

岐阜大学学位論文

胎盤特異的転写因子 GCMA の新規発現調節機構に関する研究

Novel regulatory mechanisms involved in the expression of
placenta-specific transcription factor GCMA

2012

岐阜大学連合創薬医療情報研究科

安井 裕子

1. 本論文は2012年3月岐阜大学連合創薬医療情報研究科において審査されたものである。

主査 赤尾 幸博 教授

副査 北出 幸夫 教授

武藤 吉徳 教授

上田 浩 准教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Yuko Yasui, Kazuyo Yamada, Satoru Takahashi, Mayumi Sugiura-Ogasawara,
Katsuya Sato, Daisuke Miyazawa, Tsuyoshi Sugiyama, Yukio Kitade and Hiroshi
Ueda

PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and
ERK-dependent pathway

Biochem. Biophys. Res. Commun. 417 (2012) 1127-1132.

3. 本論文の基礎となる研究は、北出幸夫教授、上田浩准教授の指導の下に岐阜大学連合創薬医療情報研究科および金城学院大学薬学部において行われた。

本論文では以下の略号を用いた。

cAMP	: cyclic AMP
CBP	: cAMP response element-binding protein-binding protein
CHX	: cycloheximide
CREB	: cAMP response element-binding protein
CRE	: cAMP response element
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EGF	: epidermal growth factor
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epac	: exchange protein directly activated by cAMP
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FCS	: fetal calf serum
FSK	: forskolin
GCMa	: Drosophila glial cells missing mammalian homolog a
hCG	: human chorionic gonadotropin
HDAC	: histone deacetylase
MEK	: mitogen-activated protein kinase kinase
PKA	: protein kinase A
PKC	: protein kinase C
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RUNX	: runt domain transcription factor
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

目次

第1章 序論	1
第2章 抗 GCMa 抗体 の 作製	6
第1節 序	6
第2節 実験方法	8
第3節 結果	12
第4節 考察	16
第3章 GCMa の発現調節におけるシグナルおよび GCMa リン酸化に関する検討	18
第1節 序	18
第2節 実験方法	20
第3節 結果	25
第4節 考察	42
第4章 結論	47
謝辞	48
参考文献	49

第 1 章 序論

妊娠高血圧症候群は、かつて妊娠中毒症と呼ばれた病態が「妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに高血圧が見られる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないもの」と改定されたもので、全妊婦の約 7~10%に発症し、妊産婦の主な死亡要因のひとつとなっている[1]。重症化すると母体の肝臓や腎臓などの機能障害や胎児の子宮内発育不全など、母児双方に様々な異常をきたし、早産、低体重児などの発生率が増加、予後にも影響を与える[2-5]。また、肺水腫、脳出血、常位胎盤早期剥離、HELLP 症候群（溶血性貧血、肝逸脱酵素上昇、血小板低下）も母体生命に関わる重篤な疾患で、妊娠高血圧症候群と非常に強い因果関係が示唆されている[6,7]。妊娠高血圧症候群の成因は遺伝的因子、胎盤形成・機能、免疫、糖やカルシウムの代謝、血圧昇降系、血液凝固線溶系など多方面から研究されているが、その本態は未だ明らかになっておらず、根本的治療法もないのが現状である。日本では出産年齢の高齢化に伴い、妊娠高血圧症候群の発生頻度が増加傾向にあることから、その病態発症の機序や原因を解明することは重要な課題であると考えられる。妊娠高血圧症候群の他にも、子宮内発育不全、習慣性流産、胎状奇胎、死産などの妊娠合併症や異常妊娠、さらに不妊症などその原因の多くが明らかになっていないが、増えつつあるこれらの病態の発症機序の解明は、出産の高齢化、出生率の低下が進む日本にとって社会的にも重要な課題である。

胎盤の形成異常や機能不全は妊娠高血圧症候群をはじめ、様々な妊娠病態の要因のひとつとして考えられている[8-11]。胎盤は、ほ乳類の受精卵から最初に分化してくる組織であり、正常な胎盤形成は、妊娠の確立、胎児の発育に必須の過程である。胚が子宮

に着床後、ヒト胎盤の幹細胞である **cytotrophoblast** が **extravillous** または **villous** の 2 つの経路に分かれて分化する (Fig. 1)。 **extravillous** 経路では、基底脱着膜に深く浸潤する増殖性 **invasive trophoblast** に分化し、さらにその一部が、**interstitial trophoblast** または **endovascular trophoblast** に分化、子宮内の間質や血管に浸潤し、胎盤血流の増大を引き起こす。一方、**villous** 経路では、**cytotrophoblast** が細胞融合することによって **syncytiotrophoblast** に分化し、絨毛の表層を構成する [12,13]。 **syncytiotrophoblast** はエストロゲンやヒト絨毛性ゴナドトロピン (**hCG**)、ヒト胎盤性ラクローゲン (**hPL**) などのホルモンを分泌することにより、正常妊娠の継続に寄与している [14-17]。妊娠高血圧症候群ではこれらの 2 つの経路の細胞分化それぞれに異常が見られ、これを端に症状が進行するという報告がなされている [18]。

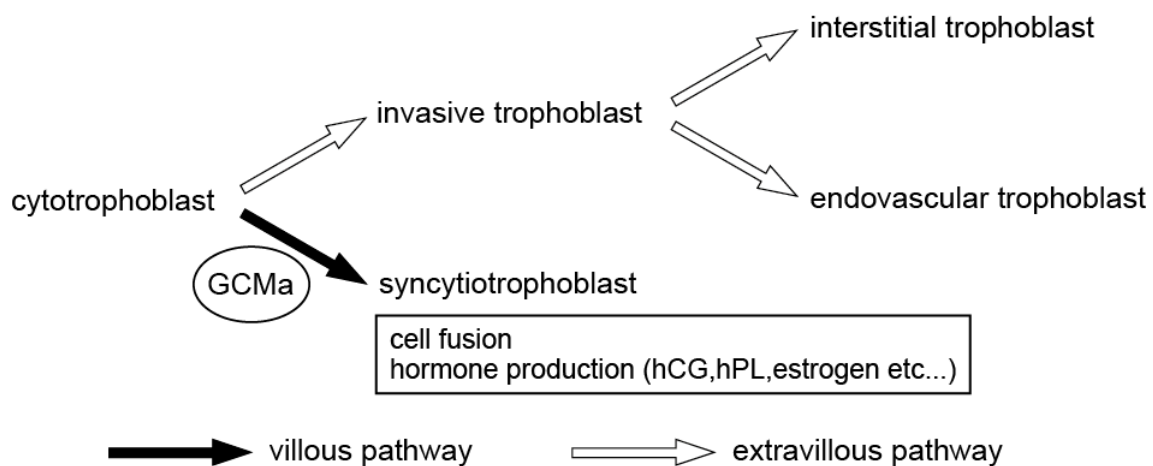


Fig. 1. Differentiation pathways of human cytotrophoblast stem cells.

このような胎盤の分化過程に本研究が対象としている **Glial cells missing a (GCMa)** が関与していることが知られている (Fig. 1)。 **Glial cells missing (GCM)** は N 末端に **GCM** ドメインと呼ばれる特徴的な DNA 結合領域を持つ転写因子ファミリーを形成

しており、生物界に広く存在することが明らかとなっている[19-21]。*glial cells missing* (*gcm*) は *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) でグリア細胞が欠損した突然変異体の原因遺伝子として初めて単離された。GCM の欠損により、神経系のほとんどの細胞がニューロンに分化し、グリア細胞が形成されない。一方、GCM を強制発現させると、発現部位でグリア細胞が過剰形成されることから、GCM は *D. melanogaster* において神経幹細胞からグリア細胞と神経細胞への分化過程を決定する因子であると考えられている[22,23]。またその後の研究により GCM2 の存在が明らかとなり、GCM によるグリア細胞分化を促進すること、GCM と協同して血球前駆細胞の分化に関与していることが報告されている[24-26]。

ほ乳類には GCMa (GCM1) と GCMb (GCM2)、2 種類の GCM ホモログが存在しているが、どちらも神経系での発現は確認されておらず[27,28]、当初ほ乳類での GCMa の機能を推定することが出来なかった。その後の研究から、GCMa は胎盤、GCMb は副甲状腺に主に発現し、それぞれの分化、発達において必須の因子であることが明らかとなった[29,30]。これらのことから、GCM タンパク質は種によって発現部位が異なっており[31]、その機能もそれぞれ異なっていることが推測されるが、共通して、細胞の分化過程に関与し、その支配力が強い傾向にある[32,33]。

GCMa により転写制御される遺伝子のひとつとしてアロマターゼ遺伝子が知られている。アロマターゼはエストロゲンの生成量を制御する律速酵素で、脳、骨、生殖器、皮膚、脂肪組織、胎盤、乳癌など様々な組織で発現、機能している。アロマターゼ遺伝子には 9 種類のエクソン I が存在し、どのエクソン I が使われるかでその組織特異的な発現が制御されている。山田らは胎盤特異的なエクソン I.1 の上流のエンハンサー領域に結合するタンパク質として GCMa を同定し、GCMa の機能を初めて見出した。また

GCMa 結合配列が hCG α や Leptin の遺伝子上流に存在することを明らかにし、GCMa がこれらの遺伝子発現制御に関わっている可能性を示した[34,35]。これまでに、アロママターゼの他、Placental growth factor、Syncytin、Integrin- α 4、Rb-1 などの遺伝子の転写制御に GCMa が関わっていることが報告されており[36,37]、GCMa は様々な遺伝子の胎盤特異的発現を制御していることが推測される。GCMa 遺伝子のノックアウトマウスは、胎児には異常は認められないが、母体と胎児間の栄養やガス、老廃物の交換に重要な胎盤の絨毛構造が形成されず、胎盤機能不全により胎生致死を示す[29,38]。GCMa は絨毛の構成細胞である syncytiotrophoblast 特異的に発現しており[39]、cytotrophoblast から syncytiotrophoblast への分化を制御していることが示唆されている[36,40,41]。

これらのことから、GCMa は胎盤の分化、発達、機能発現に重要な役割を担っていることが示唆されるが、胎盤の分化過程においてどのように GCMa の発現が制御されているのか、その詳細は明らかではない。しかし、GCMa のその予想される機能から、発現量や活性の正確なコントロールは正常な胎盤形成、妊娠に必須であり、GCMa の制御異常は胎盤の形成や機能に異常を来す可能性が考えられる。実際、胎盤機能不全は syncytiotrophoblast を形成する細胞融合の制御異常による可能性が考えられており、GCMa の下流遺伝子である syncytin が関連しているという報告もあることから[42,43]、GCMa の機能が病態の発症に密接に関与していることが推測される。近年、妊娠高血圧症候群の胎盤において GCMa の発現が減少しているという報告がなされ[44,45]、一方で、母体血液中の GCMa mRNA 量が増加しているという報告もあり[46]、GCMa とこの病態との関連が疑われているが、まだ知見も少なく GCMa が病態の発症機序にどのように関与しているのかその詳細は不明である。よって胎盤において GCMa の発現

がどのように調節されているかその機構を明らかにすることは、正常胎盤の発達や機能における分子機序の理解や病態の発症機序の解明に役立つ知見になると考えられる。また病態と GCMa の関連が明らかになれば、病態の診断マーカーとしての GCMa の利用や、新たな治療ターゲットの発見につながるかもしれない。

そこで本研究では、GCMa の発現調節機構の解明を目的とし、はじめに GCMa の解析に有用である特異的抗体の作製を試み、得られた抗体の性状、特性を解析した。また、この抗体を用いたいくつかの解析方法を行い、抗体の利用性を示した。次に、この抗体を用いて、GCMa の発現制御に関わるシグナルについて検討し、それに影響を与えるレセプターの探索を試みた。また、その過程で GCMa がリン酸化されることを見出し、リン酸化に関与するシグナルおよびその生理機能について検討した。

第 2 章 抗 GCMa 抗体 の 作 製

第 1 節 序

GCMa は胎盤に強く発現し、胎盤の発達や機能発現に重要な役割を果たすことから、正常な妊娠、胎児の発育に必須の因子であることが示唆されている。妊娠高血圧症候群、子宮内発育不全、習慣性流産など、妊娠病態の発症メカニズムは未だ多くが不明であるが、その一部は胎盤の形成不全に起因すると考えられており、妊娠高血圧症候群と GCMa の関連を示す報告もいくつかある[45,46]。よって、GCMa に関する詳細な検討を行い、病態との関連性を明らかにすることは、その発症メカニズム解明の端緒となることが期待できる。そのために、組織等における GCMa を検出できる特異的抗体は非常に有用なツールであり、GCMa について検討する際にも役立つと考えられることから、抗 GCMa マウスモノクローナル抗体の作製を試みた。

GCM タンパク質は N 末端に GCM ドメインと呼ばれる特徴的な DNA 結合領域が存在し、種を超えて相同性が高い領域である[47]。一方、C 末端領域は種によって大きく異なり、それぞれの性状や機能の違いを生み出していることが予想される (Fig. 2) [21,31,48]。本研究では、ほ乳類のホモログのひとつである GCMa に対する特異的抗体を得るために、ヒト GCMa の C 末端領域の部分タンパク質を抗原としてマウスに免疫し、ハイブリドーマ細胞を得た。この抗体を用いて種々の解析を行い、この抗体の抗原特異性およびヒト GCMa 認識領域の同定を行った。

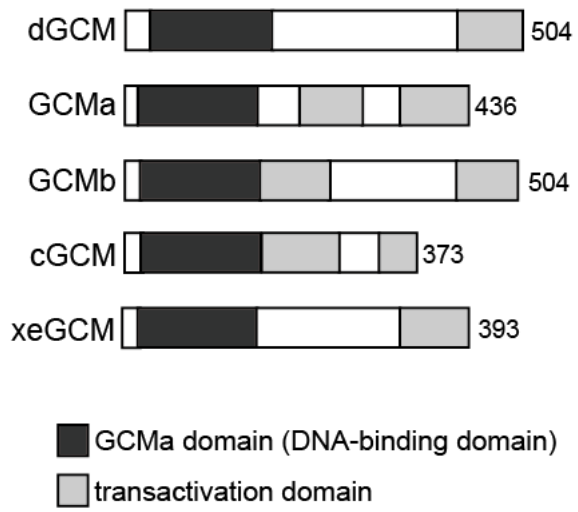


Fig. 2. Overview and domain topology of GCM proteins. Numbers to the right indicate amino acid residues in each GCM protein. dGCM; *Drosophila*, GCMa and GCMb; human and mouse (mammal), cGCM; chicken, xeGCM; *Xenopus laevis*

第 2 節 実験方法

プラスミドの構築

過去にクローニングされたヒト GCMa クローン、B17 の全翻訳領域を[34]、pcDNA3 (Life Technologies, CA, USA) にサブクローニングした B17f/pcDNA を鋳型として、PCR 法を用いてヒト GCMa の各種領域を増幅した。大腸菌でのヒト GCMa の C 末端領域発現プラスミド (B17c/pET-30c) は、ヒト GCMa のアミノ酸残基 177 番目から 436 番目の領域を pET-30c (タカラバイオ, 滋賀) にサブクローニングし作製した。FLAG タグを付加したヒト GCMa の全長、部分欠損変異体およびアミノ酸点変異体発現プラスミドは、pFN21A-Halo Flexi vector (Promega, WI, USA) の Halo タグを制限酵素サイト *NheI* と *SgfI* を用いて FLAG タグに置換した pFN21A-FLAG vector に、相当する DNA 領域をサブクローニングし作製した。

細胞培養

JEG-3 細胞および HEK293T 細胞は American Type Culture Collection (MD, USA) より購入した。JEG-3 細胞は 1 mM sodium pyruvate (和光純薬工業、大阪)、1% MEM Non-Essential Amino Acids (和光純薬工業、大阪)、10% fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (和光純薬工業、大阪) を用い 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。HEK293T 細胞は 10% FCS を含む DMEM (和光純薬工業、大阪) を用い 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

トランスフェクション

HEK293T 細胞を 24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2.0×10^5 個播種し、10% FCS を含む DMEM 500 μ l で培養した。Opti-MEM (Life Technologies、CA、USA) にプラスミド 0.5 μ g と FugeneHD (Promega、WI、USA) 1 μ l を加え 15 分間室温で静置した後、細胞に添加した。

ヒト GCMa C 末端部分タンパク質の調製

大腸菌 BL21 に B17c/pET-30c を導入し、2%エタノールと 0.2% isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside でタンパク質発現を誘導した。回収した沈殿物を protease inhibitor cocktail for use with bacterial cell extracts (Sigma Aldrich、MO、USA) を含む B-PER protein extraction reagents (Thermo Fisher Scientific、IL、USA) で懸濁し、10 分間音波処理した。得られた沈殿物を protease inhibitor を含む 10% B-PER で再懸濁、音波処理し、遠心後回収した沈殿物を PBS で懸濁し抗原とした。マウスへの免疫およびハイブリドーマ細胞の樹立はモノクローナル抗体研究所(横浜)に委託した。抗 GCMa 抗体産生ハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、その培養上清を用いてイムノブロットにより行った。

抗体のサブタイプの判定

IsoQuick Strips and Kits for Mouse Monoclonal Isotyping (Sigma Aldrich、MO、USA) を用いて行った。

免疫組織染色

正常分娩を経たヒト終期胎盤（妊娠期間 41 週）をホルマリン固定し、パラフィン包埋後、組織切片を作製した。脱パラフィン処理後、1 mM EDTA 中で 120°C、15 分間オートクレーブ処理した。次いで、0.3%メタノールを含む H₂O₂ で 30 分間処理後、スキムミルク液を用いてブロッキングした。抗 GCMa 抗体を加え室温で 2 時間インキュベーションした後、ビオチン標識 2 次抗体を加え室温で 30 分間インキュベーションした。シグナルは Vectastain ABC elite kit (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて検出した。

イムノブロット

ヒトおよびマウスの胎盤組織は 0.3% proteinase inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, MO, USA) を含む cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate) を加えホモジナイズした。2× SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl [pH6.8]、10% 2-mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.01% bromo phenol blue) を等量加え、95°C で 5 分間処理した。HEK293T 細胞および JEG-3 細胞は cell lysis buffer を用いて回収し、細胞上清を超音波処理した。上清を遠心濃縮し、1×SDS sample buffer を加え、95°C で 5 分間処理した。8%、10%または 12%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、transfer buffer (192 mM glycine、25 mM Tris、20% methanol) 中、40 V で一晩 polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (EMD Millipore, MA, USA) に転写した。メンブレンはスキムミルク液 (5% skimmed milk、0.05% Tween-20 in PBS) でブロッキングした後、一次抗体を加え室温で 1 時間または

4℃で一晩インキュベーションした。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を加え室温で 1 時間インキュベーションし、シグナルは ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Science Co., NJ, USA) または ImmunoStarLD reagents (和光純薬工業、大阪) を加えインキュベーションした後、フィルムに露光し Fujifilm FPM 100 (富士フィルム、東京) を用いて検出した。

タンパク質の定量

ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) を用いて定量した。

第3節 結果

抗 GCMa 抗体の抗原特異性の検討

GCM タンパク質において相同性の低い C 末端領域にあたる、ヒト GCMa のアミノ酸残基 177 番目から 436 番目の領域を大腸菌で発現させ、部分精製したものを抗原としてマウスに免疫し、ハイブリドーマ細胞を得た。抗 GCMa 抗体を産生する陽性クローンは、大腸菌で発現させたヒト GCMa 全長タンパク質をサンプルとして、ハイブリドーマ細胞の培養上清を抗体として用いたイムノブロットによりスクリーニングした。その結果、13H1F4、7B6C11、1G4F8 の 3 クローンを得、最もシグナルの強かった 7B6C11 を用いて更なる検討を行った。

初めに、7B6C11 の産生する抗体のサブタイプを調べたところ、IgG1 であった。この抗体の抗原特異性について、ヒト GCMa を強制発現させた種々の細胞、内在性 GCMa を発現する細胞株および胎盤組織をサンプルとして用い、イムノブロットを行った (Fig. 3)。ヒト GCMa を発現させた大腸菌 (レーン 1)、昆虫細胞 sf9 (レーン 2)、HEK293T 細胞 (レーン 3) で GCMa に相当する約 50 kD のバンドが検出された。またヒト胎盤由来 JEG-3 細胞 (レーン 4) およびヒト胎盤組織ホモジネート (レーン 5) で内在性レベルの GCMa を検出することができた。さらに、マウス IgG (レーン 7) と比較して、マウス胎盤組織ホモジネート (レーン 6) で GCMa に特異的なバンドが検出されたことから、この抗体はヒトおよびマウス GCMa を認識することが明らかとなった。

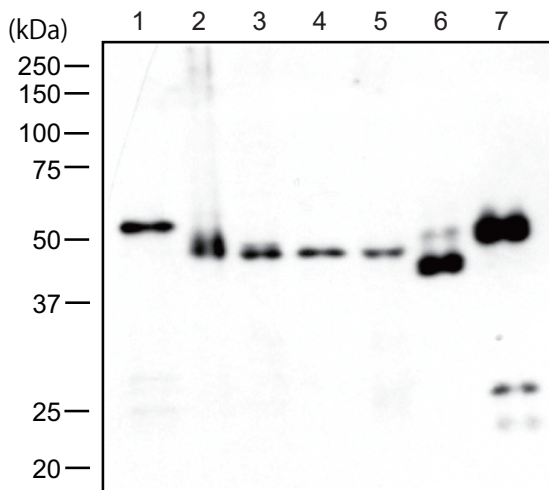


Fig. 3. Specificity of the anti-GCMa antibody from clone 7B6C11. A, Detection of human and mouse GCMa by immunoblot using the anti-GCMa antibody produced by the 7B6C11 clone. Lane 1, recombinant human GCMa (hGCMa) prepared from LB21 *E. coli*; Lane 2, from Sf9 insect cells; Lane 3, from HEK293T cells; Lane 4, homogenates of JEG-3 cells; Lane 5, human term placenta; Lane 6, mouse placenta in ED 8 days; Lane 7, mouse IgG as a comparison to the mouse GCMa.

ヒト胎盤絨毛組織の免疫組織染色

次に、得られた抗 GCMa 抗体を用いて、ヒト胎盤絨毛組織（妊娠期間 41 週）のパラフィン切片の免疫組織染色を試みた。コントロールのマウス IgG と比較し、抗 GCMa 抗体を用いたとき、絨毛表層の Syncytiotrophoblast が特異性をもって染色されることがわかった（Fig. 4）。これまでに GCMa は Syncytiotrophoblast に発現していることが報告されており [39,49]、この抗体が組織切片中の GCMa を特異的に検出できることが示唆された。

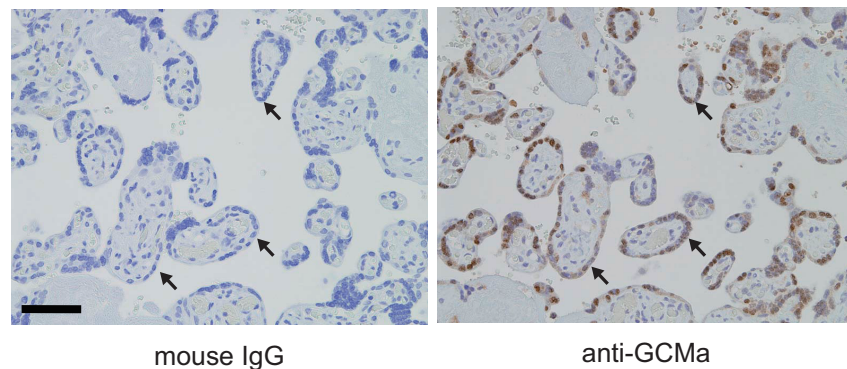
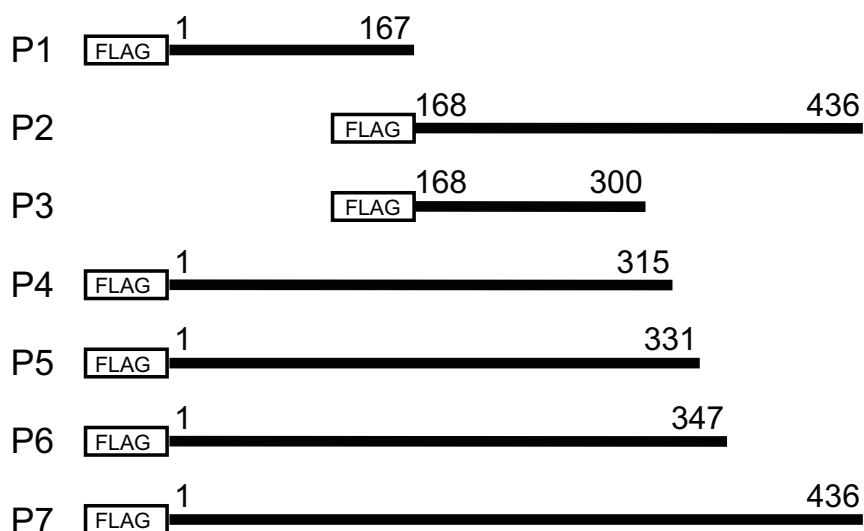


Fig. 4. Immunohistochemistry of human term placental villi. Syncytiotrophoblast cells (arrows) are stained positive for anti-GCMa in human placental villi. Sections of human term placental villi were stained with mouse IgG (mouse IgG) or the anti-GCMa antibody (anti-GCMa). Bar, 200 μ m.

抗 GCMa 抗体のヒト GCMa における認識領域の同定

得られた抗 GCMa 抗体のヒト GCMa 上の認識領域を検討するため、FLAG タグを付加したヒト GCMa の各種 C 末端欠損変異体発現プラスミドを構築した (Fig. 5A)。これらを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、回収した細胞上清を用いイムノブロットを行った。はじめに、これら P1-P7 変異体のタンパク質発現を調べるため、抗 DYKDDDDK (FLAG) 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA) を用いて検討したところ、それぞれの変異体の推定分子量付近に特異的なバンドを確認した (Fig. 5B)。次に、どの変異体タンパク質が抗 GCMa 抗体によって認識されるか検討したところ、P2、P6 および P7 の変異体がそれぞれ検出されたのに対し、P5 の変異体は検出されなかった。よって、この抗体の認識領域がヒト GCMa 上のアミノ酸残基 332 番目から 347 番目の配列内にあることが示唆された (Fig. 5B)。

A



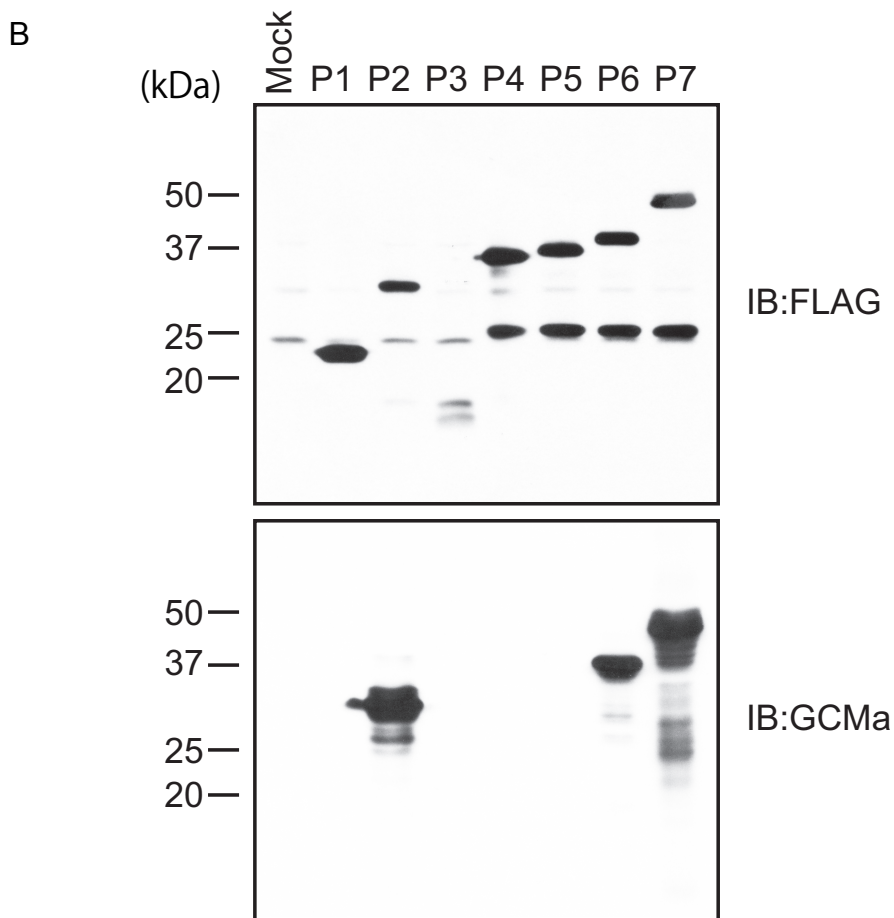


Fig. 5. (A) Diagrams showing the expressed proteins for the epitope mapping analyses of hGCMa. The FLAG-tagged proteins encoded by each expression construct (p1, p2, p3, p4, p5, p6 and p7) correspond to amino acid residues 1-167, 168-436, 168-300, 1-315, 1-331, 1-347 and 1-436 of hGCMa, respectively. (B) Immunoblot showing the anti-GCMA antibody recognition site(s) in hGCMa. HEK293T cells were transfected with pF4A-Stop (Mock) or the plasmids indicated above. The cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-FLAG tag (upper) or anti-GCMA antibody (lower).

