

EGAMI ホメオタンパク質群の強制発現および HDAC 阻害剤 Sodium butyrate 処理がマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞の遺伝子発現に与える影響

森 祐貴^{1*}・鈴木 敦子^{1*}・佐藤 匠¹・菅原 彩子¹・春日 和²・
小嶋 郁夫²・岩下 淳³・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, ³分子生物学研究室

秋田県秋田市下新城野 〒010-0195

2012年11月6日受付, 2012年11月26日受理

要 約

我々は、マウス初期胚およびES細胞において発現するEGAMIホメオタンパク質群(EGAMI, EGAMIN, EGAMIC)を発見した。初期胚のモデル細胞であるマウスES細胞において、EGAMIホメオタンパク質群の強制発現は未分化状態の維持および細胞分化に影響することが示されている。EGAMI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。一方、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の作用により脱アセチル化ヒストンが増加し、これによってクロマチン構造の一部が変化し、その近傍に位置する遺伝子の発現が阻害される。この現象は体細胞において発現する遺伝子種の制限に関与することが知られている。本研究ではEGAMIホメオタンパク質群が有する遺伝子発現誘導能を明らかにするために、EGAMIホメオタンパク質群の一過性単独強制発現およびHDAC阻害剤Sodium butyrate(SB)処理が、代表的な体細胞株であるマウス線維芽細胞由来NIH3T3細胞の遺伝子発現に与える影響について検討した。その結果、SB単独処理、もしくはEGAMIC強制発現単独処理により、下垂体マーカー遺伝子*Pit1*の発現が誘導された。また、SB処理とEGAMI強制発現処理の併用により、未分化細胞マーカー遺伝子*Esrrb*の発現が誘導された。すなわち、EGAMIホメオタンパク質群の単独強制発現、もしくはSB処理との併用により、NIH3T3細胞に例示される体細胞において、本来発現していない遺伝子の発現を誘導できることが示された。本研究で得られた知見は、家畜由来人工多能性幹細胞の樹立への応用も想定される。

東北畜産学会報 62(3): 84 ~ 90 2013

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

(ES細胞, EvansとKaufman, 1981)が樹立された。

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48細胞期から桑実期にかけて発現量が増加するmRNAを探索し、EGAMI(Expressing gene at morula stage-1)ホメオタンパク質群(EGAMI, EGAMIN, EGAMIC)を発見した(Saitoら, 2010)。Egami 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、Egami mRNAはEgami 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、Egamic 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、EGAMIホメオタンパク

* 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

質群は未分化状態の維持, もしくは細胞分化に関与することが示された (Saito ら, 2010; Saito ら, 2011; Iha ら, 2012; Iha ら, 2012; Soma ら, 2012)。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ないことが判明している (Saito ら, 2010; Saito ら, 2012)。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, 直接的な標的遺伝子は同定されていない。

クロマチンへの後天的な修飾による遺伝子発現の制御は, エピジェネティクスとして知られている。主にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) やゲノムの化学的な修飾 (シトシン塩基のメチル化) により制御される。HDAC により脱アセチル化ヒストンが増加した場合, クロマチン構造の一部が変化し, その近傍に位置する遺伝子の発現が阻害される。また, ゲノム DNA のプロモーター領域のメチル化シトシン塩基が増加することにより, 遺伝子発現は阻害される。これらのエピジェネティックな変化を介して, 体細胞において発現する遺伝子種は限定される。Sodium butyrate (SB) はその HDAC 阻害活性により, 培養細胞の分化機能の発現を誘導することや細胞増殖を抑制することが知られている低分子化合物である (Xiao ら, 1997; Hatayama ら, 2007)。本研究では, EGAM1 ホメオタンパク質群が有する遺伝子発現誘導能を明らかにするために, 代表的な体細胞株であるマウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞における EGAM1 ホメオタンパク質群の一過性単独強制発現および SB 処理が遺伝子発現に与える影響について検討した。

