

マウスES細胞におけるホメオタンパク質EGAMINまたはEGAMICの強制発現は動物胚の形態形成に関する*Wnt*ファミリー遺伝子の発現を誘導する

佐藤 由貴¹・佐藤 梓織¹・菊地 貴裕¹・野中 愛純¹・佐々木 玲^{1,2}・小林 正之^{1,*}

¹ 秋田県立大学大学院生物資源科学研究科
秋田県秋田市下新城野 〒010-0195

² 秋田県総合食品研究センター
秋田県秋田市新屋町 〒010-1623

2015年2月23日受付, 2015年3月11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EGAM1ホメオタンパク質群EGAMINおよびEGAMICを発見した。マウスES細胞においてこれらを強制発現させた場合、未分化状態の維持もしくは細胞分化に影響することが示されている。一方、EGAM1ホメオタンパク質群は初期胚だけでなく、着床後の発生過程でも発現していることより、臓器や組織の形成にも関与することが推定される。そこで本研究では、胚の形態形成に深く関与することが知られているサイトカインWNTをコードする*Wnt*ファミリー遺伝子(全19種)に注目し、マウスES細胞における当該タンパク質群の強制発現により発現が誘導されるか、DNAマイクロアレイ解析を用いてスクリーニングを行った。その結果、EGAMIN強制発現細胞およびEGAMIC強制発現細胞において、*Wnt2*・*Wnt3*・*Wnt4*・*Wnt6*・*Wnt7a*・*Wnt10a*・*Wnt10b*の明確な活性化を同定した。また、WNTの主要な産生細胞である、上皮細胞のマーカー遺伝子の発現が誘導されることも見出した。以上の結果より、マウスES細胞におけるEGAMINおよびEGAMICの強制発現は、上皮細胞に例示されるWNT産生細胞の形成を促進すること、もしくは*Wnt*ファミリー遺伝子の発現を誘導することが考えられる。すなわち、EGAM1ホメオタンパク質群はこれらを介して、マウス胚の形態形成に関与する可能性が考えられる。

東北畜産学会報 65(1): 14 ~21 2015

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)。前期胚盤胞期(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が形態的にも明確に形成される。後期胚盤胞期(受精4.5日後)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(Yamanakaら, 2010)。内部細胞塊からは胚性幹細胞(ES細胞, EvansとKaufman, 1981)を樹立できることが示された。

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)を添加して培養することにより維持できる(Niwaら, 2009)。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(Niwa, 2007)。転写因子*Oct4*(Nicholsら, 1998)、*Sox2*(Avilionら, 2003)、*Nanog*(Chambersら, 2003; Mitsuiら, 2003)はマウス初期胚における未分化細胞や内部細胞塊、ES細胞において発現し、それらの未分化状態を維持する。また、栄養外

* 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動物分子工学研究室)
Tel 018-872-1596 Fax 018-872-1676
E-mail makoba@akita-pu.ac.jp

胚葉への分化には *Cdx2* (Niwa ら, 2005), 原始内胚葉への分化には *Gata6* (Fujikura ら, 2002; Shimosato ら, 2007) などの転写因子が関与している。胎仔と胚体外組織 (胎盤・卵黄嚢) が形成され、その後の着床と妊娠が正常に進行する上で、このように桑実期から胚盤胞期にかけて、未分化状態の維持や細胞分化を誘導する遺伝子群が適切に発現することが重要である。すなわち、細胞分化と形態形成が進行するので非常に重要な時期である。しかし、ここに例示した種々の転写因子群の関与が報告されているものの (Niwa, 2007), 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十分ではない。

我々は、胎仔・胎盤・卵黄嚢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 4-8 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 ホメオタンパク質群 EGAM1N および EGAM1C を発見した (Gene ID 546024; Saito ら, 2010)。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、EGAM1N は未分化状態の維持 (Saito ら, 2010; Sato ら, 2015), EGAM1C は未分化状態の安定化・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)。また、EGAM1 ホメオタンパク質群は細胞核に局在することも示されている (Sato ら, 2013; 佐藤ら, 2013)。一般的に、ホメオタンパク質は DNA 結合性の転写因子であることを考え合わせるにより (Spatazza ら, 2013), 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している。

