

博士學位論文

胚性幹細胞における細胞外syntaxin-4 の 形態と分化への影響 —分化状態の不均一性との関わり—

関西学院大学大学院
理工学研究科 生命科学専攻

萩原 奈津美

2017 年 3 月

目次

略語表	6
-----------	---

第 1 章 要旨	8
----------------	---

第 2 章 序論	10
----------------	----

第 1 節 胚性幹細胞の不均一性

第 2 節 syntaxin-4 の機能

第 3 章 材料と方法	18
-------------------	----

第 1 節 細胞培養

第 2 節 発現コンストラクトの作製および遺伝子導入

第 3 節 細胞の蛍光免疫染色

第 4 節 ウェスタンブロッティング

第 5 節 細胞表面のタンパク質のビオチン化による検出

第 6 節 細胞表面 syntaxin-4 の免疫沈降

第 7 節 組換えタンパク質の作製

第 8 節 RT-PCR および qRT-PCR

第 9 節 細胞表面タンパク質の免疫蛍光染色法による検出

第 10 節 細胞外 syntaxin-4 による細胞形態の解析

第 11 節 RNA シーケンス解析

第 12 節 *zscan4* 遺伝子のノックダウン

第 13 節 データー処理

第 4 章 結果

第 1 節 マウス ES 細胞における syntaxin-4 の細胞外局在 29

ES 細胞表面での syntaxin-4 の自発的な発現

MEK1/2 および GSK3 β 阻害剤添加による細胞外 syntaxin-4 の発現変化

細胞外 syntaxin-4 の発現細胞の割合

第 2 節 細胞外 syntaxin-4 による形態・分化への影響 35

細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態への影響

E- to P-cadherin スイッチへの影響

syntaxin-4 フラグメントによる細胞外 syntaxin-4 の機能の検証

細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子および中胚葉分化への影響

第 3 節 細胞外 syntaxin-4 の下流因子の同定 43

次世代シーケンサーによる細胞外 syntaxin-4 の下流因子の探索

細胞外 syntaxin-4 による未分化状態安定化因子 Zscan4 への影響

細胞外 syntaxin-4 による PI3K/Akt シグナルへの影響

MEK1/2 および GSK3 β 阻害剤による細胞外 syntaxin-4 の機能への影響

第 4 節 F9 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能

(cadherin スイッチと形態との関わり) 51

細胞外 syntaxin-4 による F9 細胞の形態への影響

E- to P-cadherin スイッチへの影響

細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子および分化への影響

P-cadherin 強制発現による形態への影響

E-cadherin の機能阻害による形態変化

E- to P-cadherin スイッチの模倣による形態変化

長期的な細胞外 syntaxin-4 発現による分化への影響

第 5 節 P19CL6 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能

(P-cadherin と中胚葉分化との関係) 63

細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態への影響

細胞外 syntaxin-4 による中胚葉分化への影響

P-cadherin 強制発現による形態と中胚葉分化への影響

第 5 章 総括および考察	68
第 6 章 参考文献	75
第 7 章 参考資料	83
第 8 章 付録	87
第 9 章 研究業績	115
第 10 章 謝辞	119

略語表

ES: Embryonic stem

iPS: Induced pluripotent stem

EC: Embryonic carcinoma

MEK1/2: MAPK/ ERK kinase

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

LIF: Leukemia inhibitory factor

EMT: Epithelial-mesenchymal-transition

HES1: Hes family bHLH transcription factor 1

t-SNARE: Target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

ICM: Inner cell mass

JAK: Janus kinase

STAT: Signal transducers and activator of transcription

Akt: Akt serine/threonine kinase 1

PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase

α SMA: α -Smooth muscle actin

Zeb1: Zinc finger e-box binding homeobox

Foxc2: Forkhead box protein C2

AFP: alpha fetoprotein

MHC: Myosin heavy chain

Tuj1: Neuronal class III β -Tubulin

RA: Retinoic acid

Oct3/4: Octamer-binding transcription factor 3/4

Nanog: Nanog homeobox

Rex1 (Zfp42): ring-exported protein 1 (Zinc finger protein 42)

Gata: Gata binding protein

Bmp4: Bone morphogenetic protein 4

Wnt3: Wingless-type MMTV integration site family, member 3

Mek: MAP kinase-ERK kinase

Erk: Extracellular regulated MAP kinase

GMEM: Glasgow minimum essential medium

α MEM: Alpha modified minimum essential medium

GFP: Green fluorescent protein

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

SDS: Sodium dodecyl sulfate

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldehyde

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DOX: Doxycycline

qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR

siRNA: small interfering RNA

第 1 章 要旨

近年、ES、iPS 細胞などの多能性幹細胞は次世代再生医療への応用が期待されているが、その実用化には、目的細胞への高効率な分化誘導技術の確立という重要課題が残されている。現在、この分化効率低下の原因として、「多能性幹細胞の不均一性」が挙げられている。未分化な幹細胞の単一コロニー中にはもともと形態や性質の異なる複数の細胞が混在するため、一方向への分化刺激に対しても複数の細胞応答が引き起こされてしまう。しかし、現在までその不均一性の発生メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。本研究では、この多能性幹細胞の不均一性を生み出す候補因子として、細胞内外で異なる機能を発揮するユニークな膜タンパク質群 syntaxin に着目し、その局所的な発現と機能によって、幹細胞集団に不均一な分化状態が生じる可能性を見出した。通常、syntaxin は細胞膜の内側にアンカーされ、小胞の膜融合を媒介するが、細胞外からの種々の刺激を受け取ると、一部が膜の内側から外側へと反転し、隣接細胞に局所的なシグナルを伝えることができる。まず、これまで表皮角化細胞において細胞外提示が実証されている syntaxin-4 について未分化な ES 細胞表面での発現を確認したところ、コロニー中の一部の細胞が syntaxin-4 を局所的に細胞外提示することが判明した。さらに、マウス ES 細胞を均一な未分化状態 (ground-state) で維持するために用いられる MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤 (2i) によって syntaxin-4 の細胞外提示が抑制されることも明らかとなった。しかし、これまで細胞外 syntaxin-4 が多能性幹細胞に与える影響については一切報告されていない。そこで次に、ES 細胞や種々の EC (胚性癌) 細胞に syntaxin-4 を細胞外に強制提示させる系と機能阻害組み換えタンパク質を作用する系を組み合わせることで、幹細胞への機能を解析した。その結果、ES 細胞や EC 細胞では細胞外 syntaxin-4 によって EMT (上皮間葉転換) 様の形態変化や中胚葉系列への分化が誘導されることがわかった。また、トランスクリプトーム解析により、E-cadherin から P-cadherin へのスイッチや、未分化維持因子 Zscan4 の顕著な発現抑制が検出された。さら

に、これらの発現変動には PI3K/Akt シグナルの不活性化が深く関与することが明らかとなった。以上の変化は、多能性維持因子である LIF 存在下でも誘導されることから、未分化維持培地中において、個々の幹細胞表面で不均一に発現する syntaxin-4 のシグナルを受け取った細胞は、完全な未分化状態を維持できず、結果として、細胞集団の不均一性が創出される可能性が示された。

第 2 章 序論

第 1 節 胚性幹細胞の不均一性

私たちの体はたった一つの受精卵からはじまり、その細胞が絶えず増殖・分化することで、成人になる頃には 270 種類以上、総数にして約 37 兆個の細胞で構成されるようになる¹。多能性幹細胞である ES (Embryonic stem)、iPS (Induced pluripotent stem) 細胞は理論上、生体内のあらゆる細胞へ分化することが可能であるため、次世代再生医療の強力なツールとして世界中でその応用が期待されるとともに、初期発生分野の学術的な研究材料としても広く用いられている^{2,3}。

これまで、未分化な多能性幹細胞は均一な細胞集団であると考えられていたが、近年、非分化誘導条件下においても、異なる形態や分化状態を示す細胞が複数出現し、「不均一な細胞集団」となるとことが明らかになってきた⁴⁻⁸。例えば、マウス ES 細胞では未分化維持に必要とされている LIF (Leukemia inhibitory factor) を添加した培養条件では、JAK-Stat や PI3K/Akt シグナルを介して多能性マーカーである Oct3/4 の発現が保たれているが^{9,10}、その未分化維持転写ネットワークに属する Nanog や Rex1 等の遺伝子発現は一つのコロニー内で均一ではなく、個々の細胞間で大きくばらついている⁵⁻⁷。Nanog 陰性細胞は始原内胚葉細胞に似た性質を示す一方、Rex1 陰性細胞は ES 細胞を取得する時期の内部細胞塊 (ICM) より分化の進んだ胚盤葉上層 (Epiblast) や始原外胚葉様の細胞に近い性質を有し、体細胞への分化ステージに速やかに移行できる状態であると言われている^{6,9,11}。また、周期的に発現量が変動する転写因子として知られる Hes1 は、個々の ES 細胞でその変動タイミングが異なるため、一定時間で見ると単一コロニー内での発現は不均一になっている¹²。分化状態としては、Hes1 の発現レベルが高いものは中胚葉系列へ、低いものは外胚葉系列の

細胞に分化しやすい性質を有することが報告されている (図 1-A)¹²⁻¹⁵。

一方、幹細胞は機能的な分化に伴って、その細胞形態もダイナミックに変化させることが広く知られている^{16,17}。完全な未分化状態にある ES 細胞は丸く、細胞間接着が密なコロニーを形成するが、分化刺激が伝わることで扁平化し、個々の細胞が散在した形態をとることが分かっている¹⁸⁻²¹。さらに近年、脂肪細胞由来の幹細胞において人工的に誘導した形態変化が分化開始の引き金になることも報告されており、多能性幹細胞の形態と分化の密接な関与が伺える^{22,23}。

ES 細胞はコロニー形成時の形態や細胞間結合タンパク質の発現から上皮細胞に近い性質を有しており、その分化の初期段階には EMT (Epithelial mesenchymal transision, 上皮間葉転換) が関与するという報告もある^{16,18,24}。EMT はその名の通り、上皮から間葉への形態の移行により定義づけられる。典型的な EMT では、丸みを帯びた上皮細胞様の形状から扁平化した間葉系細胞様への形態変化に伴い、転写因子 Snail 因子群による、E-cadherin の発現抑制が多く見られている^{25,26}。また、ES 細胞においても、E-cadherin の発現減少は、多能性に関わる PI3K/Akt シグナルを抑制し、未分化性を破綻させることが知られている^{27,28}。さらに、EMT では E-cadherin の発現量低下にともなって別の種類の cadherin の発現が上昇する cadherin スイッチという現象が多数報告されている。一般的には E-cadherin から N-cadherin への移行 (E- to N-cadherin スイッチ) が有名だが^{29,30}、近年、乳腺や膵臓などの複数のガン細胞の浸潤転移および形態変化に伴って E-cadherin から P-cadherin へのスイッチ (E- to P-cadherin スイッチ) が誘導されることも観察されている (図 1-B)³¹⁻³⁵。

また近年、着床前期マウス胚の各ステージにおける遺伝子発現プロファイリングの解析により、二細胞期に特異的に発現する遺伝子として *zscan4* が同定された³⁶。*zscan4* は二細胞期胚と ES 細胞に特異的に発現する遺伝子で、テロメラーゼに依存しないテロメアの伸長やゲノムの安定性を維持することで、自己増殖中も常に未分化状態を維持するための重要な役割を果たしている^{37,38}。さらに、iPS 細胞作製時に 24 時間 *zscan4* を活性化するこ

とで大幅に作製効率が促進されるとともに、早期に着床前期胚特異的な遺伝子群が活性化することも報告された³⁹。また、*zscan4* の発現は未分化維持因子 LIF レセプターの下流である PI3K/Akt シグナルによって正に制御されていることから、幹細胞の多能性維持に重要な遺伝子であると考えられている^{40,41}。

このように、幹細胞の分化制御についてのメカニズムは国内外で広く研究されているにもかかわらず、幹細胞のコロニーから不均一な細胞集団が局所的に出現するメカニズムについては未だほとんど明らかになっていない^{2,8,42}。再生医療において、この局所的な不均一性は、目的細胞への分化誘導時に、複数方向に分化した細胞や未分化状態を保ったままの細胞の創出に起因し、その結果ターゲット細胞の取得効率低下の原因となると考えられている⁶。また、学術面においては、一つの受精卵から派生した一種のクローナルな細胞集団において、複数の異なる性質を有する細胞が出現する初期発生の重要な仕組みを現わしているという報告もある^{14,15}。これらのことから、多能性幹細胞の不均一性を引き起こす原因因子の同定および詳細な機構解明は、医療応用のみならず発生学的観点からも重要であると考えられる。

多能性幹細胞に局所的な不均一性を付与する新たな候補因子の特徴として、以下の二つのことが考えられる。一つ目は、遺伝的背景が同一な細胞集団の一部で発現し、隣接細胞に局所的な分化や形態変化のシグナルを送ること（特徴①）である。コロニーの一部の細胞のみに局所的な刺激を与えるということは、分泌拡散されるタンパク質よりも、細胞膜近傍で機能発現する非拡散性の膜タンパク質である可能性が高い。また、マウス ES 細胞では、樹立直後から未分化維持に必要とされる LIF を添加した培養条件下でこの不均一性が観察されているが、その条件にさらに 2i と呼ばれる MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤を添加することで、ES 細胞は機能および形態的に均一な基底状態（Ground-state）での維持が可能となり、この状態の ES 細胞を胚盤胞に移植するとキメラ形成能が大きく亢進することが知られている^{4,43,44}。このことから、候補因子の2つ目の性質として、2iの有無によって機能発現の ON/

OFF が切り替わること（特徴②）が考えられる。

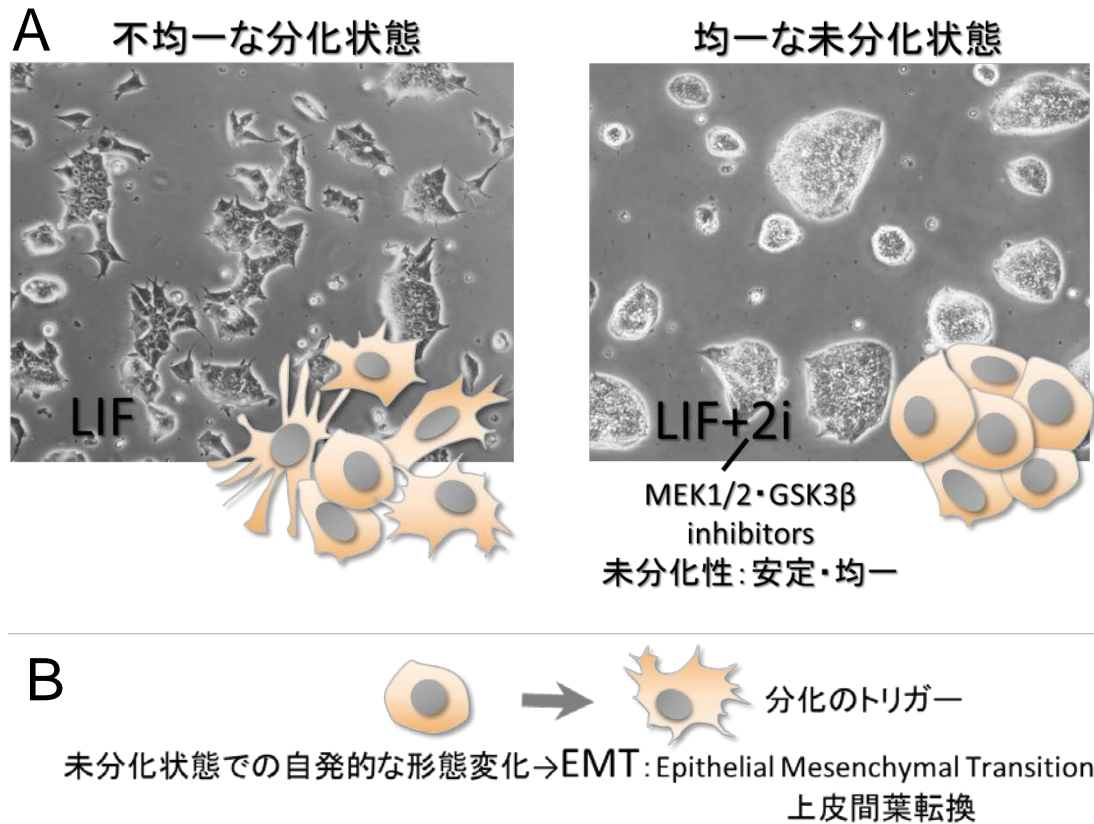


図 1: マウス ES 細胞の不均一性の概念図

A: LIF 添加培地では個々の細胞が不均一な形態や性質を示すのに対し、2i (MEK1/2 および GSK3β の阻害剤) を添加することで未分化状態が均一に保たれる⁴。

B: 特定方向への分化刺激なしに起こる、自発的な形態変化には EMT が関与する²⁴。

第2節 syntaxin-4 の機能

t-SNARE ファミリータンパク質として知られる syntaxin は、通常 C 末端側の疎水性膜貫通領域 (TM: trans membrane 領域) が膜に固定されており、細胞内の小胞輸送における標的膜への膜融合に関与する (図 2)⁴⁵⁻⁴⁷。

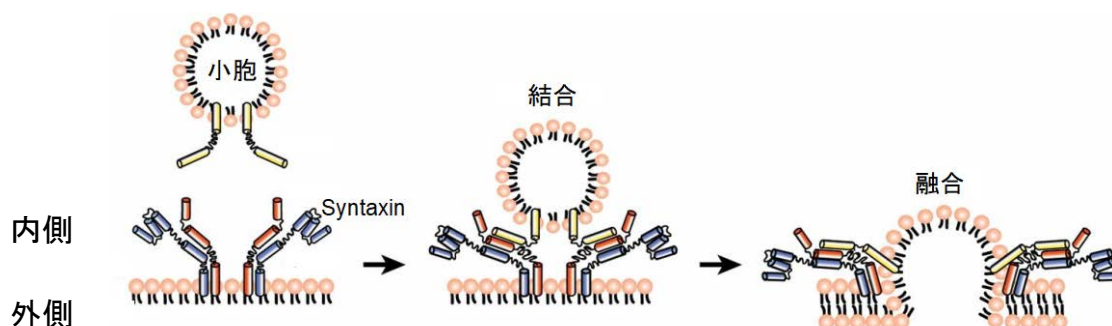


図 2: 小胞輸送過程における syntaxin の細胞内機能

syntaxin は C 末端側の TM 領域で膜に埋め込まれており、細胞内では t-SNARE タンパク質として、小胞輸送における標的膜への膜融合の最初の段階に関与する。

一方で、興味深いことに、細胞膜に局在している syntaxin ファミリーの一部は外部からの刺激に応答した膜反転を契機に細胞の外側に提示され、細胞内とは全く異なる機能を発揮する⁴⁸⁻⁵³。この機能発現には新たな転写や翻訳が必要とされないため、即座に隣接する細胞に局所的な刺激を与えることができると考えられる。一例として、syntaxin ファミリー分子の一つである epimorphin (別名 syntaxin-2) は SNARE タンパク質として小胞輸送に関与するだけでなく外部刺激に応じて一部が特定の細胞から分泌されると、シグナル伝達因子としての機能を発揮することが知られている⁵⁴。皮膚において epimorphin は、細胞膜の細胞質側でホスファチジルセリンと結合している Synaptotagmin や Annexin II と複合体を形成しているが、オレイン酸、カルシウム流入およびアポトーシスによって引き起こされる細胞ストレスにより、ホスファチジルセリンの膜反転に伴って細胞外へ提示された後、即座に切断され細胞外へ分

泌される^{55,56}。分泌された epimorphin は、表皮層の表皮角化細胞の受容体に作用し、表皮角化細胞の分化を制御する。これ以外にも細胞外 epimorphin は肺や乳腺の分枝形成、内皮細胞の管腔形成など、種々の組織の形態・機能分化に関わることが明らかになっている^{48,50,54,56} (図 3)。