材料および方法

1. NIH3T3 細胞の培養および遺伝子導入

NIH3T3 細胞は 10% 仔ウシ血清 (CS, Sigma) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) 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した (継代数不明)。NIH3T3 細胞は継代培養 14 回以内 (約 1.5 ヶ月) に実験に用いた。

SB (Sigma) 添加培養液により一定期間培養後, 6 穴培養皿 (グラインダー) に播種し (3–3.5 × 10⁵ cells/well), 一晚培養した。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/Egaml, pMK10/Egamln, pMK10/Egamlc 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. ウェスタンブロッティング

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 EGAMIN (Saito ら, 2010) または抗 EGAMIC (Saito ら, 2011) ポリクローナル抗血清 (20,000 倍希釈), 9 番アセチル化リジンと 14 番アセチル化リジンを含む合成ペプチドを抗原として作製されたウサギ抗アセチル化ヒストン H3 (AcH3) ポリクローナル抗体 (50 ng/ml, 06-599, Upstate) を用いた。また, ウサギ抗ヒストン H1 ポリクローナル抗体 (200 ng/ml, sc-10806, Santa Cruz Biotechnology) を用いてヒストン H1, もしくはウサギ抗ヒト β -ACTIN 抗体 (25 ng/ml, IMG-5142A, Imgenex) を用いて β -ACTIN を検出し, ローディングコントロールとした。なお, 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 (AP132P, Chemicon) を用いた。2 次抗体の希釈倍率は次の通りである: 抗 EGAMIN の検出には 800,000 倍希釈; 抗 EGAMIC の検出には 200,000 倍希釈; 抗 AcH3 の検出には 300,000 倍希釈; 抗ヒストン H1 と抗 β -ACTIN の検出には 50,000 倍希釈。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。

3. 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 PCR をおこなった。なお, 代表的なマーカー遺伝子として *Esrrb* (未分化細胞マーカー), *Mash1* (神経外胚葉マーカー), *Map2* (成熟神経細胞マーカー), *Pit1* (下垂体マーカー), *Tpbpa* (胎盤マーカー), ハウスキーピング遺伝子として *Gapdh* cDNA を定性的に検出した。なお, 用いたプライマーは次の通りである。*Esrrb*: 5'-CCATTC AAGGCAACATCGAG-3', 5'-TACAGCTTGTCCTGCTCAAC-3' (PCR 産物のサイズは 286 bp), *Mash1*: 5'-GCGGCCAACAAGAAGATGAG-3', 5'

-GGGCTTAGGTTTCAGACACCA-3' (同 543 bp, Saito ら, 2010), *Map2*: 5'-AACATACCACCAGCCGTTTG-3', 5'-TTCCATGCCTTGGAGATCCT-3' (同 735 bp, Saito ら, 2010), *Pit1*: 5'-AGGCAGTTTAACCCCTTGTC-3', 5'-AGCTACTGATGGTTGTCC-3' (同 460 bp), *Tpbpa*: 5'-TGCTGAACTGCAAGAGCAGA-3', 5'-TTGAGTGCAGGATCCCCTT-3' (同 485 bp, Saito ら, 2011), *Gapdh*: 5'-GAAGTCGGTGTGAACGGATT-3', 5'-TGAGGGAGATGCTCAGTGTG-3' (同 1083bp)。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

1. NIH3T3 細胞の形態に対する SB 添加の影響

NIH3T3 細胞の形態は紡錘形もしくは細長い三角形を示し, しばしば不規則な突起を持つ (Fig. 1, 0 mM)。種々の濃度の SB (0.1, 0.5, 1, 5, 10 または 20 mM) を添加した 10% CS 添加 DMEM により NIH3T3 細胞を 9 日間培養した。その結果, 0.1 および 0.5 mM SB 処理細胞は無処理 (0 mM) と同様な形態を示した。一方, 1 mM SB 処理細胞は, 無処理細胞と同様な形態ではあるが, 処理 1 日後から培養皿への伸展の程度が大きくなる傾向が認められた。5, 10, 20 mM SB 処理細胞は, SB 添加濃度が高くなるほど顕著な形態変化を示した。SB 処理 4 日後から培養皿に大きく伸展し, かつ, 多くの細い突起を伸ばすとともに, 大きな細胞核が認められた。

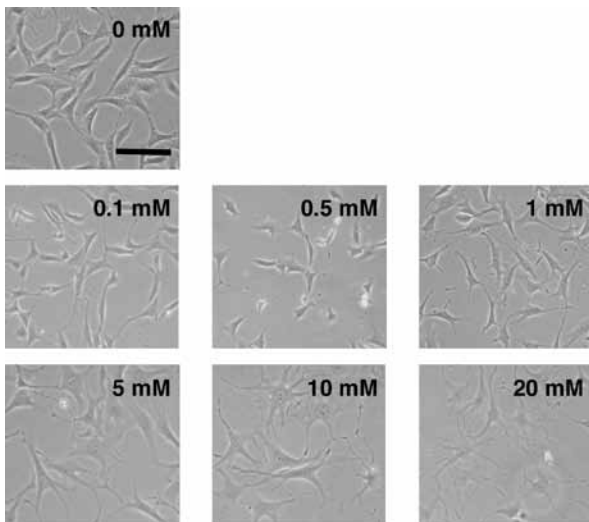


Fig. 1. Morphology of mouse fibroblast NIH3T3 cells in the presence of an HDAC inhibitor sodium butyrate.

NIH3T3 cells were cultured without (0 mM) or with varying concentrations of sodium butyrate for 9 days. Floating or dead cells in the 5, 10, or 20 mM sodium butyrate-treated cultures were removed by extensive washing before taking photographs. Scale bar, 20 μ m.

なお, これらの細胞形態は 9 日後以降, 少なくとも 14 日後まで継続して認められた。また, 5, 10 および 20 mM SB を添加した場合には多くの浮遊細胞もしくは死細胞が認められたが, 0.1, 0.5, 1 mM SB を添加した場合にはほとんど認められなかった。以上の結果より, 1 mM SB により 9 日間培養した後に遺伝子導入を行うこととした。

2. SB 処理した NIH3T3 細胞における EGAM1 ホメオタンパク質群の強制発現

1 mM SB 処理 (9 日間) した NIH3T3 細胞に対して EGAM1 ホメオタンパク質群強制発現ベクターを遺伝子導入した。まず最初に, SB 添加の有無と細胞内 AcH3 量の関連についてウェスタンブロッティング法により検討した。Fig. 2A に示すように, 1 mM SB 添加による細胞内 AcH3 量の明らかな増加が検出された。一方,

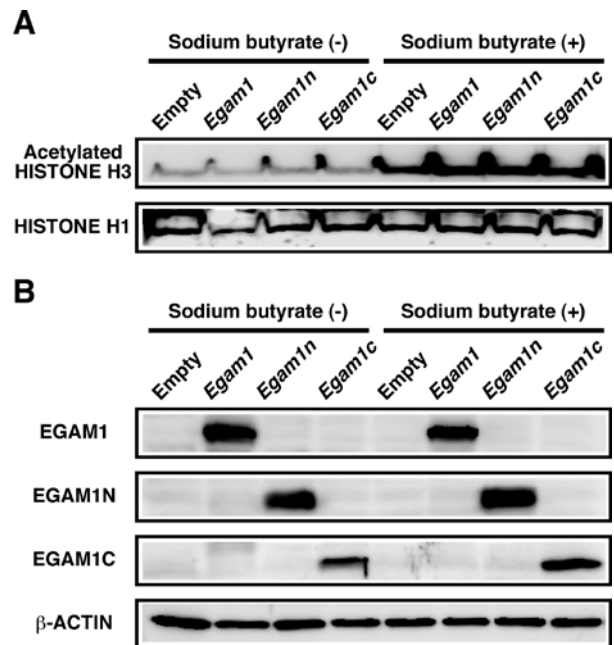


Fig. 2. Effect of pretreatment with sodium butyrate on acetylation of histone H3 and the ectopic expression of EGAM1 homeoproteins in mouse fibroblast NIH3T3 cells.

(A) NIH3T3 cells were cultured for 9 days with (+) or without (-) 1 mM sodium butyrate. Then, expression vectors for the respective EGAM1 homeoproteins were transfected. Two days after transfection, cell lysates were harvested, and acetylated histone H3 (an apparent molecular mass of 17 kDa on SDS-PAGE) was detected by Western blotting analysis as a positive indicator of the effect of HDAC inhibitor. Histone H1 (an apparent molecular mass of 32 kDa on SDS-PAGE) was detected as a loading control.

(B) The expression of EGAM1 (29 kDa), EGAM1N (14 kDa), and EGAM1C (17 kDa) was analyzed by Western blotting analysis using the same cell lysates described in (A). β -ACTIN (42 kDa) was detected as a loading control.

ヒストン H1 量に変化は認められなかった。すなわち、9 日間の 1 mM SB 処理により HDAC 活性が阻害された結果として、細胞内 AcH3 量の増加が導かれたことが示唆された。

次に、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、ウェスタンブロット法により検討した (Fig. 2B)。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が、1 mM SB 添加の有無にかかわらず、それぞれの発現ベクターを導入した細胞では EGAM1, EGAM1N, EGAM1C タンパク質の発現が明確に検出された。

次に、代表的なマーカー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. 3)。Empty ベクター導入細胞において、SB 処理のみにより *Pit1* 発現が検出された。一方、EGAM1C を強制発現させた NIH3T3 細胞においては、SB 添加の有無にかかわらず *Pit1* 発現が検出された。また、SB 処理と EGAM1 タンパク質強制発現を併用した場合のみ、*Esrrb* 発現が誘導された。

なお、それぞれの実験を独立して 2 回おこなったところ、同様な結果が得られた。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。一方、いずれも既に標的 cDNA を増幅できることが検証されたプライマーを用いたにもかかわらず (Saito ら, 2010; Saito ら, 2011), *Mash1*, *Map2*, *Tpbpa* 遺伝子の発現は検出されなかった (データ非提示)。

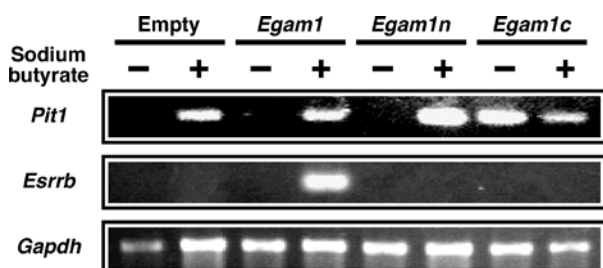


Fig. 3. Expression of transcripts for *Pit1* and *Esrrb* in NIH3T3 cells after transfection with expression vectors for EGAM1 homeoproteins. NIH3T3 cells were treated without (-) or with 1 mM sodium butyrate (+) and transfected with the respective expression vectors for EGAM1 homeoproteins as described in Fig. 2A. Two days after transfection, the expression of transcripts for *Pit1* (460 bp) and *Esrrb* (286 bp) was analyzed qualitatively by RT-PCR. Expression of *Gapdh* (1083 bp) was analyzed as a housekeeping gene.

考 察

我々は、EGAM1 ホメオタンパク質群をマウス 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; Iha ら, 2012; Soma ら, 2012)。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ている (Saito ら, 2011)。これらの事実は、EGAM1C 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。

下垂体において、*Pit1* 遺伝子はホメオタンパク質 PRO1 により発現が誘導されることが報告されている (Wu ら, 1998)。本研究において、NIH3T3 細胞において EGAM1C を単独で強制発現させることにより *Pit1* 発現が誘導された。本来、NIH3T3 細胞において EGAM1C の単独強制発現により発現誘導されたことより、EGAM1C と *Pit1* 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。*Pit1* 遺伝子の発現を誘導する転写因子 PRO1 および EGAM1C はいずれもホメオタンパク質であること、また、ホメオタンパク質はいずれも AT リッチな塩基配列に結合する DNA 結合性転写因子であることが知られている。下垂体において *Egam1c* mRNA の発現は検出されないことより (Saito ら, 2011), 本研究で見出された EGAM1C 強制発現に伴った *Pit1* 遺伝子の発現誘導は、EGAM1C が *Pit1* 遺伝子プロモーター DNA 領域に交差反応を示したことに起因するのではないかと推察している。また、SB 単独処理によっても *Pit1* 遺伝子の発現が誘導された。アセチル化ヒストンの増加により、NIH3T3 細胞において内在性に発現した何らかの転写因子が *Pit1* 遺伝子プロモーターを活性化したと推察されるが、その分子機構は不明である。

Esrrb 遺伝子の発現を誘導する転写因子はほとんど知られておらず、マウス ES 細胞においてはホメオタンパク質 NANOG がその有力候補であることがごく最近報告された (Festuccia ら, 2012)。本研究で見出された EGAM1C の単独強制発現と SB 処理の併用による *Esrrb* 遺伝子の発現誘導機構は不明であるが、その際に SB 処理が必要であったことより、ヒストンのアセチル化が関与する *Esrrb* 遺伝子プロモーターの活性化機構が存在することが考えられる。例えば、ヒストンのアセチル化により活性化された *Esrrb* 遺伝子プロモーター DNA 領域に EGAM1C が直接的に作用し、その転写を促進したの

かもしれない。今後、NIH3T3細胞においてEGAM1ホメオタンパク質群の強制発現、もしくはSB処理により発現量が変動する遺伝子群を網羅的に解析することは、*Pit1*や*Esrrb*遺伝子の発現誘導に関連する候補遺伝子をリストアップする上で有効であると考えられる。

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、*Nanog*, *Esrrb* 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。一方、ヒト (Maliら, 2010) およびマウス線維芽細胞 (Liangら, 2010) からiPS細胞を樹立する際にSBを添加することにより、iPS細胞の樹立効率とES細胞との類似性 (多能性) が大幅に向上することが報告された。SB添加により、ヒト線維芽細胞からiPS細胞が形成される際にAcH3の増加のみならず、iPS細胞の特性に直結する*OCT4* 遺伝子と*DPPA2* 遺伝子プロモーターDNAの脱メチル化の促進、および*DPPA2* 遺伝子発現の増強が見出されている。本研究で用いたNIH3T3細胞においても、*Pit1* 遺伝子や*Esrrb* 遺伝子プロモーターDNAの脱メチル化とSB処理との関連性は否定できない。また、SB処理はウシやブタ由来iPS細胞の樹立効率や多能性の改善にも有効かもしれない。

以上のように、EGAM1ホメオタンパク質群の強制発現とSB処理を組み合わせることにより、体細胞に由来するNIH3T3細胞において*Pit1* または*Esrrb* 遺伝子の発現を誘導することができることが判明した。本研究で得られた知見は、家畜由来iPS細胞の樹立への応用も想定される。

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 (H23Kendai-ken No. 682, H24Kendai-ken No. 173) 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 Biotech Eq*, 25: 2301-2304. 2011.