一方、EGAM1 ホメオタンパク質群は着床後の発生過程において、調べた限りでは精巣・卵巣・脳・目でも発現している (Saito ら, 2012)。すなわち、当該タンパク質群は初期胚のみならず、着床後の胚において器官や組

織の形成にも関与していることが推定される。すなわち、EGAM1 ホメオタンパク質群は多様な遺伝子の発現に関与する転写因子であると考えられるが、直接的な標的遺伝子は未だ同定されていない。サイトカイン WNT をコードする *Wnt* ファミリー遺伝子 (全 19 種; van Amerongen と Nusse, 2009) は、形態形成に深く関与することが知られている。また最近では、WNT はマウス ES 細胞の未分化状態維持に重要であることが報告された (Martello ら, 2012)。すなわち、WNT は形態形成のみならず、幹細胞分野においても注目されている。そこで本研究では WNT に着目し、EGAM1 ホメオタンパク質群の強制発現により発現が誘導される分子種について、DNA マイクロアレイ解析を用いてスクリーニングした。また、これら遺伝子群の中から主要な遺伝子を選択してリアルタイム PCR により発現量を定量し、発現誘導について検証した。

材料および方法

1. マウス ES 細胞の継代培養および分化誘導培養

CAG プロモーターを有する哺乳動物用発現ベクター pMNIPur に *Egam1n* または *Egam1c* cDNA を組み込み、フィーダー細胞を必要としないマウス ES 細胞株 MGI.19 細胞に対して遺伝子導入し、EGAM1N 強制発現 ES 細胞 (#N8)・EGAM1C 強制発現 ES 細胞 (#C4) を樹立した (Iha ら, 2012; Sato ら, 2015)。また、対照として Empty ベクターを導入したコントロール細胞 (#E2) を用いた (Iha ら, 2012)。コントロール細胞と比較して、EGAM1N もしくは EGAM1C タンパク質の発現量はそれぞれ約 25 倍、約 7 倍である (Iha ら, 2012; Sato ら, 2015)。これら ES 細胞の継代培養は既報 (Saito ら, 2010) に基づいて行った。10% ウシ胎仔血清 (FCS, ES 細胞用, Biological Industries) および遺伝子組換

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

Gene	Primer name	Primer sequence	Product size (bp)
<i>Hmbs</i>	Hmbs F	5'-CCCTTGTGATGCTGTTGCTTTCA-3'	168
	Hmbs R	5'-AGGCGGGTGTGAGGTTTCC-3'	
<i>Wnt2</i>	Wnt2 F	5'-AGCCAATAAGAGGTTTAAGAAGCCAACGA-3'	144
	Wnt2 R	5'-CTGTCCATGCCTCGGGAAGTCAA-3'	
<i>Wnt3</i>	Wnt3 F	5'-AAACTTCCTCCTCGGCGCTGCTTCT-3'	257
	Wnt3 R	5'-GATGCCCAGCTTCACACCTTCTGCTAC-3'	
<i>Wnt4</i>	Wnt4 F	5'-ACTCCTCGTCTTCGCCGTGTTCTC-3'	110
	Wnt4 R	5'-CTTTGAGTTTCTCGCACGTCTCCTCT-3'	
<i>Cdh1</i>	Cdh1 F	5'-GAAGACGCTGAGCATGTGAA-3'	200
	Cdh1 R	5'-TGGATCCAAGATGGTGATGA-3'	
<i>Cdh3</i>	Cdh3 F	5'-GCAGCCTTCTCACCTCCCTTCAGTT-3'	334
	Cdh3 R	5'-CATCACCCACTCTCTTTTCGCTCCTT-3'	

えヒト LIF（自家製）を添加した Glasgow modified Eagle's medium (GMEM, Sigma) を用い、0.1%ゼラチン (Sigma) 処理したプラスチック培養皿（日本ジェネティクス）に播種し（ 3×10^5 細胞/ ϕ 10 cm），3日間隔で継代培養（37°C，5% CO₂）した。また，0.1%ゼラチン処理した培養皿に ES 細胞を播種（ 6×10^4 細胞/ ϕ 10 cm）し，LIF 非添加・10%FCS 添加 GMEM を用いて培養（5日間および12日間）することにより分化を誘導した。

2. DNA マイクロアレイ解析

分化誘導培養（5日間および12日間）を行った細胞から RNeasy Mini (Qiagen) を用いて RNA を抽出・精製した。得られた RNA（1 μ g）を鋳型として cDNA を合成し（北海道システムサイエンス），DNA マイクロアレイ解析（SurePrint G3 Mouse GE 60K，1カラー解析法，Agilent Technologies）を行った。mRNA 発現量の補正は 75 percentile 法（北海道システムサイエンス）を用いた。なお，分化誘導したそれぞれの細胞（n = 1）から RNA を抽出し，DNA マイクロアレイ解析を行ったため，mRNA 発現量を統計的に比較することができな

い。そこで本研究では，コントロール細胞と比較して，EGAM1N 強制発現細胞および EGAM1C 強制発現細胞において少なくとも 5 倍以上，発現が誘導された遺伝子を陽性と判断した。

3. リアルタイム PCR 解析

既報 (Ihara, 2012) に基づき，それぞれの細胞（n = 3）から RNeasy Mini により RNA を精製後，逆転写反応により cDNA を合成し，QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) を用いてリアルタイム PCR を行った。pGEM-T easy vector (Promega) にそれぞれのプライマーによる増幅 DNA を組み込み，リアルタイム PCR のスタンダードとした。プライマーの塩基配列は Table 1 に示した。なお，ハウスキーピング遺伝子 Hydroxymethylbilane synthase (*Hmbs*) の発現量を定量し，それぞれの mRNA 発現量を補正した。

4. 統計解析

mRNA 発現量における差の検定は，分散分析を行った後，Turkey-Kramer 法により多重検定を行った。

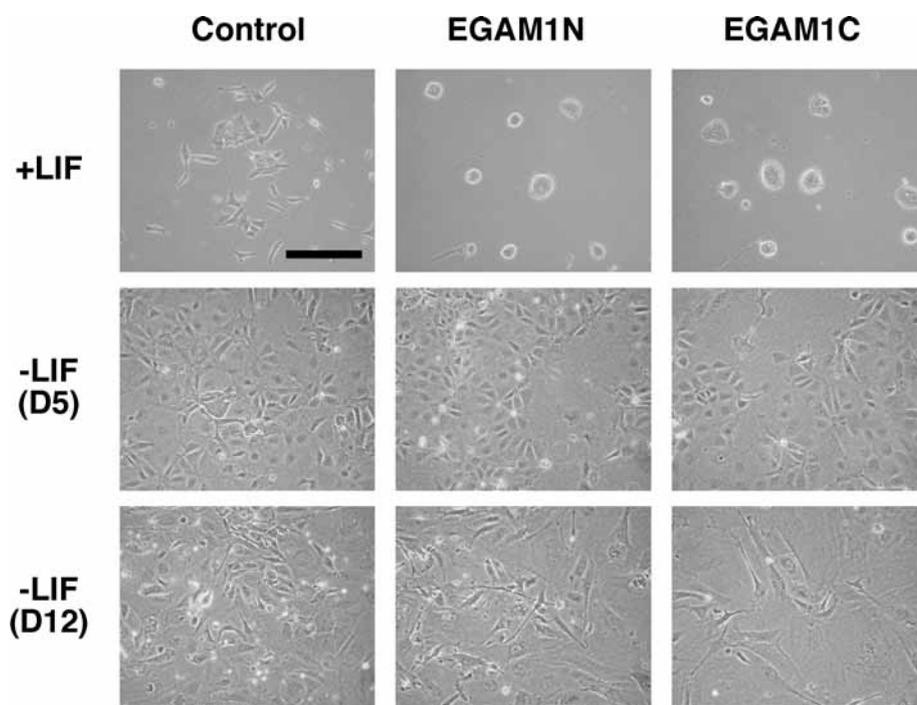


Fig. 1. Cell morphology of control, *Egam1n*, and *Egam1c* transfectants before and after the induction of differentiation.

Feeder-free, mouse MG1.19 ES cells transfected with empty (Control), *Egam1n* (EGAM1N) or *Egam1c* (EGAM1C) expression vectors were maintained in the presence of LIF (+LIF). Then, they were induced to differentiate in the absence of LIF (-LIF) for a 12-day culture period. Photographs taken after 5-day (D5) and 12-day (D12) culture periods are shown. Scale bar, 50 μ m.

結果および考察

既に報告したように (Iha ら, 2012; Sato ら, 2015), 未分化状態維持培養したコントロール細胞は扁平な細胞コロニーを形成し, EGAM1 ホメオタンパク質を強制発現させた ES 細胞はドーム状の細胞コロニーを形成した (Fig. 1)。いずれの細胞とも分化誘導 5 日目には, 敷石状の細胞集団を含む伸展した細胞層を形成した。いずれの細胞とも分化誘導 12 日目には, 培養皿に薄く, 広く伸展した細胞を多く含んでいた。ただし, EGAM1N または EGAM1C を強制発現させた細胞ではこの傾向が顕著であった。しかし, これらの特徴的な形態を示す細胞の種類は不明である。

分化誘導 12 日目に得た試料を用いた DNA マイクロアレイ解析により, 形態形成に関与する *Wnt* ファミリー遺伝子の活性化について検討した。その結果, EGAM1N

Table 2. Changes in expression levels of *Wnt* and *Cdh* genes in *Egam1n* and *Egam1c* transfectants screened by DNA microarray analysis.

Gene	Relative expression level (Control transfectants = 1)	
	<i>Egam1n</i> transfectants	<i>Egam1c</i> transfectants
<i>Wnt1</i>	0.90	0.89
* <i>Wnt2</i>	25	11
<i>Wnt2b</i>	5.2	3.2
* <i>Wnt3</i>	12	9.5
<i>Wnt3a</i>	1.2	1.0
* <i>Wnt4</i>	11	5.5
<i>Wnt5a</i>	4.1	4.1
<i>Wnt5b</i>	2.9	1.7
* <i>Wnt6</i>	46	23
* <i>Wnt7a</i>	16	11
<i>Wnt7b</i>	4.5	2.5
<i>Wnt8a</i>	1.1	2.0
<i>Wnt8b</i>	0.61	1.1
<i>Wnt9a</i>	2.7	2.6
<i>Wnt9b</i>	5.7	3.0
* <i>Wnt10a</i>	130	80
* <i>Wnt10b</i>	7.9	7.0
<i>Wnt11</i>	2.4	1.9
<i>Wnt16</i>	0.96	1.0
<i>Cdh1</i>	1.3	1.6
<i>Cdh3</i>	2.1	1.5

*The expression levels of these genes were more than 5-fold higher both in *Egam1n* and *Egam1c* transfectants compared with that of the control. In order to screen changes in the expression levels of *Wnt* genes, RNA samples (n = 1 prepared from the respective transfectant) were applied for DNA microarray analysis. Thus, we set the threshold values as 5-fold higher than the control levels to highlight upregulated genes.

強制発現細胞および EGAM1C 強制発現細胞において, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt10a*, *Wnt10b* (7 種) の活性化を同定した (Table 2)。ノックアウトマウスを用いた解析から, *Wnt2* は胎盤の形成 (Monkley ら, 1996), *Wnt3* は原腸陥入 (Liu ら, 1999), *Wnt4* は腎臓の形成 (Stark ら, 1994) および生殖器官の形成 (Kim ら, 2006) に重要であることが示されている。そこで Fig. 2 に示したように, 代表例としてこれら 3 種の *Wnt* ファミリー遺伝子を選択し, リアルタイム PCR によりその発現量を定量してスクリーニングの結果を検証した (Fig. 2A)。これら 3 種の *Wnt* ファミリー遺伝子の発現は, 未分化状態維持培養 (+LIF) では検出限界以下であったが, 分化誘導処理により明確に誘導された。EGAM1N または EGAM1C 強制発現細胞では経時的に *Wnt2* 発現量が増加し, コントロール細胞と比較して, 分化誘導 12 日目において有意 ($P < 0.01$) に増加した。*Wnt3* 発現量は分化誘導 5 日目までに増加し, 12 日目にかけて減少したが, EGAM1N 強制発現細胞および EGAM1C 強制発現細胞において有意 ($P < 0.05$) に高かった。*Wnt4* 発現量は, 分化誘導 12 日目の EGAM1N 強制発現細胞, 分化誘導 5 日目および 12 日目の EGAM1C 強制発現細胞において有意 ($P < 0.01$) に増加した。すなわち, EGAM1N または EGAM1C の強制発現により, *Wnt2*・*Wnt3*・*Wnt4* の発現が促進されることが定量的に検証された。

Wnt ファミリー遺伝子は, 上皮細胞・線維芽細胞・血球細胞等において発現することが知られている (Yamamoto ら, 2013)。そこで, EGAM1N 強制発現細胞および EGAM1C 強制発現株細胞における上皮細胞のマーカー遺伝子群に注目して DNA マイクロアレイの結果を再解析したところ, 細胞間接着分子をコードする *Cdh1*・*Cdh3* の弱い活性化を見出した (Table 2)。そこで *Cdh1*・*Cdh3* について, EGAM1N 強制発現細胞および EGAM1C 強制発現細胞における mRNA 発現量を定量した (Fig. 2B)。*Cdh1* の発現パターンは *Wnt3*・*Wnt4* に, *Cdh3* の発現パターンは *Wnt2* の発現パターンによく一致していた。この相関関係を裏付ける具体的な報告は見いだせない。しかし, ES 細胞における EGAM1N または EGAM1C の強制発現により, 上皮細胞に例示される WNT 産生細胞の形成が促進され, その結果として *Wnt* ファミリー遺伝子の発現が誘導された可能性が考えられる。もしくは, EGAM1 ホメオタンパク質群は直接的に *Wnt* ファミリー遺伝子の発現を誘導できるのかもしれない。当該タンパク質群の直接的な標的遺伝子はいまだ同定されていないが, これら *Wnt* ファミリー遺伝子のプロモーター領域の解析はアプローチとして有効ではないか

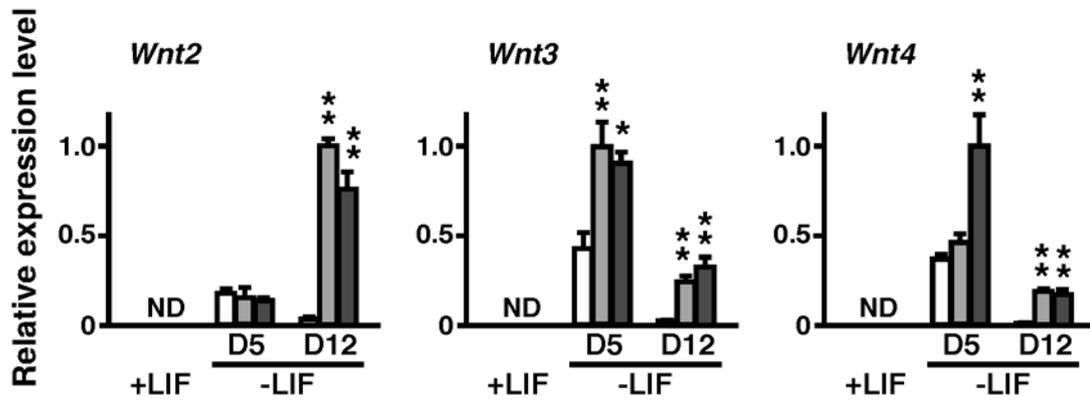
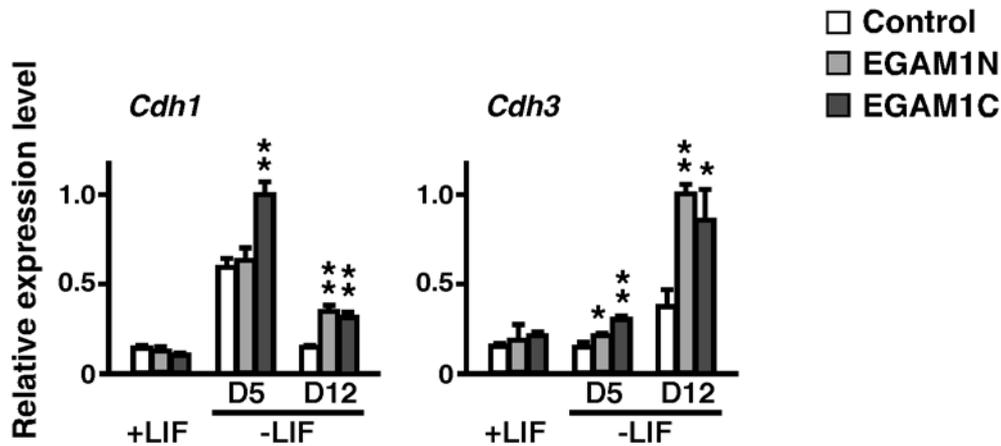
A**B**

Fig. 2. Quantification of the expression levels of selected genes by real-time PCR.

Control, *Egam1n* (EGAM1N), and *Egam1c* (EGAM1C) transfectants were induced to differentiate as indicated in the legend of Fig. 1. After 5-day (D5) and 12-day (D12) culture periods, the expression levels of the selected genes were quantified by real-time PCR and normalized with that of *Hmbs*, a housekeeping gene. Data are expressed as mean \pm SE (n = 3 independent dishes). ND, not detected. Asterisks, significantly different from the control; * P < 0.05, ** P < 0.01.

(A) Expression levels of representative genes of the *Wnt* gene family upregulated in *Egam1n* and *Egam1c* transfectants identified by screening using DNA microarray analysis (Table 2).

(B) Expression levels of *Cdh* genes encoding cell-to-cell adhesion molecules selected as markers for epithelial cells expressing *Wnt* genes.

と考えている。また、分泌された WNT が標的細胞に作用する場合、その細胞内シグナル伝達経路は複雑である。例えば、WNT 受容体 FRIZZLED やシグナル伝達仲介分子 β -カテニンなどの遺伝子発現・細胞内における挙動の変化が深く関与していることが知られている (van Amerongen と Nusse, 2009)。EGAM1 ホメオタンパク質群の強制発現と WNT シグナル伝達分子群との関連についても、今後、検討する価値が十分にあると考えている。

以上のように、マウス ES 細胞における EGAM1N お

よび EGAM1C の強制発現は、上皮細胞に例示される WNT 産生細胞の形成、もしくは *Wnt* ファミリー遺伝子の発現を促進することにより、着床後のマウス胚の形態形成にも関与する可能性が示された。EGAM1 ホメオタンパク質群のパラログ遺伝子はウシ (Gene ID 101902766)・ブタ (100622236)・ヒト (284355)・ラット (102553890)・イヌ (102152161)・ネコ (101092810) においても見出されるので、家畜を含む動物胚の発生にも関与する可能性が考えられる。

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 (H24Kendai-ken No. 173, H24Kendai-ken No. 240, H25Kendai-ken No. 108) による研究助成を受けて行われた。

引用文献

- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17: 126-140. 2003.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, 4: e187. 2006.
- Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet*, 22: 361-365. 1999.
- Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Gottgens B, Niwa H, Smith A. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell stem cell*, 11: 491-504. 2012.
- 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.
- Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development*, 122: 3343-3353. 1996.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis 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. How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134: 635-646. 2007.
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460: 118-122. 2009.
- Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123: 917-929. 2005.
- 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.
- Sato S, Morita S, Iha M, Mori Y, Sugawara S, Kasuga K, Kojima I, Ozaki N, Muraguchi H, Okano K, Iwashita J, Murata J, Hosaka M, Kobayashi M. 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. *J Biosci Bioeng*, 116: 141-146. 2013.
- Sato S, Nakazawa M, Kihara Y, Kubo Y, Sato Y, Kikuchi T, Nonaka A, Sasaki A, Iwashita J, Murata J, Hosaka M, Kobayashi M. Partial inhibition of differentiation associated with elevated protein levels of pluripotency factors in mouse embryonic stem cells expressing exogenous

- EGAM1N homeoprotein. *J Biosci Bioeng*, 10.1016/j.jbiosc.2015.03.001, 2015.
- 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.
- Spatazza J, Di Lullo E, Joliot A, Dupont E, Moya KL, Prochiantz A. Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacol Rev*, 65: 90-104. 2013.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372: 679-683. 1994.
- van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136: 3205-3214. 2009.
- Yamamoto H, Awada C, Hanaki H, Sakane H, Tsujimoto I, Takahashi Y, Takao T, Kikuchi A. The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *J Cell Sci*, 126: 2931-2943. 2013.
- Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*, 137: 715-724. 2010.
- 佐藤匠, 森祐貴, 菅原彩子, 佐藤梓織, 佐藤由貴, 春日和, 小嶋郁夫, 小林正之, 未分化状態維持または細胞分化に関するマウス EGAM1 ホメオタンパク質群の細胞内分布部位に関する解析. *東畜会報*, 63: 1-6. 2013.

Induction of expression of the *Wnt* gene family in differentiating mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1N or EGAM1C homeoproteins

Yuki SATO¹, Shiori SATO¹, Takahiro KIKUCHI¹, Asumi NONAKA¹, Akira SASAKI^{1,2}
and Masayuki KOBAYASHI¹

¹Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Shimoshinjoh Nakano, Akita 010-0195, Japan

²Akita Research Institute of Food and Brewing

Araya, Akita 010-1623, Japan

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

Summary

We previously found transcripts encoding the EGAM1N and EGAM1C homeoproteins in preimplantation mouse embryos and embryonic stem (ES) cells. These homeoproteins act as positive or negative regulators of differentiation in ES cells, and are, therefore, considered as transcription factors. The transcripts encoding these homeoproteins are expressed not only in preimplantation embryos but also in certain tissues during the course of embryogenesis, suggesting that EGAM1N and EGAM1C contribute to organogenesis. In the present study, we focused on the relationship between these homeoproteins and the expression of 19 genes comprising the *Wnt* gene family, which are crucial genes involved in morphogenesis during the development of embryonic and extraembryonic organs or tissues. DNA microarray analysis determined that at least 7 genes, including *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt10a*, and *Wnt10b*, were upregulated clearly in differentiating ES cells expressing EGAM1N or EGAM1C. Significant upregulation of the expression levels of *Wnt2*, *Wnt3*, and *Wnt4*, as representatives of the microarray positive genes, were confirmed by real-time PCR. In addition, increased expression levels of *Cdh1* and *Cdh3*, marker genes for epithelial cells expressing the *Wnt* gene family, were also identified by real-time PCR. Taken together, we suggest that EGAM1N and EGAM1C homeoproteins promote the generation of WNT-producing cell types, including epithelial cells, or the expression of specific *Wnt* genes in differentiating mouse ES cells.

Key words: EGAM1C, EGAM1N, epithelial cells, ES cells, microarray, Wnt