

未分化状態維持または細胞分化に関与するマウス EGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位に関する解析

佐藤 匠¹・森 祐貴¹・菅原 彩子¹・佐藤 梓織¹・佐藤 由貴¹・春日 和²・小嶋 郁夫²・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

秋田県秋田市下新城中野 〒010-0195

2013年2月22日受付, 2013年2月27日受理

要 約

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 ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した。EGAM1 ホメオタンパク質群をマウス体細胞株において強制発現させたところ、未分化状態維持遺伝子群の発現が誘導された。この事実より、家畜由来人工多能性幹細胞の樹立へのEGAM1 ホメオタンパク質群の応用を想定している。一般に、ホメオタンパク質はDNA結合性転写因子として機能することが知られているが、EGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位は不明である。EGAM1 ホメオタンパク質群による細胞分化制御機構の全体像を解明する一環として、本研究では哺乳動物細胞の代表例としてヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞を選択して、強制発現させたEGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位について検討した。なお、免疫染色法により特異的に検出するために、それぞれのEGAM1 ホメオタンパク質群のN末端にFLAG配列を付加した。遺伝子導入したHEK293T細胞を免疫染色に供したところ、FLAG付加EGAM1とFLAG付加EGAM1Cは核に、FLAG付加EGAM1Nは核と細胞質に分布することが示された。すなわち、いずれのEGAM1 ホメオタンパク質群とも核に分布できることが示唆された。これらの結果は、EGAM1 ホメオタンパク質群は核内において転写因子として機能することを支持する。

東北畜産学会報 63(1): 1～6 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。内部細胞塊より、胚性幹細胞 (ES細胞) が樹立された (Evans と Kaufman, 1981)。内部細胞塊およびES細胞の未分化状態の維持には、転写因子OCT4 (Nicholsら, 1998) およびNANOG (Chambersら, 2003; Mitsuiら, 2003)

が重要であることがよく知られている。さらに、転写因子CDX2は栄養外胚葉への細胞分化に重要であることが報告された (Niwaら, 2005)。

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8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、EGAM1 (Expressing gene at morula stage-1) ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した (Saitoら, 2010)。Egam1 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、Egam1n mRNAはEgam1 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、Egam1c 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

* 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

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、EGAM1 は原始内胚葉への分化促進 (Saito ら, 2010; Soma ら, 2012), EGAM1N は未分化状態の維持 (Saito ら, 2010), EGAM1C は未分化状態の安定化と中胚葉および栄養外胚葉への分化促進に関与することが示された (Iha ら, 2012)。すなわち、EGAM1 ホメオタンパク質群はマウス初期胚および ES 細胞の未分化状態維持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。EGAM1 ホメオタンパク質群を発現していないことが判明しているマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞においてこれらを強制発現させたところ、未分化状態維持遺伝子 *Oct4*, *Nanog* もしくは *Esrrb* の発現が誘導された (伊波ら, 2012; 森ら, 2013)。この事実にもとづき、家畜由来人工多能性幹細胞の樹立への EGAM1 ホメオタンパク質群の応用を想定している。

一般に、ホメオタンパク質は DNA 結合性転写因子として機能すること、転写因子の核への移行は核膜孔によって制御されることが知られている (Herr と Cleary, 1995; Jans ら, 2000)。アミノ酸配列中に核移行シグナル (NLS) を含む場合、NLS 結合タンパク質である IMPORTIN ファミリーにより核への移行が促進され、核へ局在する。一方、EGAM1 ホメオタンパク質群は転写因子であると推定されるが生化学的、細胞生物学的知見は不足している。そこで本研究では代表的な哺乳動物細胞としてヒト胎児腎由来細胞株 HEK293T 細胞を選択し、EGAM1 ホメオタンパク質群それぞれを遺伝子工学技術により個別に強制発現させた後、免疫染色法により細胞内分布部位を検討した。

材料および方法

1. FLAG 付加 EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターの構築とヒト腎由来 HEK293T 細胞の培養および遺伝子導入

CAG プロモーターを有する発現ベクター pCAG-IP (Chambers ら, 2003) にそれぞれの cDNA を組み込み、pCAGIP/FLAG-Egam1, pCAGIP/FLAG-Egam1n, pCAGIP/FLAG-Egam1c を構築した。この際、抗体を用いて特異的に検出するために、それぞれの EGAM1 ホメオタンパク質群の N 末端に FLAG タグ (DYKDDDDK, アミノ酸一文字表記による) が付加されるように発現ベクターを設計した。

