES 細胞の心筋分化に与える影響, 第 108 回日本繁殖生物学会大会, 宮崎大学, 宮崎県宮崎市, 平成 27 年 9 月 17 日.

7. 菊地 貴裕, 佐藤 梓織, 佐藤 由貴, 野中 愛純, 佐々木 玲, 土内 憲一郎, 福田 智一, 小林 正之, ウシ iPS 細胞樹立への応用を目指したマウス iPS 細胞樹立システムの構築, 第 119 回 日本畜産学会大会, 宇都宮大学, 栃木県宇都宮市, 平成 27 年 3 月 29 日.

8. 佐藤 梓織, 佐藤 由貴, 菊地 貴裕, 野中 愛純, 佐々木 玲, 小林正之, EGAM1N および EGAM1C によりマウス ES 細胞の細胞運命を転換する, 第 119 回 日本畜産学会大会, 宇都宮大学, 栃木県宇都宮市, 平成 27 年 3 月 29 日.

9. 野中 愛純, 佐藤 梓織, 佐藤 由貴, 菊池 貴裕, 小林 正之, EGAM1N ホメオタンパク質はマウスの発生過程において重要な転写因子と会合する, 第 119 回 日本畜産学会大会, 宇都宮大学, 栃木県宇都宮市, 平成 27 年 3 月 29 日.

10. 佐藤 由貴, 佐藤 梓織, 菊池 貴裕, 野中 愛純, 佐々木 玲, 小林 正之, アンチセンス *Oct4* MO を用いることによる遺伝子ノックダウン効果の検証, 第 119 回 日本畜産学会大会, 宇都宮大学, 栃木県宇都宮市, 平成 27 年 3 月 29 日.

11. 菊地 貴裕, 野中 愛純, 佐藤 梓織, 佐藤 由貴, 小林 正之, EGAM1 ホメオタンパク質群とマウス iPS 細胞の誘導との関連に関する研究: マウス iPS 細胞誘導ベクターの構築, 第 107 回 日本繁殖生物学会大会, 帯広畜産大学, 北海道帯広市, 平成 26 年 8 月 21 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞増殖促進タンパク質の製造方法
および安定型細胞増殖促進タンパク質

発明者: 小林正之, 菅原彩子

権利者: 秋田県立大学

種類: 特許

番号: 特開 2014-33631 号

出願年月日: 平成 24 年 8 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/biochem/makoba/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: