

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

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*

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

秋田県秋田市下新城野 〒010-0195

2010 年 11 月 15 日 受理

要 約

マウス胚盤胞の内部細胞塊より胚性幹細胞 (ES 細胞), 栄養外胚葉より栄養膜幹細胞 (TS 細胞), 原始内胚葉より胚体外内胚葉細胞 (XEN 細胞) が樹立される。これらの幹細胞は由来する細胞の特徴をよく維持している。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 ホメオドメインタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した。現在までに, これらの mRNA は ES 細胞において発現していること, ES 細胞の未分化状態の維持および細胞分化に関与することが判明している。本研究では, マウス ES 細胞株 EB3 細胞, マウス TS 細胞株 TS7 細胞およびマウス XEN 細胞株 XEN26 細胞におけるこれらの mRNA 発現について定量 RT-PCR により検討した。その結果, 分化誘導した EB3 細胞における発現量と比較して低いものの, TS7 細胞では *Egam1c* mRNA のみ, XEN26 細胞では *Egam1* mRNA のみの発現が検出された。また, *Egam1n* mRNA は EB3 細胞のみで検出された。これらの結果より, 胚盤胞から樹立される幹細胞であっても EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現パターンは異なることが示された。また, ES, TS および XEN 細胞の形成, 未分化状態の維持, または細胞分化に EGAM1 ホメオドメインタンパク質群の構成メンバーが関与する可能性が考えられる。

東北畜産学会報 60(3): 108 ~115. 2011

緒 言

マウス初期胚における最初の細胞分化は, 受精後約 2.5 日の 8 細胞期から受精後約 3 日の桑実期にかけて開始する⁴⁾。早期胚盤胞 (受精後約 3.5 日) 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 (受精後約 4.5 日) までに卵黄嚢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¹⁷⁾。一方, 内部細胞塊からは胚性幹細胞 (embryonic stem cells, ES 細胞²⁾), 栄養外胚葉からは栄養膜幹細胞 (trophoblast

stem cells, TS 細胞¹⁶⁾), 原始内胚葉からは胚体外内胚葉細胞 (extra-embryonic endoderm cells: XEN 細胞⁶⁾) が樹立できることが報告された。すなわち, マウス胚盤胞から 3 種の幹細胞を樹立することができる。

マウス ES 細胞の未分化状態は, 白血球阻害因子 (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。培養液から LIF を除去した場合 (-LIF 分化誘導), 胎仔を構成する種々の細胞へ分化が誘導される。マウス TS 細胞の未分化状態は, 線維芽細胞増殖因子-4 (FGF4) とマウス胎仔線維芽細胞培養上清 (MEFCM) により維持することができる¹⁶⁾。FGF4 および MEFCM 非添加培養 (-FGF4-MEFCM 分化誘導) することにより, 胎盤構成細胞である栄養膜巨細胞や海綿状栄養膜細胞などへ分化する。一方, マウス XEN 細胞は MEFCM を培養液に添加することにより未分化状

* 連絡者: 小林 正之
(秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科)
秋田県秋田市下新城野 〒010-0195
Tel: 018-872-1596 Fax: 018-872-1676
E-mail makoba@akita-pu.ac.jp

態が維持されるが⁶⁾, MEFCM 非添加培養 (-MEFCM 分化誘導) により卵黄囊構成細胞である臓側内胚葉へ分化誘導することができる。内部細胞塊および ES 細胞の未分化状態の維持には、ホメオドメイン転写因子 OCT4 が重要であることがよく知られている⁸⁾。また栄養外胚葉および TS 細胞の形成と維持にはホメオドメイン転写因子 CDX2¹²⁾, 原始内胚葉および XEN 細胞の形成と維持には Zn フィンガー転写因子 GATA6¹⁴⁾ が関与している。桑実期および胚盤胞期では、胎仔と胚体外組織(胎盤・卵黄囊)を形成してその後の着床と妊娠を正常に維持するために、未分化状態の維持や細胞分化を誘導する遺伝子群が発現しているため非常に重要な時期である。しかし、ここに例示したようにいくつかの転写因子群の関与が報告されたもの⁹⁾, 多くの段階から構成される胎仔と胚体外組織の形成過程を描く全体像の理解はいまだ不十分である。

我々はこれまでに、胎仔と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 48 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し、EGAM1 (Expressing gene at morula stage-1) ホメオドメインタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した¹³⁾。Egaml 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、Egamln mRNA は Egaml 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、Egamlc 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 細胞を用いた発現および機能解析により、EGAM1 ホメオドメインタンパク質群は ES 細胞の未分化状態の維持および細胞分化に関与することが示されている¹³⁾。しかし、mRNA 発現の定量的な解析は行われていない。一方、ES 細胞と同様にマウス胚盤胞から樹立される TS 及び XEN 細胞の細胞分化と EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現との関連については不明である。

そこで本研究では、代表的なマウス ES 細胞株である EB3 細胞¹⁰⁾, 我々が樹立したマウス TS 細胞株 TS7 細胞¹⁸⁾, 同様に我々が樹立したマウス XEN 細胞株 XEN26 細胞¹⁸⁾ における EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現について定量的に検討した

材料および方法

1. マウス ES, TS, XEN 細胞の継代培養および分化誘導

マウス ES 細胞株 EB3 細胞の継代培養および分化

誘導は、既報^{13, 15)} に基づいて行った。なお、EB3 細胞はフィーダー細胞を必要としない ES 細胞株である¹⁰⁾。10% ウシ胎仔血清 (FCS, ES 細胞用, Biological Industries) および遺伝子組換えヒト LIF (自家製) を添加した Glasgow modified Eagle's medium (GMEM, Sigma) (+LIF 培養液) を用い、EB3 細胞を 0.1% ゼラチン (Sigma) 処理ディッシュ (Greiner) に播種し (3×10^5 cells/ ϕ 10 cm), 3 日間隔で継代培養 (37°C, 5% CO₂) した。-LIF 分化誘導は、10%FCS 添加 GMEM (LIF 非添加) を用いて EB3 細胞を 0.1% ゼラチン処理ディッシュに播種し (6×10^4 cells/ ϕ 10 cm), 7 日間培養することにより行った。また -LIF+RA 分化誘導は、10%FCS および 10^{-6} M レチノイン酸 (RA, Sigma) 添加 GMEM を用いて EB3 細胞を 0.1% ゼラチン処理ディッシュに播種し (6×10^5 cells/ ϕ 10 cm), 5 日間培養することにより行った。

マウス TS7 細胞およびマウス XEN26 細胞の継代培養および分化誘導は、既報¹⁸⁾ に基づいて行った。TS7 細胞の分化誘導は -FGF4-MEFCM 分化誘導を 8 日間、XEN26 細胞の分化誘導は -MEFCM 分化誘導を 6 日間行った。

なお、いずれの幹細胞においても分化誘導後に継代培養は行わなかった。

2. 遺伝子発現の解析

Acid guanidinium phenol-chloroform 法により total RNA を抽出した⁵⁾。DNase I (ニッポンジーン) 処理後、逆転写酵素 (ReverTraAce, 東洋紡) と oligo dT₂₀ プライマー: ランダム (N9) プライマーミックス (1:10) を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) を用いて定量 RT-PCR を行った。pGEM-T easy vector (Promega) にそれぞれの cDNA 断片を組み込み、定量 RT-PCR のスタンダードとして用いた。また、定量 RT-PCR プライマーの塩基配列は Table 1 に示した。既報^{6, 7, 16)} に基づき、代表的な ES 細胞マーカーとして *Oct4*, 分化 ES 細胞マーカーとして *Gata6*, TS 細胞マーカーとして *Cdx2*, 分化 TS 細胞マーカーとして *Tpbpa*, 分化 XEN 細胞マーカーとして *Afp* を用いた。なお、分化誘導に伴って発現量が低下する代表的な XEN 細胞マーカー遺伝子は報告されていない。また、ハウスキープ遺伝子 Hydroxymethylbilane synthase (*Hmbs*) の発現量も定量して各 mRNA の発現量を補正した。遺伝子発現量の差は Student の *t* 検定により比較した。

結果

1. EB3, TS7 および XEN26 細胞の分化誘導前後における形態変化

+LIF 培養した EB3 細胞は、典型的な未分化 ES 細胞コロニーである、細胞間が緊密に接着したコンパクトコロニーを形成する (Fig. 1A)。EB3 細胞を分化誘導した

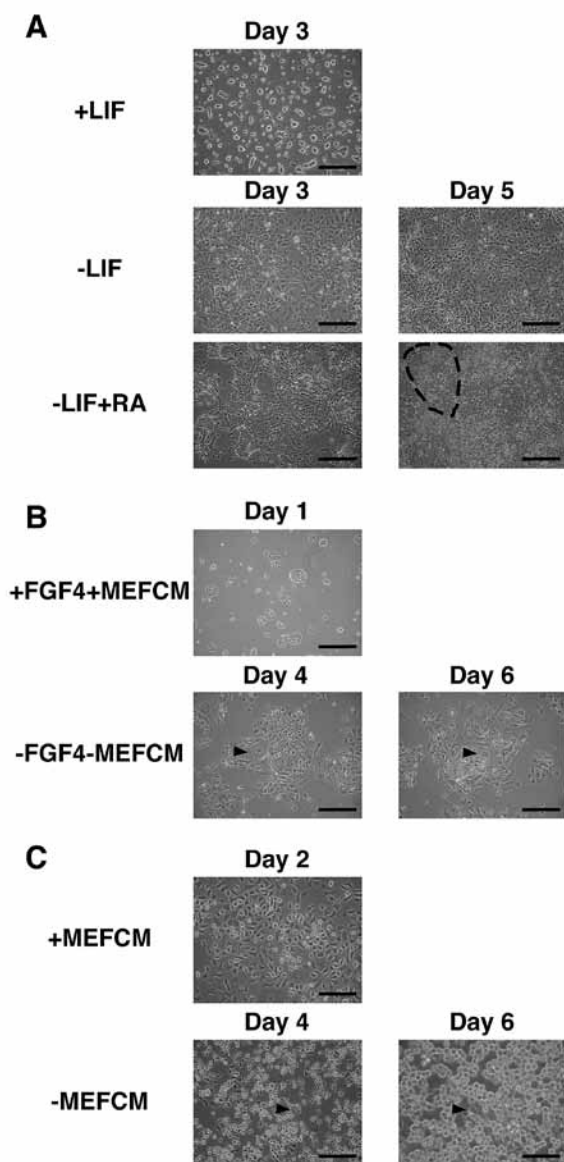


Fig. 1. Morphological changes in undifferentiated and differentiating EB3, TS7 and XEN26 cells.

(A) Feeder-free mouse ES cell line, EB3. Broken-lined area indicates a representative aggregated cell colony resembling undifferentiated ES cell colonies. (B) Mouse TS cell line, TS7 cells. Arrowhead indicates a representative trophoblast giant cell. (C) Mouse XEN cell line, XEN26 cells. Arrowhead indicates a representative vacuolated cell.

Representative morphologies are after cultivation under respective conditions. Scale bars, 200 μ m.

場合、分化誘導 3 日後には誘導方法 (-LIF, -LIF+RA) にかかわらず、培養皿に伸展した細胞コロニーが増加した。しかし -LIF+RA 分化誘導 5 日後、細胞間が緊密に接着した、コンパクトコロニーよりもやや扁平なコロニーが認められた。一方、TS7 細胞を分化誘導した場合 (Fig. 1B)、巨大な核と核周辺部に暗沈殿物が認められる栄養膜巨細胞数が増加する傾向が認められた。また XEN26 細胞を分化誘導した場合 (Fig. 1C)、卵黄囊構成細胞に見られる空胞を有する細胞数が増加する傾向が認められた。

2. EB3, TS7 および XEN26 細胞の分化誘導前後におけるマーカー遺伝子の発現

EB3 細胞における ES 細胞マーカー遺伝子 *Oct4* の発現量は (Fig. 2), -LIF 分化誘導 7 日後まで徐々に減少した ($P < 0.05$)。一方, -LIF+RA 分化誘導した場合, 分化誘導 3 日後には 36% まで減少したが ($P < 0.05$), その後は再び増加した。分化 ES 細胞マーカー遺伝子である *Gata6* 発現量は, -LIF+RA 分化誘導 3 日後には 76 倍に増加した ($P < 0.05$)。-LIF 分化誘導した ES 細胞においても分化誘導 5 日後以降に大きく増加した (38-54 倍, $P < 0.05$)。

TS7 細胞における TS 細胞マーカー遺伝子 *Cdx2* の発現量は, 分化誘導 4 日後に 20% 以下まで減少し ($P < 0.05$), 逆に, 分化誘導 4 日後には分化 TS 細胞マーカー遺伝子である *Tpbpa* 発現量は 7.4 倍に増加した ($P < 0.05$)。また XEN26 細胞においては, 分化誘導 6 日後には分化 XEN 細胞マーカー遺伝子 *Afp* の発現量は 7.9 倍に増加した ($P < 0.05$)。

3. EB3, TS7 および XEN26 細胞の分化誘導前後における EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現

未分化状態維持培養および分化誘導培養した EB3, TS7, XEN26 細胞における *Egam1*, *Egam1n* および *Egam1c* mRNA の発現について定量 RT-PCR により検討した。

Fig. 3 に示したように, EB3 細胞において *Egam1*, *Egam1n* および *Egam1c* mRNA が検出された。+LIF 培養した EB3 細胞 (Un) と比較して, -LIF+RA 分化誘導 5 日後の *Egam1* mRNA 発現量は 19 倍高かった ($P < 0.05$)。一方, -LIF 分化誘導 5 日後では 3.8 倍に増加する傾向が認められたが, その後は減少した。*Egam1n* mRNA 発現量は, +LIF 培養した EB3 細胞と比較して -LIF 分化誘導 7 日後では 7% まで徐々に減少した ($P < 0.05$)。一方, -LIF+RA 分化誘導した場合, *Egam1n* mRNA 発現量は分化誘導 2 日後まで低下したが ($P <$

0.05) その後は上昇に転じ、5日後には1.9倍に達した ($P < 0.05$)。この発現パターンは *Oct4* mRNA の発現パターンにはほぼ一致していた。+LIF 培養した EB3 細胞と比較して、-LIF+RA 分化誘導3日後の *Egam1c* mRNA 発現量は40倍に増加し ($P < 0.05$)、その後はやや減少した。しかし、-LIF 分化誘導における発現量の増加は全く認められなかった。

未分化状態維持 (+FGF4+MEFCM) 培養した TS7 細胞における *Egam1c* mRNA 発現量は、+LIF 培養した EB3 細胞の5.7倍であった (Fig. 4)。また、未分化状態維持 (+MEFCM) 培養した XEN26 細胞における *Egam1* mRNA 発現量は、+LIF 培養した EB3 細胞の2.4

倍であった。しかし -LIF+RA 分化誘導 (Day 5) した EB3 細胞における発現量と比較して、いずれの mRNA 発現量とも1/8倍以下であった。また、いずれの mRNA とも分化誘導後の発現量は低下した ($P < 0.05$)。なお、TS7 細胞では *Egam1* および *Egam1n*、XEN26 細胞では *Egam1n* および *Egam1c* の発現は検出されなかった (データ非提示)。

考 察

マウス ES 細胞を -LIF 分化誘導すると原始内胚葉、中胚葉、壁側内胚葉などの分化細胞が出現すること、ま

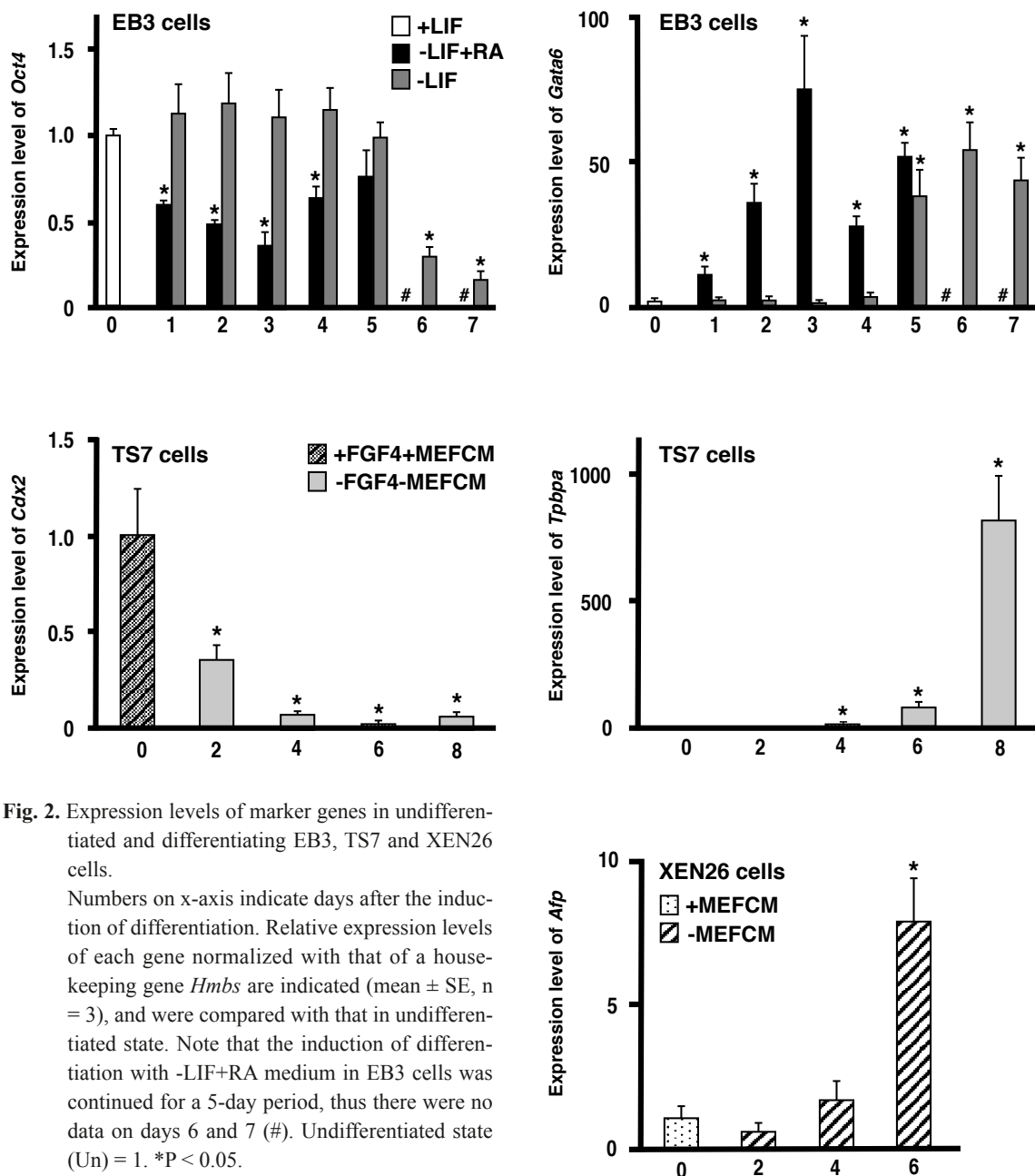


Fig. 2. Expression levels of marker genes in undifferentiated and differentiating EB3, TS7 and XEN26 cells.

Numbers on x-axis indicate days after the induction of differentiation. Relative expression levels of each gene normalized with that of a housekeeping gene *Hmbs* are indicated (mean \pm SE, n = 3), and were compared with that in undifferentiated state. Note that the induction of differentiation with -LIF+RA medium in EB3 cells was continued for a 5-day period, thus there were no data on days 6 and 7 (#). Undifferentiated state (Un) = 1. * $P < 0.05$.

た -LIF+RA 分化誘導した場合は原始内胚葉や神経外胚葉、壁側内胚葉、臓側内胚葉などの分化細胞が出現することが知られている^{3, 11, 13)}。我々がマウス初期胚より発見した EGAM1 ホメオドメインタンパク質群のうち、EGAM1 は ES 細胞から原始内胚葉への分化促進、また EGAM1N は ES 細胞の未分化状態の維持に参与することが示唆されている¹³⁾。一方、EGAM1C の機能は不明である。本研究では、マウス胚盤胞から樹立される3種の幹細胞の分化誘導前後における EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現について検討した。EB3 細胞、TS7 細胞および XEN26 細胞を分化誘導処理した後、既報^{6, 15, 16, 18)} によく一致した形態変化が認めら