第4節 考察

GCMa に対する特異的抗体の作製を試みた結果、GCMa を認識するマウスモノクローナル抗体を得る事ができ、イムノブロット、免疫沈降法、免疫組織染色などに十分利用できることを明らかにした (Fig. 3,4,21)。このとき、得られた抗体によって強制発現による組み換えタンパク質だけでなく、胎盤由来株化細胞である JEG-3 細胞や胎盤組織に発現している内在性レベルの GCMa を検出できることがわかった。また、ヒト GCMa およびマウス GCMa はホモロジーが 98% と高いため、抗体はどちらの種の GCMa も認識することがわかった。しかし、ヒトとマウスの GCMa はタンパク質の推定分子量が等しいにも関わらず、今回の結果では移動度が異なっており、細胞内での修飾や他のタンパク質との相互作用の違いが影響している可能性が考えられた。チンパンジー、イヌ、ウマなどの GCM オーソログもヒトとのホモロジーが高く、ヒトおよびマウス以外のは乳動物の GCM 解析にも利用できる可能性が考えられる。

この抗体の抗原認識領域はヒト GCMa 上のアミノ酸残基 332 番目から 347 番目の配列内に存在することが明らかになった (Fig. 5)。これまでに GCMa 全体の立体構造は明らかになっていないが、この領域は過去の報告から C 末端側の核内移行シグナルおよび転写活性化ドメイン近傍に位置していること [50]、また、今回得られた抗体による認識領域であることから GCMa の立体構造の表面に位置している可能性が考えられる (Fig. 6)。

本研究ではこの抗体を用いて、パラフィン組織切片中の GCMa を特異的に検出することができた (Fig. 4)。このことは、保存されている種々の妊娠病態の胎盤組織標本において GCMa の発現レベルを検討可能であることを示しており、妊娠病態と GCMa

の関連解明に貢献できる可能性がある。本研究では、この抗体を用いてイムノブロットと免疫組織染色を行ったが、フローサイトメトリーや ELISA など他の解析方法に利用可能であれば、GCMa に関する研究に非常に有用なツールとなると考えられる。

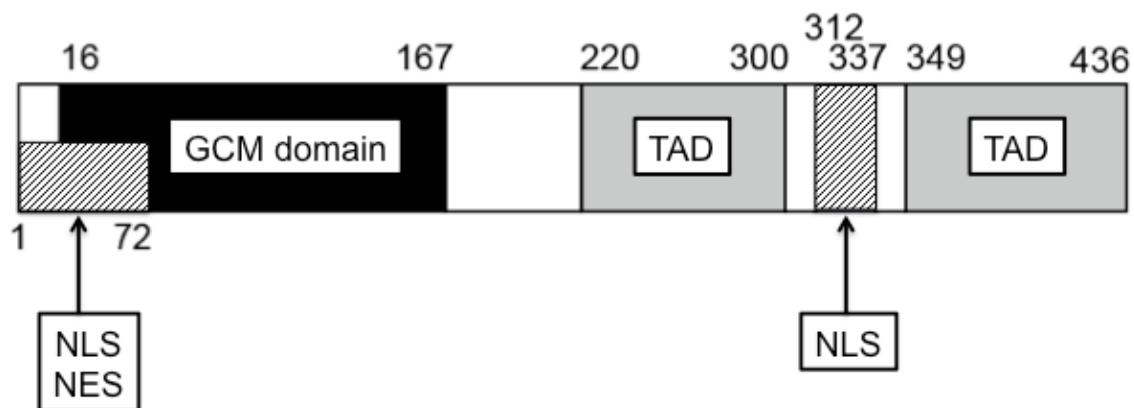


Fig. 6. The structure of human GCMa. GCM domain is the unique DNA-binding domain in the GCM transcription factor family. TAD; transactivation domain, NLS; nuclear localization signal, NES; nuclear export signal.

第 3 章 GCMa の発現調節におけるシグナルと GCMa リン酸化に関する検討

第 1 節 序

GCMa の発現調節機構について近年いくつかの報告がなされ、転写レベルでの調節および様々な翻訳後修飾による調節などが関与していることが明らかとなってきた。特に、GCMa の機能制御と cyclic AMP (cAMP) シグナルとの関連についてはよく研究されている。GCMa の転写調節領域には cAMP response element (CRE) が存在し、これを介して cAMP/ protein kinase A (PKA) シグナル依存的な転写活性調節を受ける [51,52]。また GCMa が cAMP response element-binding protein-binding protein (CBP) によってアセチル化されることで、ユビキチン化レベルが減少しタンパク質の安定性が増加する [53]。GCMa は glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) により 322 番目のセリン残基がリン酸化されることにより分解系が促進されるが [54,55]、PKA 依存的な 269 番目および 275 番目のセリン残基のリン酸化を介して dual-specificity phosphatase 23 (DUSP23) との相互作用が促進されることにより、分解抑制に働く [56]。以上のことから、cAMP/PKA シグナルは GCMa の発現量および活性を増加させる方向に働いていることが示唆されている。cAMP/PKA シグナルは hCG の産生増加や細胞融合の促進など、cytotrophoblast から syncytiotrophoblast への分化を誘導することが知られており [52,57,58]、その分子機構のひとつとして、GCMa の活性上昇が考えられている。しかし、cAMP/PKA シグナルが生理的にどのように活性化されるかその詳細は不明である。

一方、protein kinase C (PKC) 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) も細胞融合や hCG 産生を増加させることが報告されたが[59-62]、これに GCMa がどのように関与しているのかは明らかではない。また GCMa 発現調節への PKC シグナルの関与は現在のところ報告されていない。

そこで本研究では、cAMP/PKA シグナルを介した GCMa の活性化を引き起こす細胞外シグナルの同定を試みた。これまでの報告はヒト胎盤由来 BeWo 細胞を用いたものが多いので、同系列の細胞株である JEG-3 細胞において cAMP シグナルの GCMa への影響が見られるか確認し、各種レセプターリガンド刺激による GCMa の発現量の変化を検討した。次に、PKC シグナルの GCMa 発現に及ぼす影響を調べるため、JEG-3 細胞を PMA で処理し、GCMa のタンパク質量および mRNA 量を検討した。また、このとき、GCMa がリン酸化されることが明らかとなったので、それに関与するシグナルおよびその生理的機能について検討を行った。

第 2 節 実験方法

試薬

forskolin (FSK)、PMA、cycloheximide (CHX)、dimethyl sulfoxide (DMSO)、U0126、 17α -estradiol、 17β -estradiol、hCG および抗 DYKDDDDK tag モノクローナル抗体は和光純薬工業（大阪）より購入した。AG1478、Bisindolylmaleimide-I は Calbiochem (CA, USA) より購入した。MG132、Butaprost、Cloprosterol、I-BOP は Cayman Chemicals (MI, USA) より購入した。Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) (AnaSpec Inc., CA, USA)、Ro-31-8220 (Biomol International, PA, USA)、 Na_3VO_4 (ナカライテスク、京都)、epidermal growth factor (EGF) (ヒゲタ醤油、東京)、insulin-like growth factor 1 human recombinant (IGF-I) (ProSpec, Rehovot, Israel)、human insulin like growth factor-II (IGF-II) (PeproTech, NJ, USA) をそれぞれ購入した。 λ -phosphatase (λ PPase) は New England Biolabs (MA, USA) より購入した。抗 DYKDDDDK (FLAG-tag) 抗体、抗 phospho-CREB (ser133) 抗体、抗 β -actin 抗体、抗 p44/42 MAPK (extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)) 抗体、抗 phospho-p44/42 MAPK (pERK1/2) 抗体、抗 Ubiquitin 抗体は Cell Signaling Technology (MA, USA) より購入した。ONO-AE1-329 は小野薬品工業（大阪）より提供された。

細胞培養

JEG-3 細胞および HEK293T 細胞は American Type Culture Collection (MD, USA) より購入した。JEG-3 細胞は 1 mM sodium pyruvate (和光純薬工業、大阪)、1% MEM

Non-Essential Amino Acids (和光純薬工業、大阪)、10% FCS を含む DMEM (和光純薬工業、大阪) を用い 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。HEK293T 細胞は 10% FCS を含む DMEM (和光純薬工業) を用い 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

細胞の薬剤による処理

JEG-3 細胞は 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1.0×10^5 個播種した。FCS を含まない培養液に交換し薬剤を添加した。HEK293T 細胞はトランスフェクション後、FCS を含まない培養液に交換し、薬剤を添加した。

トランスフェクション

HEK293T 細胞を 24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2.0×10^5 個播種し、10% FCS を含む DMEM 500 μ l で培養した。Opti-MEM (Life Technologies、CA、USA) にプラスミド 0.5 μ g と FugeneHD (Promega、WI、USA) 1 μ l を加え 15 分間室温で静置したのち、細胞に添加した。

イムノブロット

HEK293T 細胞および JEG-3 細胞は cell lysis buffer を用いて回収し、細胞上清を超音波処理した。上清を遠心濃縮し、1×SDS sample buffer を加え、95°C で 5 分間処理した。8%、10%または 12%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離し、transfer buffer 中、40 V で一晩 PVDF メンブレン (EMD Millipore、MA、USA) に転写した。メンブレンはスキムミルク液でブロッキングした後 1 次抗体を加え、室温で 1 時間または 4°C で一晩インキュベーションした。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を加

え室温で1時間インキュベーションし、シグナルは ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Science Co., NJ, USA) または ImmunoStarLD reagents (和光純薬工業、大阪) を加えインキュベーションした後、フィルムに露光し Fujifilm FPM 100 (富士フィルム、東京) を用いて検出した。検出したバンドの強度は画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化した。

タンパク質の定量

ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) を用いて定量した。

RNA 抽出および定量的 RT-PCR

JEG-3 細胞を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 0.85×10^5 個播種した。FCS を含まない培養液に交換し、各種薬剤で処理した。細胞を PBS で洗浄後、TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Upper Bavaria, Germany) 300 μ l で回収し、プロトコールに従い total RNA を精製した。Total RNA 300 ng をテンプレートとし、PrimeScriptII 1st strand cDNA Synthesis kit (タカラバイオ、滋賀) を用いて cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) を用い GCMa (Hs00172692_m1) の mRNA を定量した。内在性コントロールとして 18s rRNA (Pre-Developed TaqMan Assay Reagents) を用いた。

GCMa リン酸化の検出

SDS-PAGE サンプルを 15 μ M Phos-tag acrylamide (ナード研究所、広島) を含む

8%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルを 1 mM EDTA (pH8.0)を含む transfer buffer 中で 10 分間振とう後、transfer buffer で洗浄した[63]。その後、通常のイムノブロットと同様、PVDF メンブレンに転写し、目的のバンドを検出した。

パルスチェイス実験

JEG-3 細胞は FCS を含まない培養液に交換し、Ro-31-8220、U0126 または MG132 で 10 分間処理した後、CHX と DMSO、PMA または EGF いずれかを加え 4 時間培養した。HEK293T 細胞はヒト GCMa の全長およびアミノ酸点変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、14 時間後、FCS を含まない培養液に交換し、CHX と PMA を加え 2 時間または 4 時間処理した。細胞を回収し、イムノブロットにより GCMa タンパク質量を検討した。

統計学的解析

データはエクセル統計を用い、一次元配置分散分析および Turkey、または Kruskal-Wallis および Sheffe の多重検定を行った。

ELISA によるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の定量

JEG-3 細胞を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1.5×10^5 個播種した。FCS を含まない培養液に交換し、薬剤を加え 24 時間処理後、培養液を回収した。培養液中の hCG 量を Chorionic Gonadotropin, Human, ELISA kit (Immunospec Corporation, CA, USA) を用いて測定した。

免疫沈降法

HEK293T 細胞を 10 cm 径シャーレに 6.0×10^6 個播種し、10%FCS を含む DMEM 10 ml で培養した。FLAG タグを付加した野生型 GCMa (GCMa WT) 発現プラスミド 5 μg をトランスフェクションし、48 時間培養後、細胞を回収した。Universal Magnetic Co-IP Kit (Active Motif、CA、USA) のプロトコールに従い、抗 GCMa 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物は、長寿ゲル (蛋白用グラジェントゲル ; 5-20%) (オリエンタルインスツルメンツ、東京) を用いた SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。1 次抗体に抗 Ubiquitin 抗体 (Cell Signaling Technology、MA、USA) または抗 DYKDDDDK tag モノクローナル抗体 (和光純薬工業、大阪)、2 次抗体に Clean-Blot IP Detection Reagent (Thermo Fisher scientific、IL、USA) を用い、イムノブロットを行った。

ルシフェラーゼアッセイ

HEK293T 細胞を 24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2.0×10^5 個播種し、10% FCS を含む DMEM 500 μl で培養した。ヒト GCMa またはその変異体発現プラスミド 0.25 μg 、GCMa 結合配列-ACCCTCAT-の 5 回リピート配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL-5xGBS) 0.25 μg 、レファレンスプラスミド (pGL-luc) (Promega、WI、USA) 0.001 μg をトランスフェクションし、17 時間培養後、FCS を含まない培養液に交換し、薬剤を加え 6 時間処理した。Passive Lysis Buffer (Promega、WI、USA) で細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega、WI、USA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

第3節 結果

GCMa 発現調節における cAMP シグナルの関与

胎盤において、cAMP シグナルの活性化が syncytiotrophoblast の分化を促進することが知られている。そこでヒト胎盤由来 JEG-3 細胞において cAMP シグナルによる GCMa の発現増加が見られるか検討した。アデニル酸シクラーゼに直接結合、活性化させ、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる FSK で JEG-3 細胞を処理し、内在性 GCMa のタンパク質量の変化をイムノブロットにより調べたところ、FSK 処理により増加することがわかった。また cAMP のエフェクターのひとつである PKA の阻害剤 H-89 で前処理すると、FSK 処理による GCMa の増加が抑制された (Fig. 7,8A)。PKA の細胞内基質のひとつである cAMP response element binding protein (CREB) は、リン酸化により活性化されることが知られている。そこで FSK 処理した細胞で、CREB の活性化が起こっているか、抗リン酸化 CREB 抗体を用いて CREB のリン酸化レベルを調べた。その結果、CREB のリン酸化は FSK 処理により増加し、PKA 阻害剤である H-89 による前処理によってその増加が抑制された (Fig. 7,8B)。

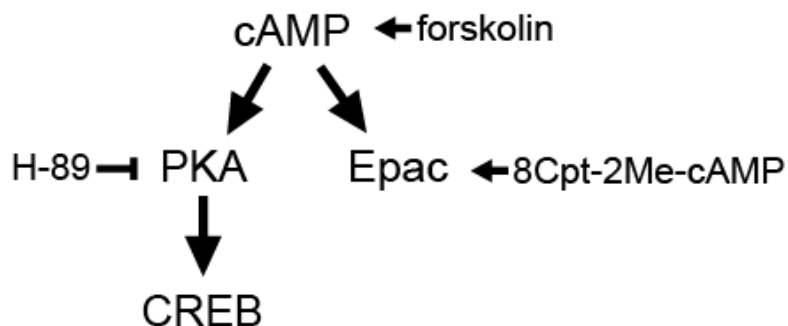


Fig. 7. Scheme of cAMP-dependent pathway. Activators, forskolin is for cAMP and 8Cpt-2Me-cAMP is for Epac. H-89 is an inhibitor for PKA.