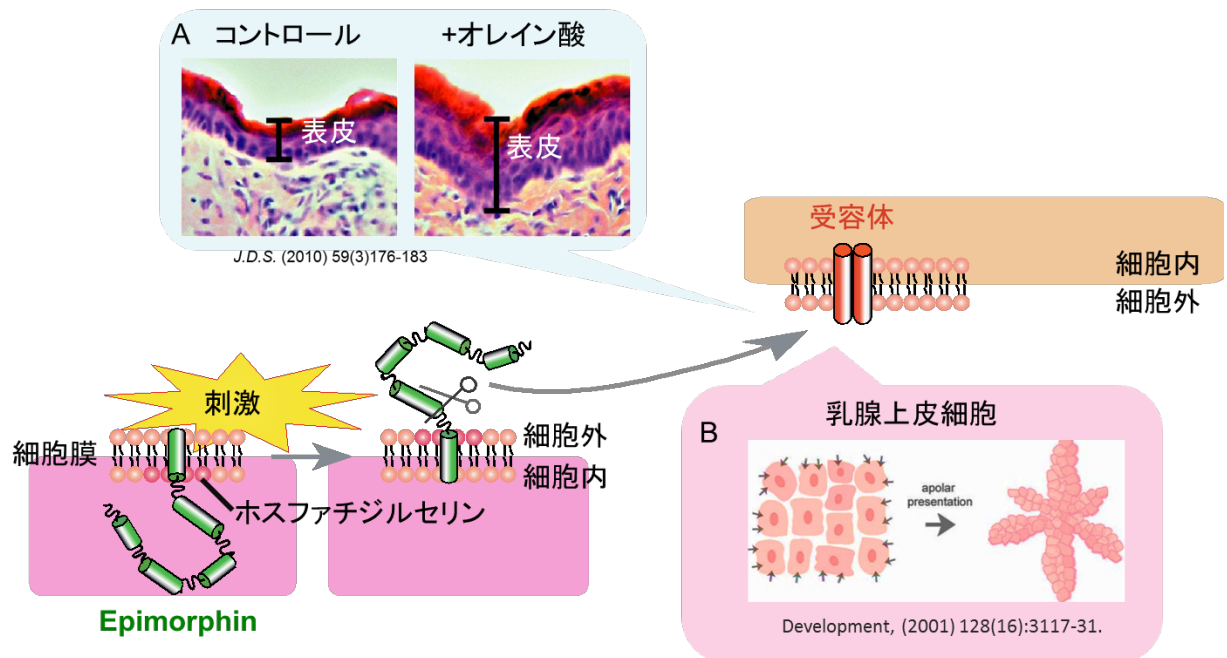


図 3: epimorphin の 細胞外機能の概要

epimorphin は、細胞膜の細胞質側で Synaptotagmin や Annexin II と複合体を形成しているが、種々の細胞外からの刺激により、ホスファチジルセリンの膜転移に伴い細胞外へ提示された後、切断され細胞外へ分泌される。分泌された epimorphin は周辺細胞の受容体に作用し、表皮細胞の分化異常を促すことが知られている (A)⁵⁶。また特定の方角からの epimorphin 刺激によって乳腺上皮細胞の分岐形成が促進されることなども報告されており (B)、細胞外 epimorphin は多様な細胞の分化や形態変化に深く関与している^{50,55}。

これらの先行研究を受け、近年当研究室において epimorphin と同じ syntaxin ファミリーに属する syntaxin-4 も一部が細胞外に発現しており、細胞内とは異なる作用を引き起こすことが報告された^{49,52,57}。syntaxin-4 は epimorphin と同じく、N 末端側から 3 つの α -ヘリックス領域、SNARE および TM 領域からなり、分子内にコイルドコイル複合体を形成する特徴的な

配列を有している (図 4) ^{47,57,58}。syntaxin-4 と epimorphin の構造を比較すると、アミノ酸配列の相同性は約 40%程度であるが、分子量および 2 次構造やドメイン構造は非常によく似ている (図 4)^{57,59}。先行研究において、表皮ケラチノサイトにおいて syntaxin-4 の局在が調べられ、外部からの刺激のない状態でも細胞表面に提示されていることが明らかとなった。さらに、その細胞外の機能として表皮の角質化および酸化ストレス耐性の促進といった、表皮細胞の分化や成熟に関わることが判明した ⁵²。

さらに、epimorphin は細胞外に提示された後、速やかに切断され分泌型となるのに対し、同じく細胞膜に局在する syntaxin-4 は細胞外に提示された後切断されることなく非拡散性のタンパク質として機能することが示された ⁵⁷。その機能発現の違いには MMP による切断部位近傍のアミノ酸配列の違いによると考えられている。分泌前の epimorphin の分子量は 34kDa だが、MMP-14 によって切断されると 30 kDa 付近に検出される。その切断には epimorphin の膜貫通領域から 20 番目の切断領域直後のヒスチジン残基が必須であることが知られており、先行研究においてヒスチジンをアルギニンに置換した変異型 epimorphin は切断が阻害されることが示されている ⁵⁵。それと同様に、syntaxin-4 の予定切断領域直後のアミノ酸はヒスチジンではなくアルギニンであるため、epimorphin と比較して syntaxin-4 は細胞外提示された際分泌されず、より限定的な場所で機能を発揮すると考えられている ⁵²。