HEK293T 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (Biowest) 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。FLAG 付加 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 ベクターを既報 (Kobayashi ら, 1998) にもとづいてリポフェクション法により遺伝子導入した。

2. 免疫染色

遺伝子導入から 2 日後、EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターを導入した HEK293T 細胞を 8-well チャンバースライド (177445, Thermo Fisher) に播種し (2 × 10⁴ 細胞 /400 μl), さらに培養した (約 16 時間, 37 °C, 5% CO₂)。培養液を除去し、4% Paraformaldehyde (和光純薬) により細胞を固定した (30 分間, 室温)。0.5% Triton X-100 添加 PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ 不含) により透過処理を行った後 (10 分間, 室温), 一次抗体としてウサギ抗 FLAG IgG (4°C, 16 時間, 400 ng/ml, F7425, Sigma), 二次抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗ウサギ IgG (室温, 4 時間, 500 ng/ml, A120-201F, Bethyl) と反応させた。なお、核を染色するために、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 ng/ml) を二次抗体反応時に添加した。SlowFade Antifade Kit (Invitrogen) により蛍光の褪色を防止した後、蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス) により EGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位を観察した。

3. 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 FLAG IgG (3.3 ng/ml), 2 次抗体として Can Get Signal Solution 2 により希釈した Horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG (5 ng/ml, AP132P, Chemicon) を用いた。基質として ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用い、LAS4000 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。また、ウサギ抗ヒト β-ACTIN IgG (25 ng/ml, IMG-5142A, Imgenex) を用いて β-ACTIN タンパク質を検出し、ローディングコントロールとした。

結果および考察

本研究では、代表的な哺乳動物細胞株として HEK293T 細胞を用いた。HEK293T 細胞は SV40 large T 抗原を発現しているため、SV40 *ori* を含む pCAG-IP ベクターが染色体外において複製され、コピー数が増加する。従って、FLAG 付加 EGAM1 ホメオタンパク質群の発現量が増大するため、FLAG 抗体によりこれらを感度よく検出

できることが期待される。Fig. 1 に示すように、それぞれの FLAG 付加 EGAM1 ホメオタンパク質群発現ベクターを遺伝子導入した HEK293T 細胞において、強制発現されたタンパク質をウエスタンブロッティングにより明確に検出することができた。

これら FLAG 付加 EGAM1 ホメオタンパク質群を発現する HEK293T 細胞を免疫染色に供した (Fig. 2)。FLAG 付加 EGAM1 および FLAG 付加 EGAM1C は核染色像によく一致した染色像が得られたが、FLAG 付加 EGAM1N は核と細胞質いずれにも分布する染色像が得られた。なお、遺伝子導入処理を施した一部の細胞のみに導入されるため、写真内の一部の細胞に免疫染色像が示されていると考えられる。また、遺伝子導入と免疫染色実験は 2 回行ったが、よく一致した結果が得られた。

以上の結果より、EGAM1 および EGAM1C は核に局在できること、また EGAM1 および EGAM1C とは異なり、EGAM1N は拡散により核に分布できることが示された。HEK293T 細胞と同様に SV40 large T 抗原を発現しているサル腎由来 COS7 細胞においても、よく一致した結果が得られた (データ非提示)。そこで、NLS として機能するアミノ酸配列を推定することができる Web ツールである、PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) を用いて解析したところ、EGAM1 と EGAM1C に共通するホメオドメイン (HD2) 内に、

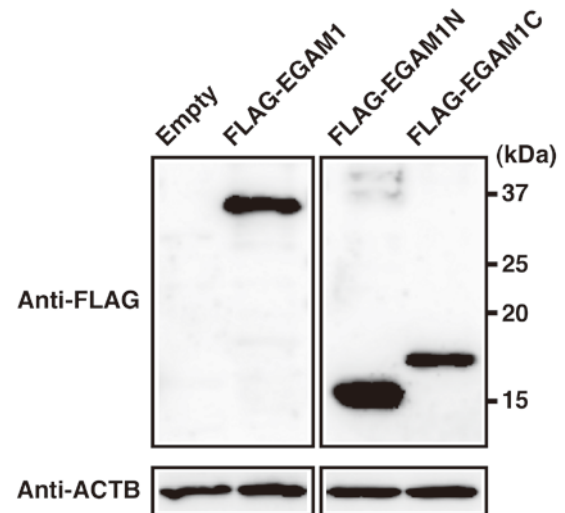


Fig. 1. Ectopic expression of FLAG-tagged EGAM1 homeoproteins in HEK293T cells.

Fetal human kidney-derived HEK293T cells were transfected with the respective expression vectors or control (Empty) vector. After a 2-day culture period, the expression of FLAG-tagged EGAM1 (30 kDa), EGAM1N (15 kDa), and EGAM1C (18 kDa) was analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibodies. While the lanes for Empty and FLAG-tagged EGAM1 and the other lanes were obtained from a single gel, a lane placed between them was removed. ACTB (42 kDa) was detected as a loading control.

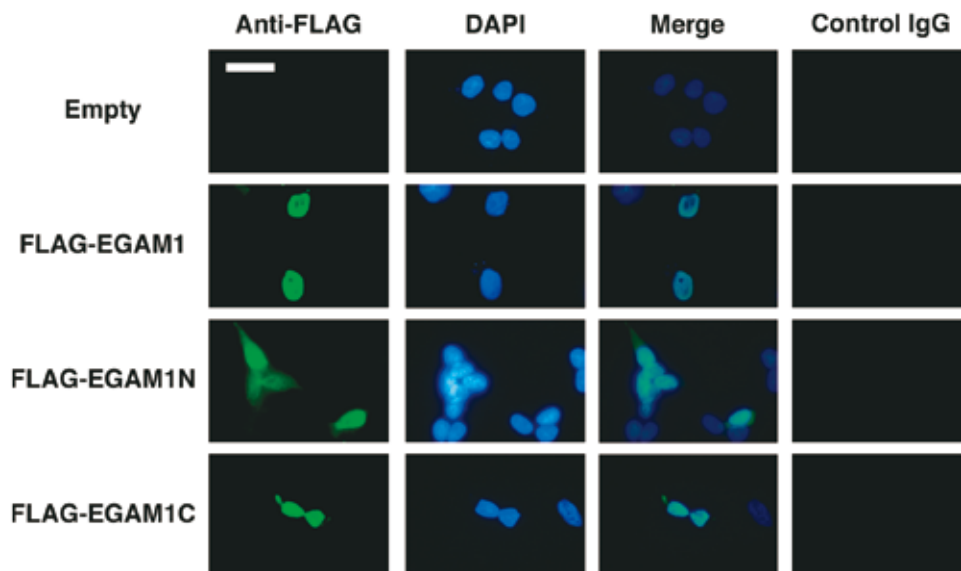


Fig. 2. Subcellular localization of FLAG-tagged EGAM1 homeoproteins in HEK293T cells.

After a 3-day culture period following transfection, immunofluorescence staining was performed. Nucleocytoplasmic localization of FLAG-tagged EGAM1 homeoproteins in HEK293T transfectants was detected using rabbit anti-FLAG antibodies and goat FITC-labeled secondary antibodies by fluorescence microscopy. Cell nuclei were detected using DAPI. Control rabbit IgG was used for detecting background signals, while these panels were representatives of other fields harboring similar cell densities. Because a part of cells were transfected with the expression vectors, a part of cells in photographs were detected with immunofluorescence staining. Merge, combination of FITC and DAPI. Scale bar, 50 μ m.

アルギニン残基 (R, 4 個) およびリジン残基 (K, 1 個) を含む 15 アミノ酸残基から成る推定 NLS (RKDLIRSWFITQRHR) が見出されたが, EGAMIN には見出されなかった (Fig. 3)。PSORT II による NLS の推定結果は, HEK293T 細胞における FLAG 付加 EGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位と矛盾がないので, これらのアミノ酸残基が核移行に重要であることが推察された。また, EGAM1 ホメオタンパク質群は核に分布できるという知見は, 核内において転写因子として機能する可能性を支持している。マウス ES 細胞において強制発現させることにより, EGAM1 は原始内胚葉の誘導に関与する *Gata4*, EGAMIN は *Oct4* および *Nanog*, EGAM1C は中胚葉の誘導に関与する *T* および栄養外胚葉の誘導に関与する *Cdx2* の遺伝子発現を促進することが判明している (Saito ら, 2010; Soma ら, 2012; Iha ら, 2012)。EGAM1 ホメオタンパク質群は, これら細胞系列特異的な遺伝子の転写を直接的に促進する可能性が考えられる。また EGAMIN が拡散により核に分布する場合, 細胞内において高レベルで発現した時にのみ, 転写因子として機能するとも推察される。一方, タンパク質の核輸送において, NLS に含まれる塩基性アミノ酸残基が重要であることが知られている (Jans ら, 2000)。今後は部位特異的なアミノ酸変異導入技術を用いて, EGAM1 と EGAM1C の推定 NLS に含まれる塩基性アミノ酸残基と核局在との関連性を検討する必要がある。現段階では免疫染色法に適用できる EGAM1 ホメオタンパク質群特異抗体がないことより, 本研究では FLAG 付加タンパク質と FLAG 抗体を用いた。今後は, 十分な特異性を示す抗 EGAM1 ホメオタンパク質群抗体を作製するとともに, これらタンパク質群が本来発現しているマウス初期胚および ES 細胞における細胞内分布部位を検討する必要がある。