一方、cAMP のもうひとつの細胞内基質である Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の特異的活性化剤である 8Cpt-2Me-cAMP で JEG-3 細胞を処理したとき、GCMa のタンパク質量に変化は見られなかった (Fig. 9)。以上の結果から、JEG-3 細胞において cAMP が PKA を介して GCMa の発現に影響を及ぼすことが示唆された。

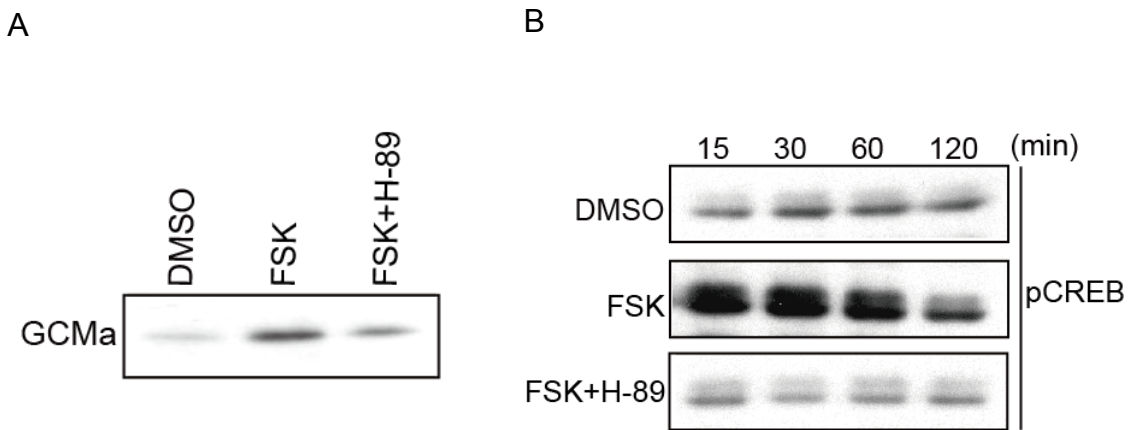


Fig. 8. GCMa protein level is upregulated by cAMP/PKA-dependent pathway. (A) JEG-3 cells were incubated with FSK (1 μM) for 6 h with or without pretreatment with H-89 (20 μM) for 10 min. The cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-GCMa antibody. (B) JEG-3 cells were treated with FSK (1 μM) for the indicated times with or without pretreatment with H-89 for 10 min. The cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-phospho-CREB (ser133) antibody.

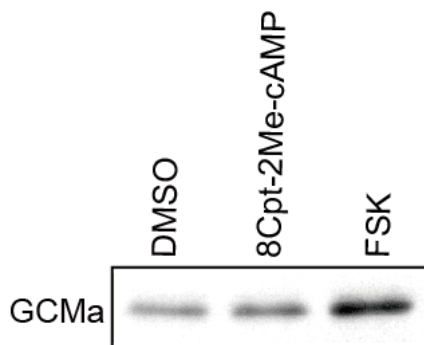


Fig. 9. Regulation of GCMa protein level is independent on Epac. JEG-3 cells were treated with 8Cpt-2Me-cAMP (100 μM) or FSK (1 μM) for 6 h and the cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-GCMa antibody.

次に、cAMP/PKA シグナル依存的な GCMa の発現増加に、転写レベルの調節機構が関与しているか、GCMa mRNA 量の変化を定量的 RT-PCR を用いて調べた。その結果、コントロールの細胞に比べ、FSK 処理 2 時間後の細胞で 5.9 倍、6 時間後の細胞で 2.1 倍と増加していることが明らかになった (Fig. 10)。これまでの結果から、JEG-3 細胞において、cAMP/PKA シグナルは GCMa 遺伝子の転写を活性化し、GCMa タンパク質量を増加させていることが考えられた。また、mRNA の増加が FSK 処理後早い段階で起こっていることから、CREB が直接 GCMa の転写調節に関わっていることが示唆された。

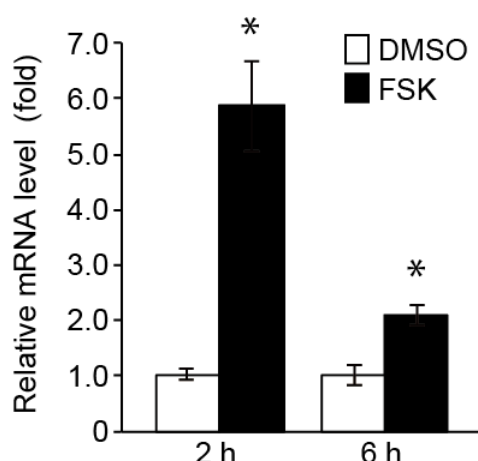


Fig. 10. GCMa mRNA level is upregulated by FSK treatment in JEG-3 cells. JEG-3 cells were incubated with DMSO (0.1%) or FSK (1 μ M) for 2 or 6 h. The RNAs were isolated and analyzed GCMa mRNA level using TaqMan gene expression assays. The asterisks indicate significant differences from the DMSO-treated sample ($p < 0.05$).

GCMa 発現調節に関わる細胞外シグナルの探索

cAMP/PKA シグナルが GCMa の発現制御に関わっていることが明らかになったことから、この機構が生理的にどのように機能しているか探るため、cAMP/PKA シグナルを活性化する細胞外シグナルの探索を試みた。胎盤に発現し様々な作用を持つことが知られており、且つ cAMP シグナルを活性化する三量体 GTP 結合タンパク質の $G\alpha_s$ と共役する各種レセプターに対するリガンドで JEG-3 細胞を処理し、GCMa のタンパク質発現量を調べたが (Fig. 11)、有意に GCMa の発現量を変化させるものを見出すこ

とができなかった。

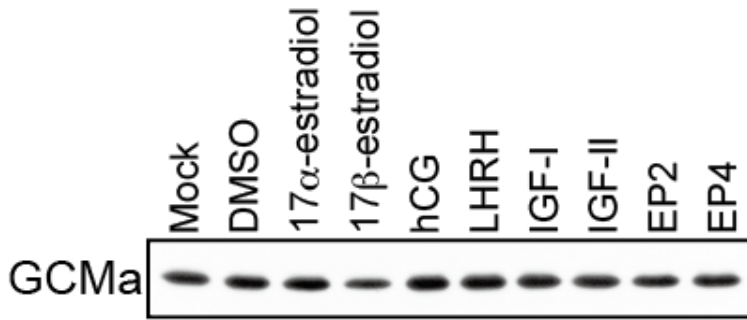


Fig. 11. Influence of various ligands on GCMa protein in JEG-3 cells. JEG-3 cells were treated with indicated ligands for 24 h. The cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-GCMa antibody. DMSO (0.1%), 17 α -estradiol (0.1 mM),

17 β -estradiol (0.1 mM), human chorionic gonadotropin (hCG) (10 mU/ μ l), luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) (1 μ M), insulin-like growth factor-I (IGF-I) (1 μ M), insulin-like growth factor-II (IGF-II) (1 μ M), Butaprost (EP2) (10 μ M), ONO-AE1-329 (EP4) (10 μ M), TXA₂ (I-BOP) (1 μ M), Cloprosterol (PGF2 α) (1 μ M).

GCMa 発現調節における PMA の影響

近年、JEG-3 細胞と同系列の BeWo 細胞を PKC 活性化剤である PMA で処理することにより、syncytiotrophoblast 分化の指標として用いられる細胞融合や hCG 産生の増加が報告され[59]、cAMP シグナルの他に PKC シグナルが syncytiotrophoblast の分化促進に関与している可能性が示された。そこでまず、これらの現象が JEG-3 細胞においても見られるかどうかを調べるため、JEG-3 細胞を PMA 処理し、hCG 量を測定した (Fig. 12)。その結果、DMSO 処理したコントロールの細胞に比べ、PMA 処理した細胞では hCG 量が 2.3 倍増加した。山田らにより、hCG α 遺伝子の転写調節領域に GCMa 結合領域が存在することが見出されていることから、PMA 処理による hCG 量増加の分子機構には、GCMa による何らかの影響がある可能性が考えられた。一方、FSK 処理により hCG 量は 12.2 倍増加した。これは hCG α 遺伝子の転写調節領域に存在する cAMP response element (CRE) を介し転写が促進されたためと考えられる。

細胞融合に関しては JEG-3 細胞では起こらないことが報告されており [64,65]、PMA および FSK 処理のそれぞれでやはり観察されなかった。

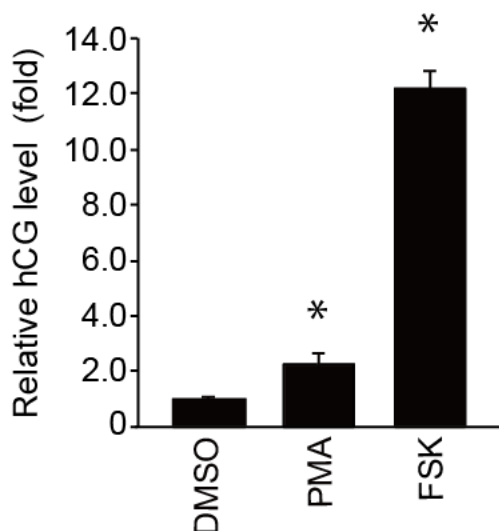


Fig. 12. hCG level is increased by PMA treatment in JEG-3 cells. JEG-3 cells were incubated with PMA (10 μ M) or FSK (1 μ M) for 24 h. The hCG amounts of collected supernatants were analyzed by ELISA. The asterisks indicate significant differences from the DMSO-treated sample ($p < 0.05$).

次に、PKC シグナルが GCMa のどのレベルでの調節に影響を及ぼしているか検討するため、JEG-3 細胞を PMA 処理し、GCMa タンパク質量の変化を調べた。その結果、DMSO 処理したコントロールの細胞に比べ、PMA 処理 1 時間後から減少し、6 時間後にはコントロールと同程度に回復した (Fig. 13A)。バンド強度を数値化し統計解析したところ、PMA 10 μ M で 1 時間処理したときコントロールの細胞に比べ有意に減少していることがわかった (Fig. 13B)。

そこで、PMA の GCMa の転写レベルに対する影響を調べるため、GCMa mRNA 量の変化を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、GCMa mRNA 量は PMA の濃度依存的に、また時間経過とともに減少する傾向が見られた (Fig. 14)。GCMa タンパク質量は PMA 処理 6 時間後には、コントロールに対して差がないことから、mRNA 量とタンパク質量の関係が単純な正相関ではないと考えられた。

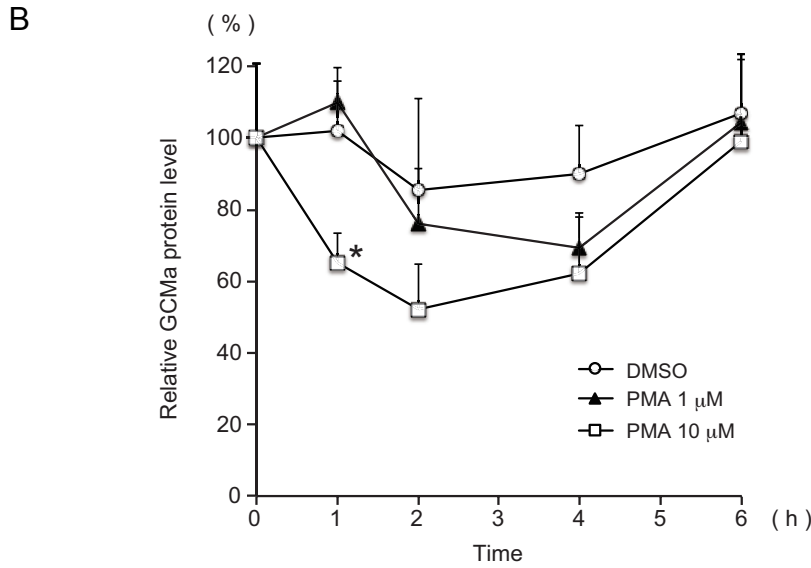
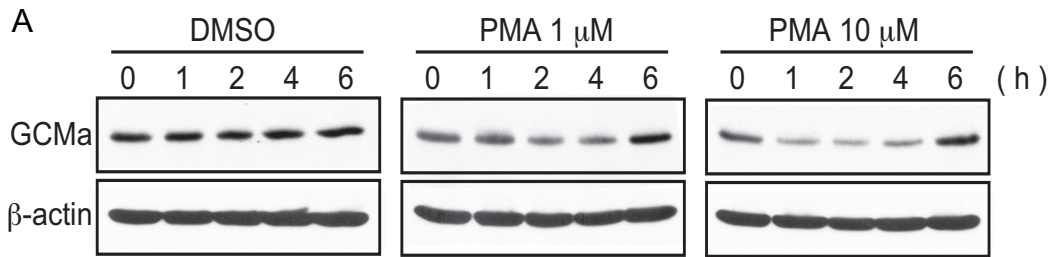


Fig. 13. PMA transiently decreases the GCMa protein level in JEG-3 cells. (A) Representative immunoblot bands showing GCMa protein levels from JEG-3 cells treated with DMSO (0.1%) or PMA (1 or 10 μM) for the indicated time. (B) Semi-quantitative analysis of the band intensity from (A) showing the transient decrease in the GCMa protein level in the PMA-treated cells. Relative values are shown as the mean \pm S.D. from three separate experiments. The asterisk indicates a significant difference from the DMSO-treated sample ($p < 0.05$).

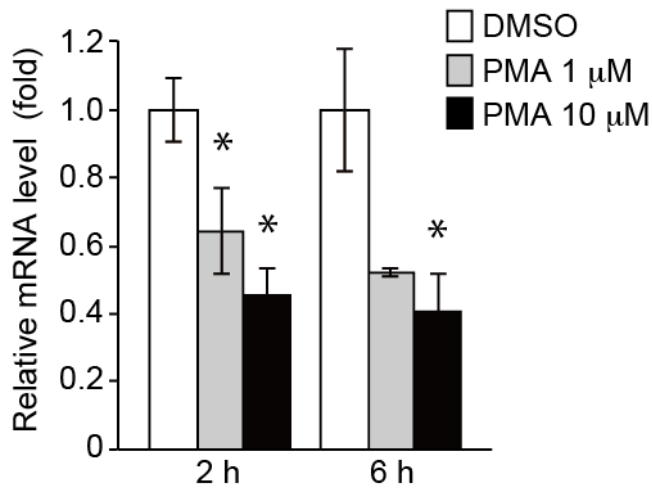


Fig. 14. GCMa mRNA level is decreased by PMA treatment in JEG-3 cells. JEG-3 cells were incubated with DMSO (0.1%), PMA (1 μM) or PMA (10 μM) for 2 or 6 h. The RNAs were isolated and analyzed for GCMa mRNA level using TaqMan gene expression assays. The asterisks indicate significant differences from the DMSO-treated sample ($p < 0.05$).

PMA の GCMa 分解に対する影響

GCMa タンパク質量は PMA 処理 1 時間後という早い時間に減少することから、mRNA 量の減少による影響だけでなく、タンパク質分解系の促進による影響が考えられた。そこで、タンパク質合成阻害剤である CHX 存在下で、PMA 処理による内在性 GCMa のタンパク質量に対する影響について検討した (Fig. 16)。JEG-3 細胞を CHX 存在下 PMA 処理すると、わずかに GCMa タンパク質量が減少した。過去の報告から、BeWo 細胞において PMA は PKC および MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) /ERK シグナルを活性化することが知られている [59]。これらのシグナルの PMA による GCMa 分解促進への関与について調べるため、PKC 阻害剤である Ro-31-8220 および MEK 阻害剤である U0126 を用い検討した (Fig. 15)。その結果、両阻害剤で前処理することにより、PMA による GCMa タンパク質減少促進が抑制された。さらに、GCMa はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが報告されており [54]、プロテアソーム阻害剤である MG132 の前処理により GCMa タンパク質量の減少が完全に抑制されることが確かめられた。

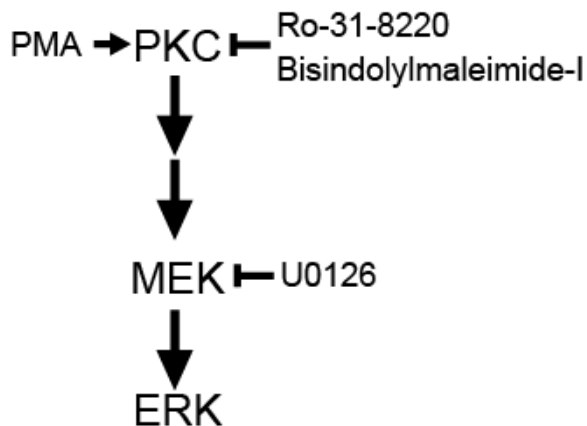


Fig. 15. Scheme of PKC-dependent pathway. PMA is an activator for PKC. Inhibitors, Ro-31-8220 and Bisindolylmaleimide-I are for PKC, and U0126 is for MEK.