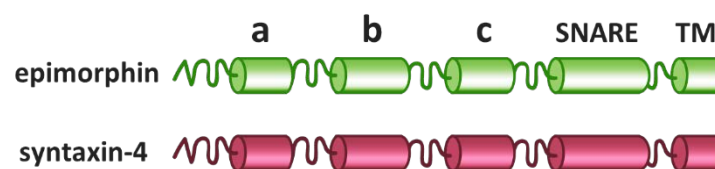


図 4: syntaxin-4 および epimorphin の推定 2 次構造

syntaxin-4 および epimorphin は 3 つのヘリックス a、b および c、SNARE 領域、TM 領域で構成されている。これらのアミノ酸配列の相同性は 40%程度であるが、分子量および 2 次構造は非常によく似ている ⁵⁷。また、epimorphin は細胞外提示された後、即座に切断され分泌型となるが、syntaxin-4 は細胞外に提示されたまま細胞膜に留まることがわかっている ⁵²。

そこで、本研究では多能性幹細胞の不均一性を付与する新規候補因子の同定を目的とし、先述の特徴①に示した、隣接細胞に局所的な分化や形態変化刺激を伝達する可能性のある膜タンパク質 syntaxin-4 に着目した。しかし、これまでの細胞外 syntaxin-4 の機能は、すでに分化が進行した乳腺や表皮の細胞のみで調べられており、発生のもっとも初期段階に位置する多能性幹細胞における機能については全く未解明であった。そのため、まず、syntaxin-4 の ES 細胞表面での不均一な発現および 2i の有無による発現パターンの変化について確認し、その後、細胞外 syntaxin-4 の分化や形態への機能を解析することとした (図 5)。

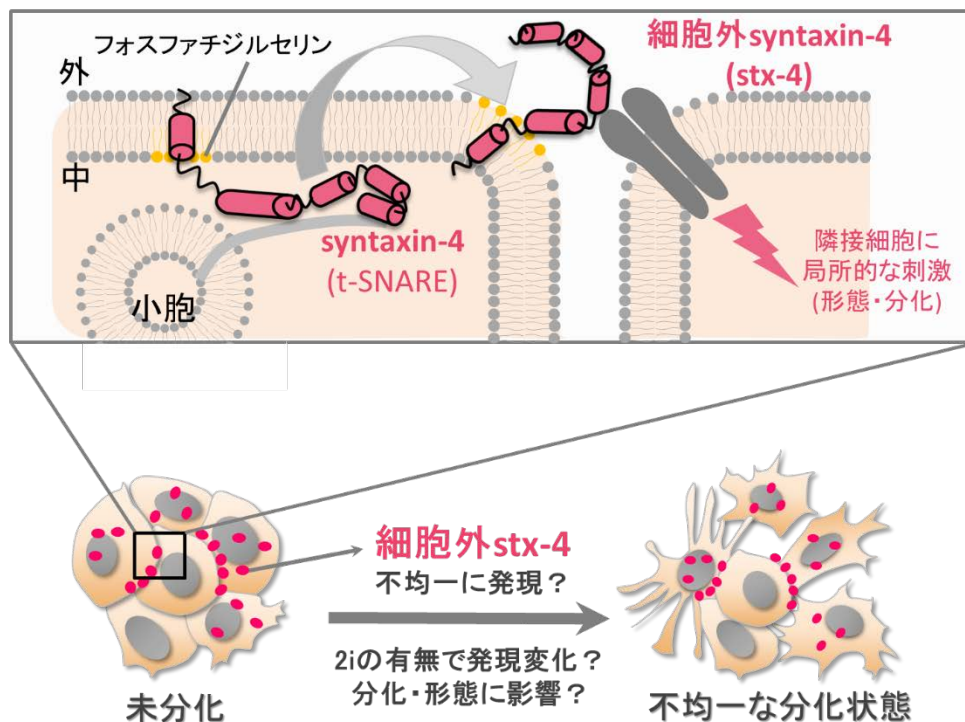


図 5: 本研究の概略図

本研究は未分化な ES 細胞に不均一性を生み出す候補因子として、遺伝的背景が同一の細胞集団の中で隣接細胞に局所的な刺激を与えることが可能な syntaxin-4 に着目した。まず、syntaxin-4 が未分化細胞表面で不均一に発現すること、また、幹細胞の均一化を促す 2i によりその発現パターンが変化することを解析した後、syntaxin-4 を ES 細胞に作用させ、分化や形態に与える影響およびその分子メカニズムについて調べた。

第 3 章 材料と方法

第 1 節 細胞培養

マウス ES 細胞 E14-Tg2A (Parental ES) および細胞外 syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞 (ES-STstx4) は 0.1%のゼラチンを塗布した培養皿に播種し、ES 細胞用培地 [GMEM (Wako 社製)、10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen 社製)、1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich 社製)、0.1 mM penicillin/streptomycin L-glutamine (Wako 社製)、0.1 mM Non-essential Amino Acids (NEAA) (Wako 社製)、0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich 社製)、leukemia inhibitory factor (LIF) (Wako 社製)] にて培養した。また、未分化状態を均一に維持するために必要な MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤の添加実験 (第 4 章 第 1 節および第 3 節) では、ES 細胞用培地に 1 μ M の PD0325901 (Invitrogen 社製) および 3 μ M の CHIR99021 (Invitrogen 社製) (2i) を加えて 3 日間培養した。また、コントロールとして等量の DMSO (Wako 社製) を添加した。細胞の維持は、ES 細胞用培地に 2i (上記と同濃度) を添加した状態で行い、各実験では、実験開始前に 2iを除いた ES 細胞用培地に交換し、1 日以上培養したものをを用いた。