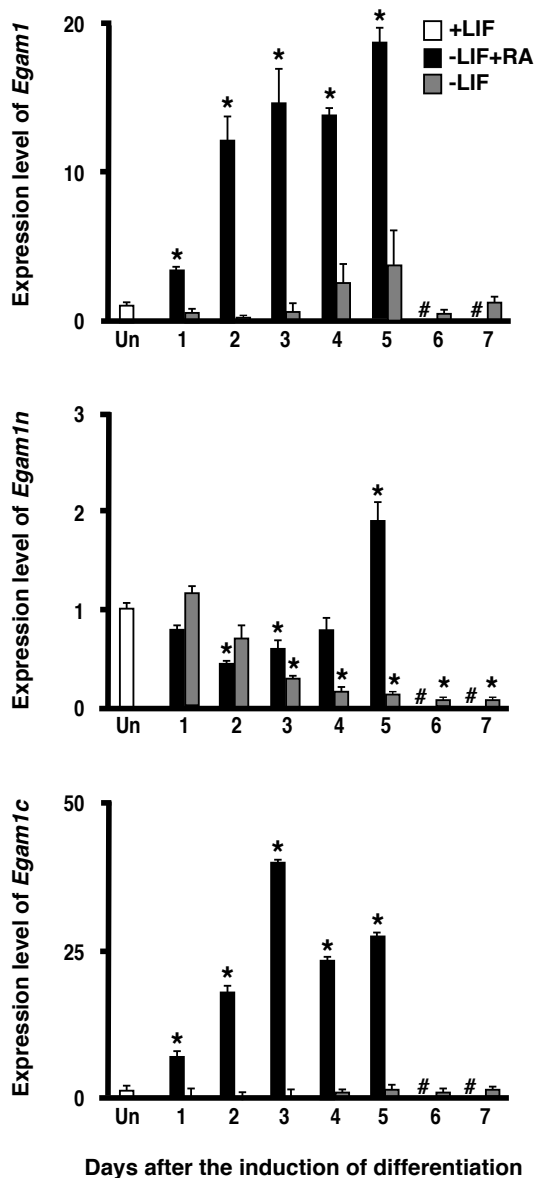


Fig. 3. Expression levels of mRNA for EGAM1 homeodomain proteins in undifferentiated and differentiating EB3 cells. Data are the mean \pm SE (n = 3). Undifferentiated state (Un) = 1. #; No data. *P < 0.05.

れたこと、代表的な分化マーカー遺伝子の発現量が増加したことから、これらの細胞が形態的、生化学的にも分化細胞を含むことが示された。以下では、これら未分化状態維持または分化細胞を含むことが示された幹細胞群における遺伝子発現について考察した。

従来、EB3 細胞における EGAM1 ホメオドメインタンパク質群 mRNA の発現については、+LIF 培養時、-LIF 分化誘導 7 日後、-LIF+RA 分化誘導 5 日後における定性的な発現パターンについてのみ判明していた¹³⁾。-LIF 分化誘導では *Egam1* mRNA 発現は低下するが、-LIF+RA 分化誘導では *Egam1* および *Egam1c* mRNA 発現は増加することが判明している。本研究により、分化誘導処理後の時間依存的、かつ定量的な mRNA 発現量の変化が明らかになった。特に、-LIF 分化誘導後の *Egam1* mRNA 発現パターン、-LIF+RA 分化誘導後の *Egam1n* と *Egam1c* mRNA 発現パターンは増加または減少の一方方向性ではなく、増減が認められることが明らかになった。既に判明している ES 細胞における EGAM1

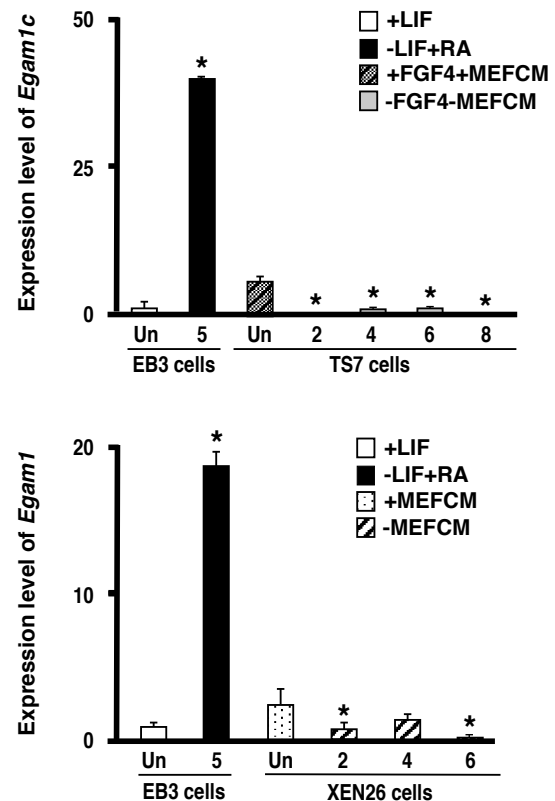


Fig. 4. Expression levels of mRNA for *Egam1* or *Egam1c* in undifferentiated and differentiating TS7 and XEN26 cells. Numbers on x-axis indicate days after the induction of differentiation. Expression levels of mRNA for *Egam1* or *Egam1c* in undifferentiated and differentiating (-LIF+RA, Day 5) EB3 cells depicted in Fig. 3 are also indicated. Data are the mean \pm SE (n = 3). Undifferentiated state (Un) = 1. *P < 0.05.