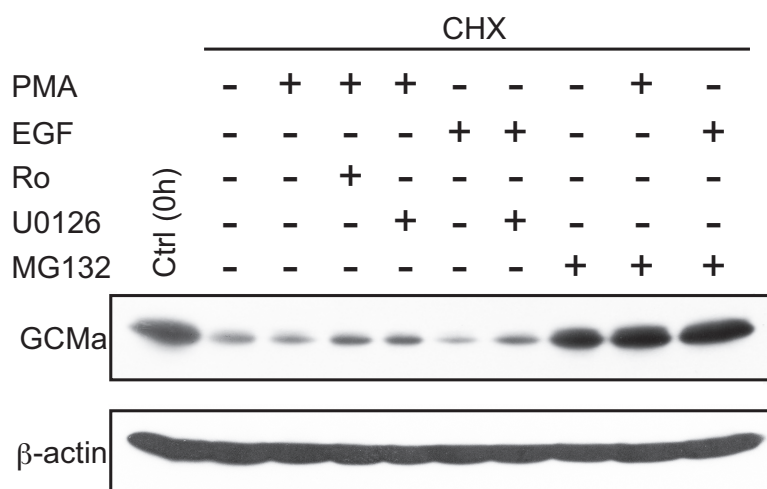


Fig. 16. PMA- or EGF-induced decrease in the GCMa protein level is partially blocked by a PKC or MEK inhibitor. JEG-3 cells were treated with CHX (10 μ g/ml) and DMSO (0.1%), PMA (10 μ M) or EGF (20 ng/ml) for 4 h following preincubation for 10 min with or without Ro-31-8220 (Ro) (200 nM), U0126 (20 μ M), or MG132 (10 μ M). The cell lysates were analyzed by immunoblot using the anti-GCMa antibody.

PMAによるGCMaのリン酸化

過去に、GSK-3 β によるGCMaのリン酸化がGCMa分解を促進することが報告されており、PMAによるGCMa分解にもGCMaのリン酸化が関与している可能性が考えられた。そこで、リン酸化タンパク質のSDS-PAGEの移動度を変化させるPhos-tagアクリルアミドを用いて、PMA処理によるGCMaのリン酸化の変化について検討した。その結果、PMAの濃度依存的にリン酸化GCMaのバンドが増加し (Fig. 17A)、その増加のピークはPMA処理後30分であった (Fig. 17B)。一方、FSKについても検討してみたが、FSK処理によるリン酸化GCMaのバンドの有意な変化は見られなかった (Fig. 17A)。リン酸化GCMaのバンドが、本当にGCMaのリン酸化によって生じたバンドであるか確かめるため、脱リン酸化酵素 λ PPaseおよび脱リン酸化酵素阻害剤Na₃O₄Vを用いて、リン酸化GCMaのバンドに変化があるかどうか調べた (Fig. 17C)。

その結果、 λ PPase処理により、PMA 処理によるリン酸化 GCMa の増加が抑制され、これは $\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$ による前処理によって阻害されることが明らかとなったことから、リン酸化 GCMa のバンドが GCMa のリン酸化によって生じたものであることがわかった。

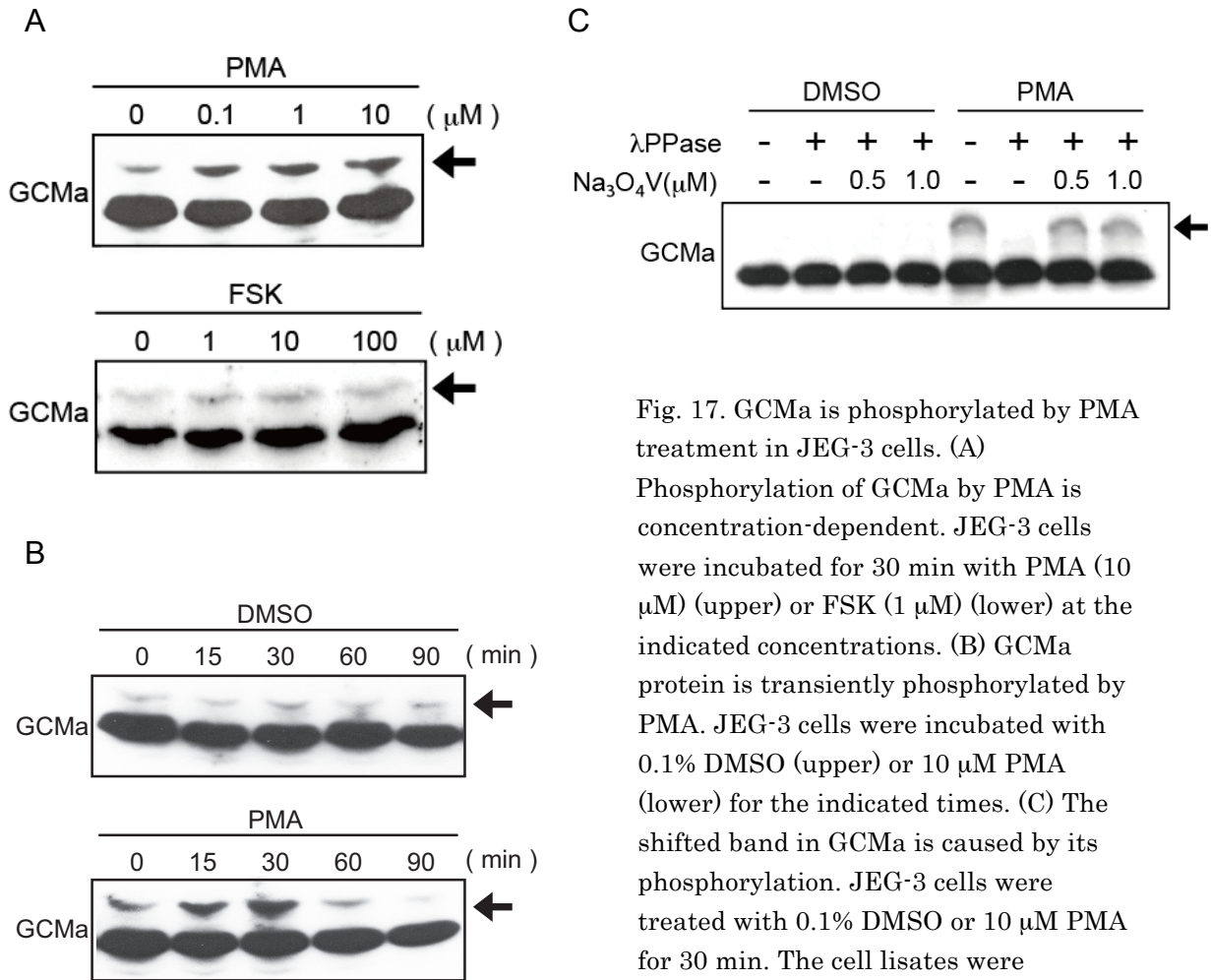


Fig. 17. GCMa is phosphorylated by PMA treatment in JEG-3 cells. (A) Phosphorylation of GCMa by PMA is concentration-dependent. JEG-3 cells were incubated for 30 min with PMA (10 μM) (upper) or FSK (1 μM) (lower) at the indicated concentrations. (B) GCMa protein is transiently phosphorylated by PMA. JEG-3 cells were incubated with 0.1% DMSO (upper) or 10 μM PMA (lower) for the indicated times. (C) The shifted band in GCMa is caused by its phosphorylation. JEG-3 cells were treated with 0.1% DMSO or 10 μM PMA for 30 min. The cell lisates were incubated with λ PPase with or without $\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$ for 2 h at 30°C. Arrows indicate phosphorylated GCMa.

次に、PMA による GCMa のリン酸化に PKC および MEK/ERK シグナルが関与しているかを検討するため、PKC 阻害剤および MEK 阻害剤を用い GCMa および ERK のリン酸化レベルを調べた (Fig. 18)。その結果 PMA による GCMa リン酸化の増加が、

PKC 阻害剤である Ro-31-8220 および Bisindolylmaleimide-I、MEK 阻害剤である U0126 により抑制された。またこのときの ERK のリン酸化も GCMa と同様に各種阻害剤による前処理によって抑制されたことから、GCMa は PMA によって PKC および MEK/ERK 依存的にリン酸化されることが示唆された。これまでの結果から、GCMa は PMA によって PKC および MEK/ERK シグナル依存的にリン酸化され、分解が促進される可能性が示唆された。

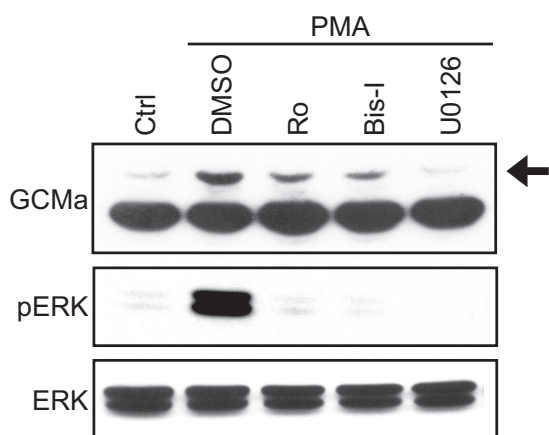


Fig. 18. GCMa phosphorylation by PMA is partially inhibited by PKC inhibitors and completely inhibited by MEK inhibitor. Cells were preincubated for 10 min with or without Ro-31-8220 (Ro) (200 nM), Bisindolylmaleimide-I (Bis-I) (1 μ M), or U0126 (20 μ M) and then incubated for 30 min with PMA (10 μ M). The cell lysates were separated using Phos-tag and normal gels, and then analyzed by immunoblot using antibodies against GCMa (GCMa), phosphorylated ERK (pERK) or ERK (ERK). Arrows indicate phosphorylated GCMa.

EGF による GCMa のリン酸化および分解促進

過去の報告から、EGF も胎盤の機能や発達において様々な作用を示す事が知られており、FSK や PMA と同様 syncytiotrophoblast の分化促進作用を示すことが報告されている[66-68]。また、EGF は一般的に MEK/ERK シグナルを活性化することが知られていることから、EGF が PMA と同様、GCMa のリン酸化レベルを増加させるかどうか検討した。JEG-3 細胞を EGF 処理すると、GCMa および ERK のリン酸化レベルが増加した。また、この増加は EGF レセプター阻害剤である AG1478 および MEK 阻害剤である U0126 によって抑制されるが、PKC 阻害剤 Ro-31-8220 および

Bisindolylmaleimide-I では抑制されなかった (Fig. 19)。また、タンパク質合成阻害剤である CHX 存在下、EGF 処理すると、GCMa タンパク質の減少が促進され、この減少が MEK 阻害剤である U0126 によって抑えられた (Fig. 16)。これらの結果から、EGF はレセプターを介し MEK/ERK シグナル依存的、且つ PKC 非依存的に GCMa をリン酸化、分解を促進する作用を持つことが示唆された。

PMA による GCMa リン酸化部位の同定

PMA および EGF によって MEK/ERK シグナル依存的に GCMa がリン酸化されることが明らかになったことから、GCMa のリン酸化部位の同定を試みた。タンパク質のリン酸化アミノ酸残基を予測するデータベース、NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) を用いて、GCMa アミノ酸配列上の ERK によりリン酸化されるアミノ酸残基を調べ、これらのアミノ酸をアラニンに置換した点変異体発現プラスミドを作製した。これらを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、PMA 処理によるリン酸化に影響があるか検討したところ、S378A または S383A は、GCMa WT と比較してリン酸化レベルが減少した。また S328,378A は S378A と比較してリン酸化レベルが減少した。これらの結果から、ヒト GCMa の 328 番目、378 番目、および 383 番目のセリン残基が PMA によってリン酸化されていることが示唆された (Fig. 20)。

GCMa 分解におけるリン酸化セリン残基の関与

PMA によってリン酸化されるセリン残基が GCMa の分解に関与しているか調べるため、それぞれの変異体を発現させた HEK293T 細胞を CHX 存在下 PMA で処理し、

変異体タンパク質量の変化を検討した。変異を入れていない GCMa WT は PMA 処理後 2 時間および 4 時間と時間を経るごとにタンパク質量が減少した。また S328A、S378A、S383A も GCMa WT 同様に減少した。一方、S328,378,383A では、PMA 処理による減少が見られなかったことから (Fig. 21)、GCMa の分解はこれらの 3 箇所のセリン残基リン酸化が関与していることが示唆された。

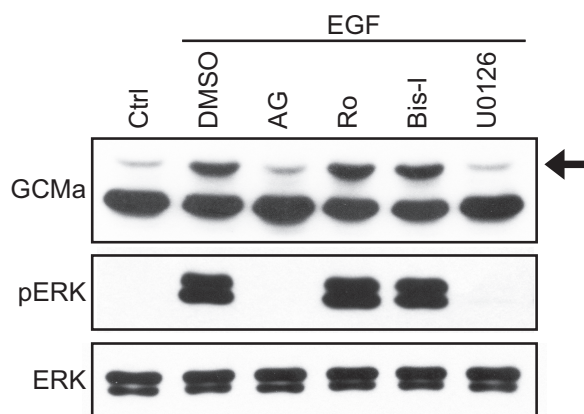


Fig. 19. GCMa phosphorylation by EGF is inhibited by an EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitor or MEK inhibitor but not by PKC inhibitors. Cells were preincubated for 10 min with or without Ro-31-8220 (Ro) (200 nM), Bisindolylmaleimide-I (Bis-I) (1 μ M), U0126 (20 μ M), or AG1478 (AG, 10 μ M) and then incubated for 15 min with EGF (20 ng/ml). The cell lysates were separated using Phos-tag and normal gels, and then analyzed by immunoblot using antibodies against GCMa (GCMa), phosphorylated ERK (pERK) or ERK (ERK). Arrows indicate phosphorylated GCMa.

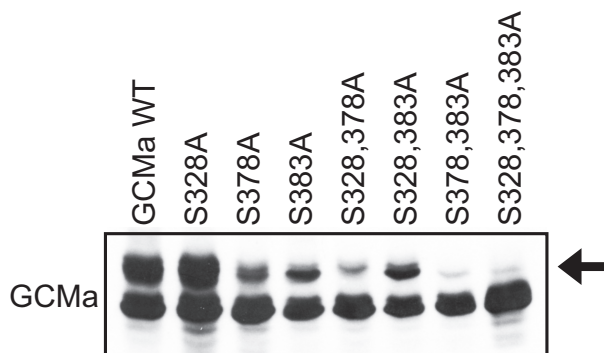


Fig. 20. PMA-dependent phosphorylation of GCMa occurs at serines 328, 378 and 383. HEK293T cells were incubated for 30 min with PMA (10 μ M) following incubation for 14 h after transfection with the appropriate plasmids. The cell lysates were separated using Phos-tag gels and analyzed by immunoblot using the anti-GCMa antibody. The arrow indicates phosphorylated GCMa.