マウス胚性ガン細胞 (EC 細胞) 由来の F9 細胞 (ATCC CRL-1720)、syntaxin-4 発現誘導細胞 (F9-STstx4)、syntaxin-4 安定発現細胞 (F9-sig-stx4) および P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) には、DMEM/HamsF12 (DH) (Wako 社製) に最終濃度が 10%となるように FBS (Invitrogen 社製) を加えた培地 (DH10) を用意し、そこに 50 U/mL penicillin (Meiji Seika ファルマ社製)、50 μ g/mL streptomycin (Meiji Seika ファルマ社製) を添加した培養液を用いた。また、同じく EC 細胞由来の P19CL6 細胞 (RIKEN BRL RCB2318)、syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) では、Alpha modified MEM (α -MEM) (Wako 社製) に最終濃度が 5%となるように FBSを加えた培地に、さらに 50 U/mL penicillin、

50 µg/mL streptomycin を添加し、培養液を調製した。ES-STstx4、F9-STstx4、F9-P-cad および P19-STstx4 は 5 µg/ml Doxycycline (DOX) (Sigma-Aldrich 社製) を 2 日もしくは 3 日間添加し、外来遺伝子を発現誘導した。また ES-STstx4 に 1.25 µM および 2.5 µM の PI3K 阻害剤 (LY294002) (Wako 社製) を添加した実験 (第 4 章 第 3 節) では、コントロールとして、等量の DMSO を添加した。なお、今回用いた全ての細胞は 37°C、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で無菌的に培養した。

第 2 節 発現コンストラクトの作製および遺伝子導入

細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin 発現誘導 ES・F9・P19CL6 細胞

DOX により細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin の発現誘導が可能なコンストラクトを作製するために、N 末端に IL-2 のシグナルペプチドと T7 タグを付加した syntaxin-4⁵⁷ と P-cadherin の cDNA (竹市雅俊先生から頂いたもの)⁶⁰ を PiggyBac-TET transposon プラスミド⁶¹⁻⁶⁴ の *Not* I と *Eco*R I 制限酵素サイトにクローニングした。また、このプラスミドには IRES (Internal ribosome entry site) の下流にネオマイシン耐性遺伝子が連結されているため、理論上、薬剤選択で生き延びた細胞株は外来遺伝子を発現する。この PB-TET-T7-syntaxin-4 -IRES-Neo および PB-TET-T7-P-cad-IRES-Neo それぞれのコンストラクトとともに、PB-CA-rtTA Adv と pCAG-Pbase⁶¹ の計 3 種のプラスミドを Lipofectamin 2000 (Life technologies 社製) にて ES、F9 および P19CL6 細胞に遺伝子導入した。2 日後 G418 (Gibco 社製) (終濃度: 500 µg/ml) および DOX (5 µg/ml) を添加し 1 週間セクションした。その後 DOX を除き 5 日間培養したものを用いて、DOX の有無による外来遺伝子の発現確認を免疫染色および qRT-PCR にて行った (ES-STstx4、F9-STstx4、F9-P-cad および P19-STstx4)。また、今回は単一コロニーの選択によるクローナルアーティファクトを避けるため、薬剤耐性を示した複数コロニーが混合した状態で培養した。

細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin の一過性発現細胞

一過的に syntaxin-4 を発現した ES 細胞 (ES-T7stx4) を作製するために、pQCXIN Retroviral Vector (Invitrogen 社製) に T7 タグ付き syntaxin-4 が挿入されたコンストラクト (T7-stx4) (当研究室で作成済み)⁵⁷ を Lipofectamin 2000 にて ES 細胞に遺伝子導入し、3 日後免疫染色を行った。一過的に P-cadherin を発現した細胞 (P19-P-cad) は、上記の PB-TET-T7-P-cad-IRES-Neo および PB-CA-rtTA Adv を Lipofectamin 2000 にて P19CL6 細胞に遺伝子導入し、24 時間後 DOX を添加し、さらに 2 日後免疫染色および qRT-PCR を行った。

細胞外 syntaxin-4 の安定発現 F9 細胞

細胞外 syntaxin-4 を恒常的に発現する F9 細胞 (sig-stx4) を作製するために、N 末端に IL-2 のシグナルペプチドおよび T7 タグが付加された syntaxin-4 を pIRES2-DsRed2 vector (Clontech 社製) の DsRed を EGFP に置換したベクターに挿入したコンストラクト (sig-T7-syntaxin-4) (当研究室にて作成済み) をエレクトロポレーション法により F9 細胞に導入した。エレクトロポレーションは CUY21 Pro-Vitro 遺伝子導入装置 (Nepagene 社製) を用いて 125 mA、15 msec にて行い、3 日後に 500 µg/ml G418 (Gibco 社製) 含有 DH10 培地に交換し、1 週間薬剤選択を行った。また、コントロールとして外来遺伝子を挿入していない pQCXIN Retroviral Vector (empty vector) を導入した F9 細胞 (empty) を取得した。