謝 辞

HEK293T 細胞を分与していただいた五十嵐慎博士 (帯広畜産大学), pCAG-IP ベクターを分与して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) に感謝致します。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, H24Kendai-ken No. 240) による研究助成を受けて行われた。

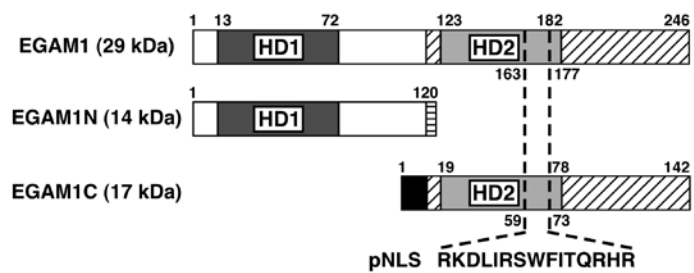


Fig. 3. Schematic diagram of the primary amino acid sequence and a potential nuclear localization signal for EGAM1 homeoproteins.

Amino acid sequences of EGAM1, EGAMIN, and EGAM1C proteins were compared. Boxes filled with the same patterns, including white boxes, indicate the regions completely matching in each protein. The homeodomains are labeled “HD1” and “HD2”. The potential nuclear localization signal motif (RKDLIRSWFITQRHR) was predicted for amino acids 163-177 and 59-73 of the carboxy termini within the HD2s of EGAM1 and EGAM1C, respectively, using the web-based tool PSORTII. pNLS, potential nuclear localization signal.

引用文献

- 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.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156. 1981.
- Herr W, Cleary MA. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev*, 9: 1679-1693. 1995.
- 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.
- Jans DA, Xiao CY, Lam MH. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*, 22: 532-544. 2000.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 伊波百恵, 小野陽子, 佐藤匠, 森祐貴, 春日和, 小嶋郁夫, 小林正之. マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞およびマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞における EGAM1 ホメオタンパク質群の一過性強制発現による *Oct4* および *Nanog* 遺伝子の発現誘導. 東畜会報, 61: 35-40. 2012.
- 森祐貴, 鈴木敦子, 佐藤匠, 菅原彩子, 春日和, 小嶋郁夫, 岩下淳, 小林正之. EGAM1 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. 東畜会報, 62: 8-14. 2013.

Nucleocytoplasmic localization of EGAM1 homeoproteins ectopically expressed in mammalian cells cultured *in vitro*

Sho SATO, Yuki MORI, Saiko SUGAWARA, Shiori SATO, Yuki SATO,
Kano KASUGA, Ikuo KOJIMA 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)

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 regulates the maintenance and/or differentiation of ES cells. There is currently considerable interest in assessing the feasibility of applying EGAM1 homeoproteins to generate induced pluripotent stem cells in domestic animals. The EGAM1 homeoproteins are considered to act as transcription factors based on their structural features, although few biochemical and cell biological details are available regarding their regulation of gene expression. Therefore, in this study, we investigated their subcellular localization in fetal human kidney-derived HEK293T cells ectopically expressing the respective homeoproteins. The FLAG-tagged EGAM1 and EGAM1C were localized in the nucleus, while FLAG-tagged EGAM1N was distributed diffusely in the cytoplasm and nucleus. Analysis using the web-based tool PSORTII predicted a potential nuclear localization signal motif, RKDLIRSWFITQRHR, in the homeodomain shared by EGAM1 and EGAM1C. These results suggest that all EGAM1 homeoproteins could contribute to gene expression via their distribution to the nucleus.

Key words: Ectopic expression, EGAM1 homeoproteins, HEK293T cells, Subcellular localization