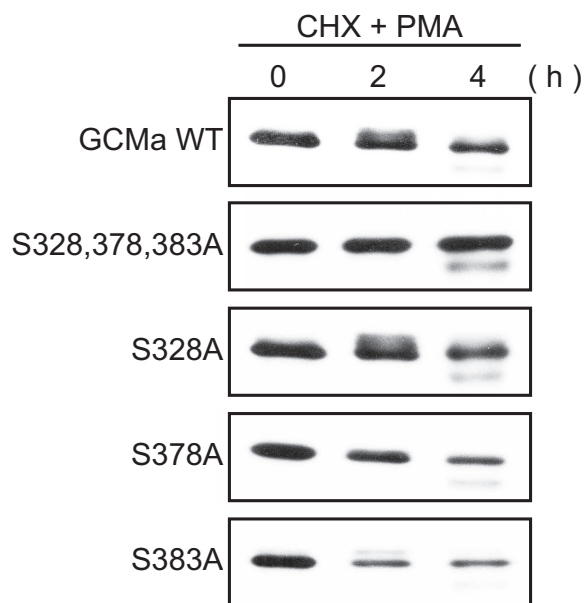


Fig. 21. The triple mutant for serines 328, 378 and 383 is less susceptible to protein degradation by the PMA-dependent mechanism. HEK293T cells were treated with PMA (10 μ M) and CHX (100 μ g/ml) for 2 h or 4 h following incubation for 14 h after transfection with the different plasmids. The cell lysates were analyzed by immunoblot using the anti-GCMa antibody.

GCMaはユビキチン-プロテアソーム系により分解されることから (Fig.16) [54,55]、PMA 処理によって、GCMa WT および S328,378,383A のユビキチン化レベルがどのように変化するか検討した。HEK293T 細胞に GCMa WT または S328,378,383A の FLAG タグタンパク質を発現させ、抗 GCMa 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗 Ubiquitin 抗体 (Cell Signaling Technology、MA、USA) を用い免疫沈降物のユビキチン化レベルを調べた。その結果、GCMa WT では PMA 処理によりユビキチン化レベルが増加するのに対し、S328,378,383A ではユビキチン化レベルが変化しないことがわかった (Fig. 22)。よって、PMA 処理による GCMa のリン酸化が、GCMa のユビキチン化レベルを増加し、分解を促進していることが示唆された。

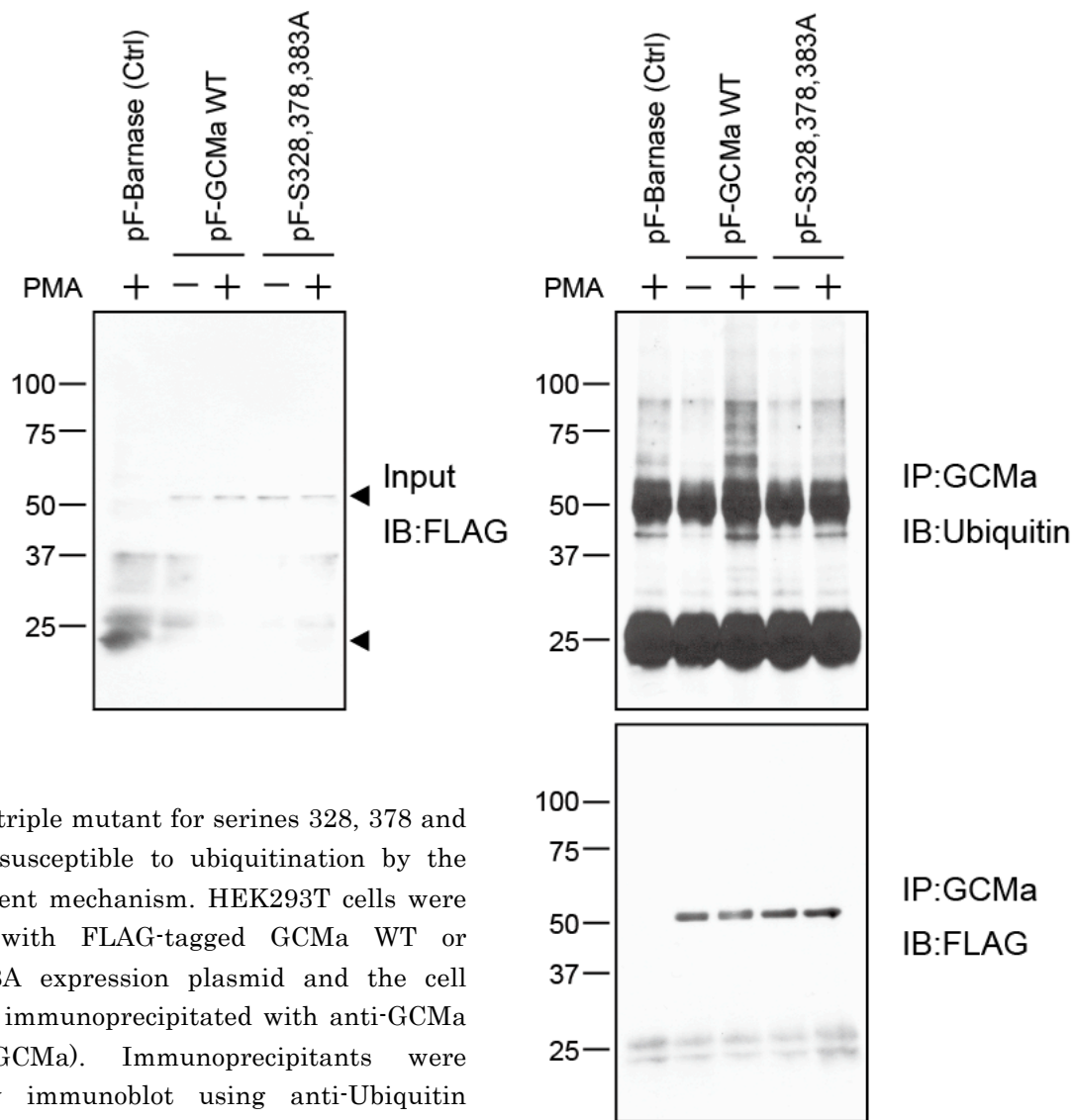


Fig. 22. The triple mutant for serines 328, 378 and 383 is less susceptible to ubiquitination by the PMA-dependent mechanism. HEK293T cells were transfected with FLAG-tagged GCMa WT or S328,378,383A expression plasmid and the cell lysates were immunoprecipitated with anti-GCMa antibody (GCMa). Immunoprecipitants were analyzed by immunoblot using anti-Ubiquitin antibody (Ubiquitin) or anti-FLAG monoclonal antibody (FLAG). Arrowheads indicate specific bands for the expressed proteins.

GCMa リン酸化の GCMa 転写活性化能への影響

PMA によるリン酸化部位のうち、378 番目および 383 番目のセリン残基は GCMa の転写活性化ドメインに存在する (Fig. 2)。転写活性化ドメインにおけるリン酸化がその転写活性化能に重要な役割を果たすことが知られていることから [69]、PMA によるリン酸化が GCMa の転写活性化能に及ぼす影響を検討した。まず、GCMa の DNA

結合配列の 5 回リピート配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し

[34,70]、PMA によって GCMa の転写活性化能がどのように変化するか検討した。

HEK293T 細胞にレポータープラスミドおよび GCMa 発現プラスミドをトランスフェ

クションした後、PMA 処理し、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、PMA によっ

て GCMa の転写活性化能が促進されることがわかった。この PMA の作用は、PKC 阻

害剤である Ro-31-8220 および MEK 阻害剤である U0126 によって抑制されたことか

ら、GCMa の転写活性化能が PKC および MEK 依存的な GCMa のリン酸化によって

促進される可能性が示唆された (Fig. 23)。

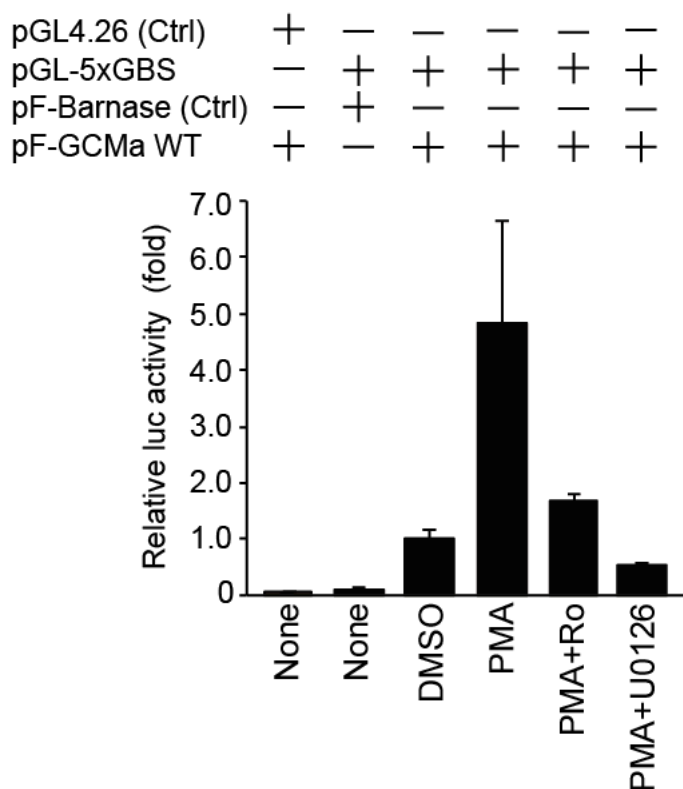


Fig. 23. PMA increases the transactivation activity of GCMa. HEK293T cells were transfected with reporter plasmid (pGL4.26 or pGL-5xGBS) and expression plasmid (pF-Barnase or pF-GCMa WT) for 17 h and then treated with DMSO (0.1%) or PMA (10 μ M) with or without Ro-31-8220 (Ro) or U0126 for 6 h. The cell lysates were used to measure the luciferase activities.

そこで、328 番目、378 番目および 383 番目のセリン残基のリン酸化がそれぞれ

GCMa の転写活性化能の促進に関与しているか調べるため、各種セリン残基点変異体

を用いて、ルシフェラーゼ活性を調べた (Fig. 24)。その結果、DMSO 処理したコントロールの細胞に比べ、PMA 処理したとき、GCMa WT およびそれぞれの変異体を発現させた細胞でそれぞれの転写活性化能が促進された。セリン残基の変異箇所が増えるに従い PMA による転写活性化能の促進作用が減少し、S328,378,282A を発現した細胞で最も抑制された。以上の結果から、3 箇所のセリン残基全てが PMA による GCMa の転写活性化能促進に関与していることが示唆された。

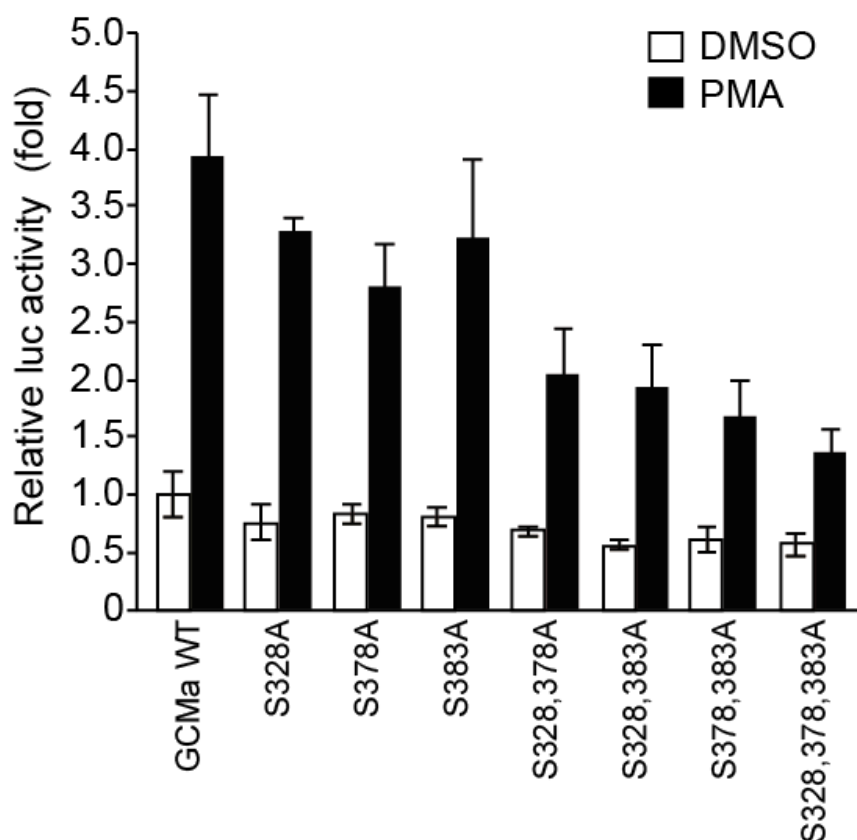


Fig. 24. The triple mutation of serines 328, 378 and 383 decreases the transactivation activity of GCMa. HEK293T cells were transfected with reporter plasmid, pGL-5xGBS and the appropriate expression plasmids for 17 h and then treated with DMSO (0.1%) or PMA (10 μ M) for 6 h. The cell lysates were used to measure the luciferase activities.

hCG 産生における PKC および MEK/ERK シグナルの関与

PMA および EGF は胎盤において hCG 産生を増加させることが知られている [59,68]。また GCMa は hCG α 遺伝子の発現制御に関わっていることが示唆されており、hCG 産生増加に働くと考えられる。そこで PMA および EGF 処理により hCG の産生量がどのように変化しているのか検討した (Fig. 25)。JEG-3 細胞を PMA および EGF で処理し hCG 量を測定したところ、PMA および EGF 処理によって hCG 量が約 2 倍に増加した。またこの増加は PKC 阻害剤である Ro-31-8220 または MEK 阻害剤である U0126 で抑制された。これらの結果から、PMA は PKC および MEK/ERK シグナル依存的に、EGF は MEK/ERK シグナル依存的に hCG 産生量を増加させることが明らかになった。

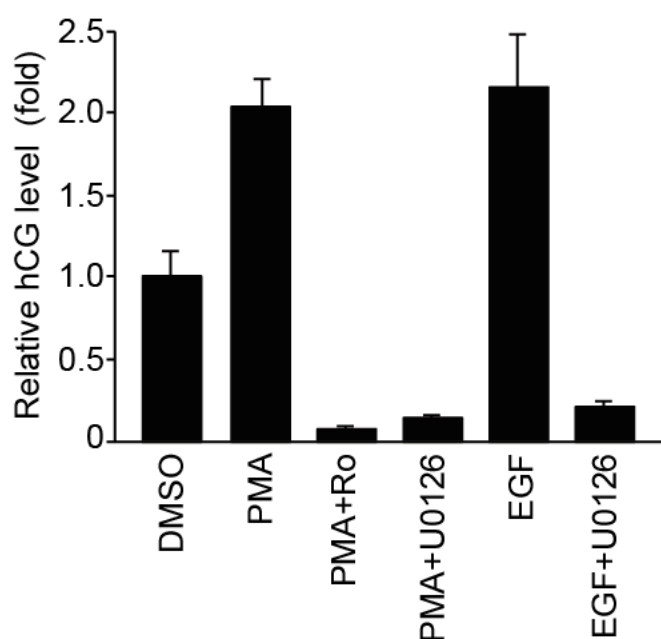


Fig. 25. hCG level in JEG-3 cells is upregulated with PMA or EGF treatment via PKC/MEK/ERK- or MEK/ERK-dependent pathway. JEG-3 cells were treated with PMA (10 μ M) or EGF (20 ng/ml) with or without Ro-31-8220 (Ro) or U0126 for 24 h. The resulting media were used to determine hCG level using ELISA.