Table 1. Sequences of primers for real-time RT-PCR

Gene	Prime name	Primer sequence	Product size (bp)
<i>Hmbs</i>	HmbsF	5'-CCCTTGTGATGCTGTTGTCTTTCA-3'	168
	HmbsR	5'-AGGCGGGTGTGGAGGTTTCC-3'	
<i>Oct4</i>	Oct4F	5'-GCCGTGAAGTTGGAGAAGGTG-3'	196
	Oct4R	5'-CGAAGCGACAGATGGTGGTC-3'	
<i>Gata6</i>	Gata6F	5'-TCACCCGACCTACTCGCCCTACA-3'	177
	Gata6R	5'-TTCACGCACTCGCGGCTCTC-3'	
<i>Afp</i>	AfpF	5'-TGCAATGAAGAAAACCTCTGGCGATG-3'	199
	AfpR	5'-TGGAACCTGGAAGGGTGGGACAGA-3'	
<i>Cdx2</i>	Cdx2F	5'-CGGCTGGAGCTGGAGAAGGAG-3'	195
	Cdx2R	5'-CGGCTGGAGGCTGTTGTTG-3'	
<i>Tpbpa</i>	TpbpaF	5'-CCAGCACAGCTTTGGACATCAC-3'	218
	TpbpaR	5'-CGTCTCCTGGTCATTTTCGCTAC-3'	
<i>Egam1</i>	Egam1F	5'-TGCAGGCCACCAAGCTGGAA-3'	161
	Egam1R	5'-GGGCAACGGTCTGTCTCGAAGTG-3'	
<i>Egam1n</i>	Egam1nF	5'-ACCTTCTCTCTCCACAAAAG-3'	298
	Egam1nR	5'-CATTCTGCACCATTTCTGTCC-3'	
<i>Egam1c</i>	Egam1cF	5'-GCAGCAGCCTCGTGATGGAA-3'	525
	Egam1cR	5'-TCCGACTCTATGAATGCACGCTTTA-3'	

(分化促進) および EGAMIN (未分化状態維持) の機能より、これら mRNA 発現量の増減は細胞分化と何らかの関係があると考えられる。これまでの研究により、-LIF+RA 分化誘導後の *Egam1* mRNA 発現と臓内胚葉、神経外胚葉および神経関連のマーカー遺伝子発現との関連性が判明している¹³⁾。そこで今後は、siRNA を用いたそれぞれの mRNA 発現のノックダウン実験により、これら特定の分化細胞の出現に対する影響について検討する予定である。ただし、ES 細胞から分化した細胞より LIF が分泌されることが知られており、この LIF に刺激され、分化誘導処理後であっても残存していた ES 細胞が再び増殖することが指摘されている¹⁾。-LIF+RA 分化誘導 5 日後の EB3 細胞において、+LIF 培養時に観察されたコンパクトコロニーと形態的に類似したコロニーが観察されたが、このコロニーは未分化な ES 細胞から構成される可能性があると考えられる。すなわち、-LIF+RA 分化誘導処理 5 日後の ES 細胞は未分化な ES 細胞を含むこと、この未分化な ES 細胞において発現している *Egam1n* mRNA を検出していることが考えられる。実際に、-LIF+RA 分化誘導した EB3 細胞では *Egam1n* mRNA 発現パターンと ES 細胞マーカー遺伝子 *Oct4* の発現パターンがほぼ一致している。

-LIF+RA 分化誘導 (Day 5) した EB3 細胞と比較して発現量は低いものの、未分化状態維持 (+FGF+MEFCM) 培養した TS7 細胞では *Egam1c* mRNA のみ、未分化状態維持 (+MEFCM) 培養した XEN26 細胞では *Egam1* mRNA のみの発現が検出され、しかも分化誘導後にはどちらの発現量ともに低下した。未だ EGAMIC の機能は不明であるが、今後は栄養外胚葉、および栄養外胚葉から樹立される TS 細胞の形成や未分化状態の維持との関連について検討することを予定している。一方、XEN