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156. 1981.
- Festuccia N, Osorno R, Halbritter F, Karwacki-Neisius V, Navarro P, Colby D, Wong F, Yates A, Tomlinson SR, Chambers I. *Esrrb* is a direct *Nanog* target gene that can substitute for *Nanog* function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 11: 477-490. 2012.
- Hatayama H, Iwashita J, Kuwajima A, Abe T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophys Res Commun*, 356: 599-603. 2007.
- Iha M, Soma M, Sato S, Mori Y, Sugawara S, Kasuga K, Kojima I, Yamada S, Sakaki S, Kobayashi M. Severe inhibition of in vitro cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells ectopically expressing EGAM1C homeoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76: 1410-1412. 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.
- 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.
- Liang G, Taranova O, Xia K, Zhang Y. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *J Biol Chem*, 285: 25516-25521. 2010.
- Mali P, Chou BK, Yen J, Ye Z, Zou J, Doney S, Brodsky RA, Ohm JE, Yu W, Baylin SB, Yusa K, Bradley A, Meyers DJ, Mukherjee C, Cole PA, Cheng L. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells*, 28: 713-720. 2010.
- 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, Kasuga K, Kojima I, Murata J, Kobayashi M. Ontogenic expression patterns of transcripts encoding EGAM1 homeoproteins during murine organogenesis. *Biotechnol Biotech Eq*, 26: 3321-3323. 2012.
- 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 placenta and trophoblast stem cells. *Reproduction*, 141: 259-268. 2011.
- Soma M, Iha M, Kihara Y, Sato S, Sato Y, Sato S, Mori Y, Sugawara S, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. Preferential emergence of cell types expressing markers for primitive endoderm lineages in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1 homeoprotein. *J Biosci Bioeng*, 114: 342-346. 2012.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. 2006.
- Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, 3rd, Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*, 18: 147-149. 1998.
- Xiao H, Hasegawa T, Miyaishi O, Ohkusu K, Isobe K. Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 237: 457-460. 1997.
- 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, 大津重紀, 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.
- 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. *東北畜産学会報*, 60: 108-115. 2011.

Effects of ectopic expression of EGAM1 homeoproteins and an HDAC inhibitor sodium butyrate on the induction of endogenous gene expression in mouse fibroblast NIH3T3 cells

Yuki MORI*, Atsuko SUZUKI*, Sho SATO, Saiko SUGAWARA, Kano KASUGA,
Ikuo KOJIMA, Jun IWASHITA and Masayuki KOBAYASHI

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

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

*These authors contributed equally to this work.

Summary

Recently, we identified EGAM1 homeoproteins (EGAM1, EGAM1N, and EGAM1C) in preimplantation mouse embryos and mouse embryonic stem (ES) cells. The forced expression of EGAM1 homeoproteins is able to regulate the maintenance and/or differentiation of ES cells. These proteins are considered to act as transcription factors from their structural features, although the direct target genes for EGAM1 homeoproteins are still unknown. In order to elucidate the transcriptional activities of EGAM1 homeoproteins, we transiently transfected the respective expression vectors into NIH3T3 cells as a representative somatic cell line. In addition, the effect of a nine-day pretreatment of 1 mM sodium butyrate (SB), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, on gene expression was also investigated. Two days after transfection, the expression of transcripts for several genes involved in maintaining an undifferentiated state or differentiation was analyzed qualitatively by RT-PCR. Upregulation of *Pit1* expression, a pituitary marker, was induced by the enforced expression of EGAM1C protein without SB pretreatment. On the other hand, pretreatment with SB resulted in the induction of *Pit1* expression without any enforced expression of EGAM1 homeoproteins. The expression of *Esrrb* transcript, an undifferentiated state marker, was only found in SB-pretreated transfectants expressing EGAM1. These results suggest that the ectopic expression of EGAM1 homeoproteins, in combination with pretreatment with SB, is able to induce the expression of *Pit1* or *Esrrb* in somatic cells, including NIH3T3. Our findings may provide insight into generation of induced pluripotent stem cells in domestic animals.

Key words: Butyrate, EGAM1 homeoproteins, Gene expression, HDAC inhibitor, NIH3T3 cells