第4節 考察

cAMP シグナルによる GCMa の発現調節については多数報告され、GCMa の発現や活性を増加させる方向に働いていることが明らかとなってきた。cAMP シグナルの発現調節には、PKA を介した CRE 依存的な転写活性化や、CBP や DUSP23 の作用によるタンパク質安定性の増加が知られており、本研究においてもこれまでの報告と同様に、cAMP シグナルによる GCMa の発現増加が確認できた。cAMP のエフェクターには PKA の他に Epac が知られている。最近、BeWo 細胞において Epac 依存的シグナルが GCMa の脱 SUMO 化を促進することにより、GCMa の転写活性化能を増加させることが報告された[71,72]。本研究では Epac 特異的な cAMP アナログによる処理で GCMa の発現量には変化が見られなかったことから、Epac 依存的なシグナルは GCMa の発現量に非依存的な転写活性化能の調節に関与している可能性が考えられる。しかし、Epac シグナルが BeWo 細胞において細胞融合を促進するのに対し[71,73]、JEG-3 細胞では細胞融合は見られないことから、JEG-3 細胞では Epac シグナルが GCMa の発現調節には関与していない可能性も考えられる。

以上のように、cAMP シグナルは様々な経路で GCMa の発現および活性調節機構に対して正に作用していることから、本研究ではどのような細胞外刺激が cAMP シグナルを活性化し GCMa の発現調節に関与しているのか検討を試みたが、GCMa タンパク質量に変化を与える物質は同定出来なかった。今回使用した物質以外にも多くの生体分子が機能している可能性が考えられるが、どのような生理条件下で GCMa の発現量が増加し、機能するのかを明らかにすることは重要であり、薬剤の種類を増やして検討する必要がある。また、レセプターを介したシグナルだけでなく、胎盤の酸素濃度や

[74-76]、着床や組織形成における細胞接着も[77,78]、胎盤の分化や機能制御に関与していることが示唆されていることから[79]、これらと GCMa の発現調節機構との関連についても検討が必要である。

最近、PKC の活性化剤である PMA が PKC および MEK/ERK を介して cytotrophoblast の分化促進に働くことが報告されたが、これらのシグナルが GCMa にどのように関与しているのかその詳細は不明であった。本研究で PMA によって GCMa タンパク質量が一過性に減少することがわかった。また、GCMa mRNA 量も減少する傾向が見られたことから、タンパク質量減少の原因の一つとして、転写抑制が考えられた。しかし、時間経過とともにタンパク質量が回復するのに対し、mRNA 量は減少する傾向にあり、mRNA の安定性、翻訳効率の増加やタンパク質分解系の抑制が関与している可能性が考えられた。一方、PMA 処理後 1 時間という早い時点で GCMa タンパク質量の有意な減少が見られたことから、分解系が促進されている可能性が考えられ、GCMa タンパク質の安定性を調べたところ、PMA によってわずかに分解が促進されることがわかった。これらの結果より、PMA 処理後の時間によって異なる影響があるが、タンパク質量の減少は mRNA 量減少およびタンパク質分解促進によるものであると考えられた。

PMA による GCMa 分解促進は PKC および MEK/ERK シグナル依存的であり、このとき GCMa のリン酸化レベルが増加することが明らかになった。また、リン酸化されるアミノ酸残基は GCMa の 328 番目、378 番目、383 番目のセリン残基であった。これらのセリン残基をアラニン残基へ置換した変異体は、GCMa WT と比べ、PMA によるユビキチン化の増加および分解促進が抑制された。これらのことから、PMA による GCMa の 328 番目、378 番目、383 番目のセリン残基におけるリン酸化が GCMa の

ユビキチン化レベルを増加させ、GCMa 分解促進に働いていることが示唆された。これまでに、GSK-3 β による GCMa 322 番目のセリン残基のリン酸化が、GCMa と E3 ユビキチンリガーゼとの結合および GCMa のユビキチン化を誘導することにより、分解促進に働いていることが報告されている[54,55]。一般的に、プロリン、グルタミン、セリンおよびスレオニン残基に富む配列 (PEST 配列) は、リン酸化されることによりこれらの反応を誘導するモチーフとして知られており、GCMa にも存在するとされるが詳細な検討は行われていない[27,80]。GCMa 322 番目のセリン残基は PEST 配列に含まれる可能性があり[55]、PMA によるリン酸化部位において同様の機構が働いているかどうか、キナーゼの同定や、ユビキチンリガーゼなどの他のタンパク質との相互作用に及ぼす影響を検討する必要がある。

本研究において、PMA による PKC および MEK/ERK シグナル依存的な 328 番目、378 番目、383 番目のセリン残基のリン酸化が GCMa の転写活性化能を促進することが明らかとなった。しかし、3 箇所のセリン残基全てをアラニン残基に置換した変異体においても、PMA 処理によって DMSO 処理した細胞に比べ GCMa の転写活性化能が促進されることから、PMA による転写活性化能の促進には 3 箇所のセリン残基に依存しないメカニズムが存在する可能性が考えられる。また、GCMa の転写活性化ドメイン上にある 378 番目、383 番目と、転写活性化ドメイン上にない 328 番目、それぞれのセリン残基の点変異体の間で、転写活性化能に及ぼす影響に差がないことから、これらのセリン残基リン酸化が GCMa の転写活性化能を直接制御しているのではなく、何らかの別の作用を介して影響している可能性が考えられた。

これまでの報告から、GCMa のタンパク質安定性および転写活性化能はアセチル化によって制御されており、CBP によってアセチル化、histone deacetylase 3 (HDAC3)

によって脱アセチル化されることが知られている[53,81]。よって CBP や HDAC3 と GCMa の相互作用が GCMa のリン酸化によって変化するならば、結果として転写活性化能やタンパク質安定性に影響すると考えられる。runt domain transcription factor 1 (RUNX1) は GCMa と同様、アセチル化によってタンパク質の安定性が制御されることが知られており[82,83]、RUNX1 の ERK 依存的なリン酸化が転写活性化能を促進させるとともに、タンパク質の安定性を減少させることが報告されている[84]。これは RUNX1 とコリプレッサー mSin3A との相互作用が ERK 依存的リン酸化により抑制されるため、RUNX1 は mSin3A と結合することで、HDAC がリクルートされ転写抑制されるとともに、ユビキチン-プロテアソーム系による分解から保護される。このように GCMa においてリン酸化がその他のタンパク質との相互作用に影響を及ぼすかどうかについては今後の検討課題である。

本研究では、PMA だけでなく EGF についても検討を行った。EGF も胎盤の発達や機能に様々な作用を示すことが報告されており、FSK や PMA と同様、cytotrophoblast の細胞融合や hCG 産生を増加させ、syncytiotrophoblast の分化促進に働くことが知られている。本研究では GCMa に対する EGF の作用が PMA の作用と非常によく似ており、EGF によって GCMa リン酸化の増加、タンパク質分解の促進が起こることが明らかとなった。またデータには示さなかったが、リン酸化部位も同様である結果が得られた。PMA と異なる点は EGF による作用が PKC 非依存的であることであり、EGF は EGF レセプターを介し、PMA は PKC を介し、MEK/ERK より下流では同じシグナルを活性化していると考えられる (Fig. 26)。

syncytiotrophoblast は絨毛構造の表面を覆うように局在しており、母体血中に触れていることから、母体血中の EGF が GCMa の調節に影響している可能性が考えられ

る。cAMP シグナルの活性化および GCMa 自身の転写促進により GCMa の発現量が増加、維持される一方で[51]、EGF によって転写活性化能および分解の促進が起こることで、GCMa の活性の上限を設定し、過剰になることを防ぐ役割を果たしているのかもしれない。

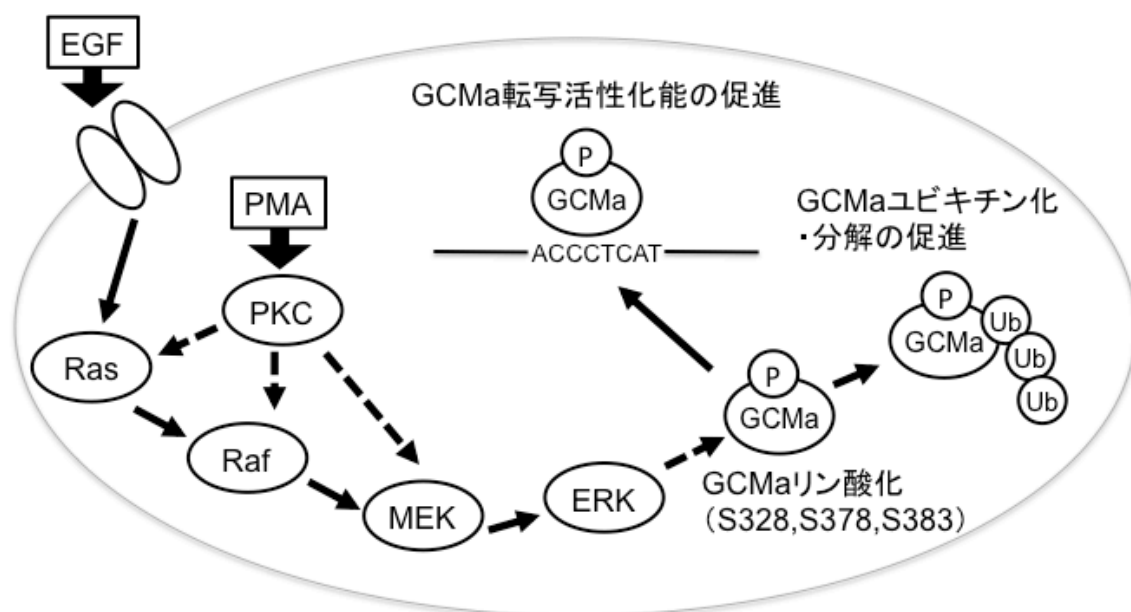


Fig. 26. The MEK/ERK dependent pathway phosphorylates GCMa that stimulates GCMa ubiquitination and degradation as well as GCMa transactivation activity. PMA and EGF activate this signaling pathway and cause GCMa degradation and stimulation of GCMa transcriptional activity.

第 4 章 結論

本研究で GCMa に特異的なマウスモノクローナル抗体を得ることができた。この抗体はヒトおよびマウス GCMa を認識し、イムノブロット、免疫組織染色、免疫沈降法に利用することが可能であった。今後、発達段階や妊娠病態の胎盤における GCMa の発現部位や発現量の変化を検討することが可能となった。

GCMa は、cAMP シグナル依存的な遺伝子発現の活性化およびタンパク質の安定性の増加によりその発現量や活性が増加する。本研究で新たに GCMa が PMA によって PKC および MEK/ERK シグナル依存的に 328 番目、378 番目、383 番目のセリン残基がリン酸化され、その結果 GCMa のユビキチン化レベルが増加、それに伴い分解が促進されることが明らかとなった。また 328 番目、378 番目、383 番目のセリン残基のリン酸化は GCMa の転写活性化能促進に必要であることが明らかとなった。さらに、EGF が EGF レセプターを介して MEK/ERK シグナルを活性化、PMA と同様に GCMa のリン酸化および分解を促進することから、生理的条件下において、EGF が GCMa の調節に関わっている可能性が考えられた。

胎盤の正常な発達や機能発現のためには、GCMa の発現や機能の正確なコントロールが必須であると考えられる。今後、本研究で見出した GCMa の発現調節機構を更に検討するとともに、他の調節機構との関連を明らかにすることで、胎盤の発達や機能における分子機序の更なる理解に役立つと考えられる。また GCMa の機能と様々な妊娠病態との関連について調べることで、その病態の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発、さらにそれらの病態における GCMa の診断マーカーとしての利用につながる可能性が期待される。

謝辞

本研究遂行に際し、懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 北出 幸夫 教授に深く感謝いたします。

本論文作成に際し、有益な御助言および御校閲を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 赤尾 幸博 教授、武藤 吉徳 教授に心より感謝いたします。

本研究遂行に際し、幾多の御助言、御指導を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 上田 浩 准教授に深く感謝いたします。

本研究遂行に際し、実験の一部に御協力頂きました名古屋市立大学大学院医学研究科 高橋 智 教授、杉浦 真弓 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究遂行に際し、懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました金城学院大学薬学部 山田 和代 准教授、宮澤 大介 助教に心より感謝いたします。

本研究遂行に際し、御支援、御激励を賜りました金城学院大学薬学部 奥山 治美 教授、大原 直樹 教授に深く感謝いたします。

本研究遂行に際し、いろいろとご協力頂きました金城学院大学薬学部山田研究室の皆様
に感謝いたします。

本研究遂行に際し、いろいろとご協力頂きました岐阜大学工学部生命工学科第二講座上田研究室の皆様
に感謝いたします。

折に触れ、御激励頂きました金城学院大学薬学部の諸先生方に心より感謝いたします。

参考文献

- [1] 妊娠高血圧学会, 妊娠高血圧症候群 (PIH) 管理ガイドライン 2009, 2009.
- [2] E. Rey, A. Couturier, The prognosis of pregnancy in women with chronic hypertension, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171 (1994) 410-416.
- [3] L.M. McCowan, R.G. Buist, R.A. North, G. Gamble, Perinatal morbidity in chronic hypertension, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103 (1996) 123-129.
- [4] B.M. Sibai, M. Lindheimer, J. Hauth, S. Caritis, P. VanDorsten, M. Klebanoff, C. MacPherson, M. Landon, M. Miodovnik, R. Paul, P. Meis, M. Dombrowski, Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 667-671.
- [5] L.C. Chappell, S. Enye, P. Seed, A.L. Briley, L. Poston, A.H. Shennan, Adverse perinatal outcomes and risk factors for preeclampsia in women with chronic hypertension: a prospective study, *Hypertension* 51 (2008) 1002-1009.
- [6] B.M. Sibai, Chronic hypertension in pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 100 (2002) 369-377.
- [7] C.V. Ananth, M.R. Peltier, W.L. Kinzler, J.C. Smulian, A.M. Vintzileos, Chronic hypertension and risk of placental abruption: is the association modified by ischemic placental disease?, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197 (2007) 273 e271-277.
- [8] E. Kajantie, K.L. Thornburg, J.G. Eriksson, C. Osmond, D.J. Barker, In preeclampsia, the placenta grows slowly along its minor axis, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 469-473.
- [9] B.D. LaMarca, B.T. Alexander, J.S. Gilbert, M.J. Ryan, M. Sedeek, S.R. Murphy, J.P. Granger, Pathophysiology of hypertension in response to placental ischemia during pregnancy: a central role for endothelin?, *Gender medicine* 5 Suppl A (2008) S133-138.
- [10] S. Baumwell, S.A. Karumanchi, Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms, *Nephron. Clinical practice* 106 (2007) c72-81.
- [11] T.R. Regnault, H.L. Galan, T.A. Parker, R.V. Anthony, Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review, *Placenta* 23 Suppl A

- (2002) S119-129.
- [12] S. Handwerger, New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation, *Mol. Cell. Endocrinol.* 323 (2010) 94-104.
- [13] J.L. James, P.R. Stone, L.W. Chamley, Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast, *Reproduction (Cambridge, England)* 130 (2005) 95-103.
- [14] E. Winterhager, P. Kaufmann, R. Gruemmer, Cell-cell-communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation, *Placenta* 21 Suppl A (2000) S61-68.
- [15] J.C. Cross, D. Baczyk, N. Dobric, M. Hemberger, M. Hughes, D.G. Simmons, H. Yamamoto, J.C. Kingdom, Genes, development and evolution of the placenta, *Placenta* 24 (2003) 123-130.
- [16] J.D. Aplin, Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro, *J. Cell Sci.* 99 (Pt 4) (1991) 681-692.
- [17] S. Handwerger, G. Datta, B. Richardson, C.M. Schmidt, T. Siddiqi, L. Turzai, G.M. Anantharamaiah, Pre-beta-HDL stimulates placental lactogen release from human trophoblast cells, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) E384-389.
- [18] K. Fukushima, N. Wake, 妊娠高血圧症候群の病態形成における絨毛細胞分化の役割とその調節メカニズム, *福岡医学雑誌* 102 (2011) 223-228.
- [19] R. Hanaoka, Y. Ohmori, K. Uyemura, T. Hosoya, Y. Hotta, T. Shirao, H. Okamoto, Zebrafish *gcm* is required for pharyngeal cartilage formation, *Mech. Dev.* 121 (2004) 1235-1247.
- [20] A. Ransick, J.P. Rast, T. Minokawa, C. Calestani, E.H. Davidson, New early zygotic regulators expressed in endomesoderm of sea urchin embryos discovered by differential array hybridization, *Dev. Biol.* 246 (2002) 132-147.
- [21] S. Hashemolhosseini, K. Schmidt, K. Kilian, E. Rodriguez, M. Wegner, Conservation and variation of structure and function in a newly identified GCM homolog from chicken, *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 441-451.
- [22] B.W. Jones, R.D. Fetter, G. Tear, C.S. Goodman, glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate, *Cell* 82 (1995) 1013-1023.
- [23] T. Hosoya, K. Takizawa, K. Nitta, Y. Hotta, glial cells missing: a binary switch

- between neuronal and glial determination in *Drosophila*, *Cell* 82 (1995) 1025-1036.
- [24] L. Bataille, B. Auge, G. Ferjoux, M. Haenlin, L. Waltzer, Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors, *Development* 132 (2005) 4635-4644.
- [25] M. Kammerer, B. Pirola, S. Giglio, A. Giangrande, GCMB, a second human homolog of the fly glide/gcm gene, *Cytogenet. Cell Genet.* 84 (1999) 43-47.
- [26] T.B. Alfonso, B.W. Jones, gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*, *Dev. Biol.* 248 (2002) 369-383.
- [27] Y. Altshuler, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, M.A. Frohman, Gcm1, a mammalian homolog of *Drosophila* glial cells missing, *FEBS Lett.* 393 (1996) 201-204.
- [28] J. Kim, B.W. Jones, C. Zock, Z. Chen, H. Wang, C.S. Goodman, D.J. Anderson, Isolation and characterization of mammalian homologs of the *Drosophila* gene glial cells missing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 12364-12369.
- [29] J. Schreiber, E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Riethmacher, E.E. Tuerk, J. Enderich, M.R. Bosl, M. Wegner, Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, *GCMa*, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 2466-2474.
- [30] T. Gunther, Z.F. Chen, J. Kim, M. Priemel, J.M. Rueger, M. Amling, J.M. Moseley, T.J. Martin, D.J. Anderson, G. Karsenty, Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone, *Nature* 406 (2000) 199-203.
- [31] S. Hashemolhosseini, M. Wegner, Impacts of a new transcription factor family: mammalian GCM proteins in health and disease, *J. Cell Biol.* 166 (2004) 765-768.
- [32] Y. Akiyama-Oda, T. Hosoya, Y. Hotta, Alteration of cell fate by ectopic expression of *Drosophila* glial cells missing in non-neural cells, *Dev. Genes Evol.* 208 (1998) 578-585.
- [33] M. Wegner, D. Riethmacher, Chronicles of a switch hunt: gcm genes in development, *Trends Genet.* 17 (2001) 286-290.

- [34] K. Yamada, H. Ogawa, S. Honda, N. Harada, T. Okazaki, A GCM motif protein is involved in placenta-specific expression of human aromatase gene, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32279-32286.
- [35] K. Yamada, N. Harada, S. Honda, Y. Takagi, Regulation of placenta-specific expression of the aromatase cytochrome P-450 gene. Involvement of the trophoblast-specific element binding protein, *The Journal of biological chemistry* 270 (1995) 25064-25069.
- [36] C. Yu, K. Shen, M. Lin, P. Chen, C. Lin, G.D. Chang, H. Chen, GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50062-50068.
- [37] M. Chang, D. Mukherjea, R.M. Gobble, K.A. Groesch, R.J. Torry, D.S. Torry, Glial cell missing 1 regulates placental growth factor (PGF) gene transcription in human trophoblast, *Biol. Reprod.* 78 (2008) 841-851.
- [38] L. Anson-Cartwright, K. Dawson, D. Holmyard, S.J. Fisher, R.A. Lazzarini, J.C. Cross, The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta, *Nat. Genet.* 25 (2000) 311-314.
- [39] D. Baczyk, A. Satkunaratnam, B. Nait-Oumesmar, B. Huppertz, J.C. Cross, J.C. Kingdom, Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta, *Placenta* 25 (2004) 553-559.
- [40] S.W. Schubert, N. Lamoureux, K. Kilian, L. Klein-Hitpass, S. Hashemolhosseini, Identification of integrin-alpha4, Rb1, and syncytin a as murine placental target genes of the transcription factor GCMa/Gcm1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 5460-5465.
- [41] D. Baczyk, S. Drewlo, L. Proctor, C. Dunk, S. Lye, J. Kingdom, Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 719-727.
- [42] M. Langbein, R. Strick, P.L. Strissel, N. Vogt, H. Parsch, M.W. Beckmann, R.L. Schild, Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction, *Mol. Reprod. Dev.* 75 (2008) 175-183.
- [43] M. Gauster, G. Moser, K. Orendi, B. Huppertz, Factors involved in regulating

- trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia, *Placenta* 30 Suppl A (2009) S49-54.
- [44] S. Drewlo, M. Czikk, D. Baczyk, S. Lye, J. Kingdom, Glial cell missing-1 mediates over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in severe pre-eclamptic placental villi, *Hum. Reprod.* 26 (2011) 1025-1034.
- [45] C.P. Chen, C.Y. Chen, Y.C. Yang, T.H. Su, H. Chen, Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia, *Placenta* 25 (2004) 413-421.
- [46] N. Fujito, O. Samura, N. Miharu, M. Tanigawa, M. Hyodo, Y. Kudo, Increased plasma mRNAs of placenta-specific 1 (PLAC1) and glial cells-missing 1 (GCM1) in mothers with pre-eclampsia, *Hiroshima J. Med. Sci.* 55 (2006) 9-15.
- [47] Y. Akiyama, T. Hosoya, A.M. Poole, Y. Hotta, The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14912-14916.
- [48] E.E. Tuerk, J. Schreiber, M. Wegner, Protein stability and domain topology determine the transcriptional activity of the mammalian glial cells missing homolog, *GCMb*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4774-4782.
- [49] E. Basyuk, J.C. Cross, J. Corbin, H. Nakayama, P. Hunter, B. Nait-Oumesmar, R.A. Lazzarini, Murine *Gcm1* gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells, *Dev. Dyn.* 214 (1999) 303-311.
- [50] S. Hashemolhosseini, K. Kilian, E. Kardash, P. Lischka, T. Stamminger, M. Wegner, Structural requirements for nuclear localization of *GCMa/Gcm-1*, *FEBS Lett.* 553 (2003) 315-320.
- [51] S.W. Schubert, A. Abendroth, K. Kilian, T. Vogler, B. Mayr, I. Knerr, S. Hashemolhosseini, bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor *GCMa/Gcm1* in trophoblast cells, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 3834-3846.
- [52] I. Knerr, S.W. Schubert, C. Wich, K. Amann, T. Aigner, T. Vogler, R. Jung, J. Dotsch, W. Rascher, S. Hashemolhosseini, Stimulation of *GCMa* and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3991-3998.
- [53] C.W. Chang, H.C. Chuang, C. Yu, T.P. Yao, H. Chen, Stimulation of *GCMa*

- transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMa, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 8401-8414.
- [54] C.S. Yang, C. Yu, H.C. Chuang, C.W. Chang, G.D. Chang, T.P. Yao, H. Chen, FBW2 targets GCMa to the ubiquitin-proteasome degradation system, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10083-10090.
- [55] M.H. Chiang, F.Y. Liang, C.P. Chen, C.W. Chang, M.L. Cheong, L.J. Wang, C.Y. Liang, F.Y. Lin, C.C. Chou, H. Chen, Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 17411-17419.
- [56] F.Y. Lin, C.W. Chang, M.L. Cheong, H.C. Chen, D.Y. Lee, G.D. Chang, H. Chen, Dual-specificity phosphatase 23 mediates GCM1 dephosphorylation and activation, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 848-861.
- [57] M. Knofler, L. Saleh, H. Strohmer, P. Husslein, M.F. Wolschek, Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal alphaHCG gene promoter in term villous trophoblasts, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 573-580.
- [58] G. Keryer, E. Alsat, K. Tasken, D. Evain-Brion, Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro, *J. Cell Sci.* 111 (Pt 7) (1998) 995-1004.
- [59] T. Suzuki, K. Ino, F. Kikkawa, C. Uehara, H. Kajiyama, K. Shibata, S. Mizutani, Neutral endopeptidase/CD10 expression during phorbol ester-induced differentiation of choriocarcinoma cells through the protein kinase C- and extracellular signal-regulated kinase-dependent signalling pathway, *Placenta* 23 (2002) 475-482.
- [60] H.P. Hohn, M. Linke, B. Ugele, H.W. Denker, Differentiation markers and invasiveness: discordant regulation in normal trophoblast and choriocarcinoma cells, *Exp. Cell Res.* 244 (1998) 249-258.
- [61] T. Yamawaki, N. Toyoda, Human chorionic gonadotropin secretion and protein phosphorylation in chorionic tissue, *Endocr. J.* 41 (1994) 509-516.
- [62] B. Andersen, A. Milsted, G. Kennedy, J.H. Nilson, Cyclic AMP and phorbol esters interact synergistically to regulate expression of the chorionic gonadotropin genes, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 15578-15583.
- [63] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Separation and detection of large

- phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE, *Nature protocols* 4 (2009) 1513-1521.
- [64] E. Zachariades, H. Foster, A. Goumenou, P. Thomas, M. Rand-Weaver, E. Karteris, Expression of membrane and nuclear progesterone receptors in two human placental choriocarcinoma cell lines (JEG-3 and BeWo): Effects of syncytialization, *Int. J. Mol. Med.* 27 (2011) 767-774.
- [65] S. Al-Nasiry, B. Spitz, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg, Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells, *Hum. Reprod.* 21 (2006) 193-201.
- [66] M. Yang, The Central Role of Human Chorionic Gonadotropin in the Formation of Human Placental Syncytium, *Endocrinology* 144 (2003) 1108-1120.
- [67] K. Amemiya, H. Kurachi, H. Adachi, K.I. Morishige, K. Adachi, T. Imai, A. Miyake, Involvement of epidermal growth factor (EGF)/EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cells: functional differentiation in vitro, *J. Endocrinol.* 143 (1994) 291-301.
- [68] H. Cao, Z.M. Lei, C.V. Rao, Transcriptional and posttranscriptional mechanisms in epidermal growth factor regulation of human chorionic gonadotropin (hCG) subunits and hCG receptor gene expression in human choriocarcinoma cells, *Endocrinology* 135 (1994) 962-970.
- [69] L.V. Madrid, M.W. Mayo, J.Y. Reuther, A.S. Baldwin, Jr., Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18934-18940.
- [70] C. Lin, M. Lin, H. Chen, Biochemical characterization of the human placental transcription factor GCMa/1, *Biochem. Cell Biol.* 83 (2005) 188-195.
- [71] C.W. Chang, G.D. Chang, H. Chen, A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKI signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion, *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 3820-3831.
- [72] C.C. Chou, C. Chang, J.H. Liu, L.F. Chen, C.D. Hsiao, H. Chen, Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing Drosophila homolog a, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27239-27249.
- [73] M. Yoshie, K. Kaneyama, K. Kusama, C. Higuma, H. Nishi, K. Isaka, K.

- Tamura, Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 2229-2238.
- [74] J. Patel, K. Landers, R.H. Mortimer, K. Richard, Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development, *Placenta* 31 (2010) 951-957.
- [75] J.L. James, P.R. Stone, L.W. Chamley, The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy, *Hum. Reprod. Update* 12 (2006) 137-144.
- [76] J.C. Robins, A. Heizer, A. Hardiman, M. Hubert, S. Handwerger, Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells, *Placenta* 28 (2007) 1141-1146.
- [77] T.P. Fleming, B. Sheth, I. Fesenko, Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis, *Front. Biosci.* 6 (2001) D1000-1007.
- [78] E.D. Watson, M. Hughes, D.G. Simmons, D.R. Natale, A.E. Sutherland, J.C. Cross, Cell-cell adhesion defects in Mrj mutant trophoblast cells are associated with failure to pattern the chorion during early placental development, *Dev. Dyn.* 240 (2011) 2505-2519.
- [79] J.D. Aplin, Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 323-329.
- [80] S.T. Whiteside, M.K. Ernst, O. LeBail, C. Laurent-Winter, N. Rice, A. Israel, N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 5339-5345.
- [81] H.C. Chuang, C.W. Chang, G.D. Chang, T.P. Yao, H. Chen, Histone deacetylase 3 binds to and regulates the GCMa transcription factor, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1459-1469.
- [82] S.C. Bae, Y.H. Lee, Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation, *Gene* 366 (2006) 58-66.
- [83] Y.H. Jin, E.J. Jeon, Q.L. Li, Y.H. Lee, J.K. Choi, W.J. Kim, K.Y. Lee, S.C. Bae, Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3

acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation, *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 29409-29417.

- [84] Y. Imai, M. Kurokawa, Y. Yamaguchi, K. Izutsu, E. Nitta, K. Mitani, M. Satake, T. Noda, Y. Ito, H. Hirai, The Corepressor mSin3A Regulates Phosphorylation-Induced Activation, Intranuclear Location, and Stability of AML1, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 1033-1043.