細胞は原始内胚葉から樹立される幹細胞であるが、興味深いことに EGAM1 は ES 細胞から原始内胚葉への分化促進に関与することが示唆されている¹³⁾。これらのことは、EGAM1 は XEN 細胞の形成や未分化状態の維持にも関与する可能性を示している。また、XEN 細胞の細胞分化に伴って発現量が低下するマーカー遺伝子は報告されていないが、*Egam1* mRNA がその有力な候補になると考えられる。一方、TS7 細胞と XEN26 細胞では *Egam1n* mRNA は検出されなかった。すなわち 3 種の幹細胞の中では、EGAMIN は胎仔構成細胞の幹細胞である ES 細胞のみの未分化状態維持に重要であること、また、EGAMIN と TS および XEN 細胞の細胞機能との関連性は低いことを示している。

以上に示したように、本研究により、マウス初期胚から樹立される 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 の発現パターンが明らかになった。今後は、これらの幹細胞の形成と未分化状態の維持、およびマウスの発生過程における内部細胞塊、栄養外胚葉、原始内胚葉の形成と EGAM1 ホメオドメインタンパク質群の関連について検討する予定である。

謝 辞

マウス ES 細胞株 EB3 細胞、ヒト LIF 発現ベクターを分与いただいた丹羽仁史博士 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター) に深謝いたします。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

1. 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.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156. 1981.
3. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki J, Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev*, 16: 784-789. 2002.
4. Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell

- polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 15: 583-597. 2004.
5. 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.
 6. Kunath T, Arnaud D, Uy GD, Okamoto I, Chureau C, Yamanaka Y, Heard E, Gardner RL, Avner P, Rossant J. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development*, 132: 1649-1661. 2005.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134: 635-646. 2007.
 10. Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 22: 1526-1536. 2002.
 11. Niwa H, Miyazaki J, Smith A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24: 372-376. 2000.
 12. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell*, 123: 917-929. 2005.
 13. 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.
 14. Shimosato D, Shiki M, Niwa H. Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev Biol*, 7: 80. 2007.
 15. Smith A. Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tiss Cult Meth*, 13: 89-94. 1991.
 16. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, 282: 2072-2075. 1998.
 17. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*, 235: 2301-2314. 2006.
 18. 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. 東北畜産学会報, 60: 6-12. 2010.

Expression levels of mRNA for EGAM1 homeodomain proteins in three kinds of stem cells established from mouse blastocysts

Miki SOMA, Koichi SAITO, Yusuke HOSOI, Momoe IHA, Kano KASUGA,
Ikuo KOJIMA and Masayuki KOBAYASHI

Department of Biotechnology, Faculty 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)

Summary

Three kinds of stem cell lines, embryonic stem (ES) cells, trophoblast stem (TS) cells, and extra-embryonic endoderm (XEN) cells, can be established from the inner cell mass, trophectoderm, and primitive endoderm, respectively, in mouse blastocysts. These stem cells maintain the characteristics of their founder cells. Recently, we identified EGAM1 homeodomain proteins (EGAM1, EGAM1N, and EGAM1C) in preimplantation mouse embryos. The mRNA and its encoded proteins also expressed in mouse ES cells are capable of regulating the maintenance and/or differentiation of ES cells. In the present study, we analyzed the expression levels of the respective mRNA in undifferentiated and differentiating ES (EB3), TS (TS7), and XEN (XEN26) cells by real-time RT-PCR. In TS7 and XEN26 cells, the expression of *Egam1c* transcript and *Egam1* transcript, respectively, was detected at relatively low levels when compared to that in differentiating EB3 cells; however, other transcripts for *Egams* were under the threshold levels, indicating that the obvious expression of *Egam1n* transcript was observed only in EB3 cells. From these results, it was demonstrated that the expression patterns of mRNA for *Egams* during the course of differentiation in respective stem cells were quite different. These results also suggested that members of EGAM1 homeodomain proteins might play a role in the establishment, maintenance or differentiation of not only ES cells, but also TS and XEN cells.

Key words: EGAM1 homeodomain proteins, Embryonic stem cells, Extra-embryonic endoderm cells, Trophoblast stem cells, Gene expression