第 3 節 細胞の蛍光免疫染色

コラーゲン A1 (新田ゼラチン社製) でコートしたガラス 4 穴チャンバースライド (Falcon 社製) に培養細胞を播き、染色前に上清を除いた。冷メタノールで 10 分間固定後、TBS (Tris を 50 mM、NaCl を 150.6 mM、CaCl₂ を 1.3 mM 含む水溶液を HCl で pH を 7.4 に合わせた溶液) で希釈した 2.5% スキムミルク (BD 社製) にて 1 時間ブロッキングした。TBS

にて洗浄 (5 分×3 回) 後、2. 5%スキムミルクを含む TBS で希釈した一次抗体を室温で 1 時間反応させた。TBS で洗浄 (5 分×3 回) 後、2. 5%スキムミルクを含む TBS で希釈した一次抗体を 1 時間反応させた。TBS にて洗浄 (5 分×3 回) 後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000) (Sigma-Aldrich 社製) で染色し、封入した。なお F-actin と二重染色を行ったサンプルに関しては、0.1% tritonX-100 にて固定を行い、抗体の代わりに F-actin に直接結合する Alexa-flour488 標識 Phalloidin (Invitrogen 社製) を用いて染色した。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 A1 (Nikon 社製) もしくは CCD camera VB-7010 (Keyence, Japan 社製) 付きの蛍光顕微鏡 AXIOSHOP (Zeiss 社製) を用いて観察した。

一次抗体は、抗 P-cadherin 抗体 (1:200)、抗 T7 抗体 (1:500) (Novagen 社製)、 α -SMA (Sigma-Aldrich 社製) (1:500)、ECCD2 (竹市雅俊先生からの頂いた) (1:200) を使用した。二次抗体は、Alexa-flour488 標識抗ラビット IgG 抗体 (1:200) (Molecular Probe 社製)、Cy3 標識抗ラット IgG 抗体 (Sigma-Aldrich 社製) および Cy3 標識抗マウス IgG 抗体 (1:500) (GE Healthcare 社製) を使用した。

第 4 節 ウェスタンブロッティング

培養細胞を 1×SDS サンプルバッファーに懸濁し細胞溶解液を作製した。試料は 12%アクリルアミドゲルを用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により展開後、イモビロン-P PVDFメンブレン (Millipore社製) に転写し、TBSにて希釈した 5%スキムミルクを用いて室温で 60 分間ブロッキングした。メンブレンはそれぞれHRP標識抗 T7 抗体 (1:1000) (Novagen社製)、抗syntaxin-4 抗体 (1:200)、抗 α -SMA (Sigma-Aldrich社製) (1:500)、抗Akt抗体および抗リン酸化Akt抗体 (Ser473) (CST Japan) (1:500)、抗 β -actin抗体 (1:1000) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。抗 P-cadherin抗体 (1:200) および抗 E-cadherin抗体(1:200) は竹市雅俊先生から頂いた。二次抗体は、HRP標識抗マウスIgG抗体 (1:1000) (GE Healthcare社製)、HRP標識抗ラビットIgG抗体 (1:1000) (GE Healthcare

社製) およびHRP標識抗ラットIgG抗体 (1:1000) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。最後に、ECL plus (GE Healthcare社製) を用いて検出した。なお、ポリクローナル抗syntaxin-4 抗体はsyntaxin-4 の組換えタンパク質をラビットに免疫することにより当研究室で作製されたものを使用した⁵⁷。なお、定量化は解析ソフトImageJで行い、 β -actinで標準化した⁶⁵。

第 5 節 細胞表面のタンパク質のビオチン化による検出

6 穴細胞培養皿 (nunc 社製) に ES 細胞を播き、T7-stx4 を遺伝子導入した。2 日後、培養上清を捨て、PBS で 2 回洗浄後、PBS で希釈した 100 μ g/mL の sulfo-NHS-biotin (thermo 社製) を添加し、15 分間氷上で反応させた。反応液を捨て、DH10 培地で洗浄し反応を停止させた。細胞溶解緩衝液 (PBS 中に 1 % Triton X-100、0.1 % アジ化ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤カクテルを混合した溶液) を添加した試料を、13,000 rpm、30 分間、遠心し上清を回収した。NeutrAvidin agarose beads (Invitrogen 社製) を添加し 1 時間転倒混和した後、遠心し、細胞溶解緩衝液で 3 回洗浄した後、1 \times SDS サンプルバッファーを添加した。目的のタンパク質をウェスタンブロッティング法により抗 syntaxin-4 抗体 (1:200) を用い検出した。

第 6 節 細胞表面 syntaxin-4 の免疫沈降

6 穴細胞培養皿 (falcon 社製) に ES 細胞を播き、T7-stx4 を遺伝子導入した。2 日後、培養上清を捨て、PBS で 2 回洗浄後、細胞溶解緩衝液に懸濁した。細胞溶解液を 13,000 rpm にて 30 分間遠心後、それぞれの上清のみを回収した。これらに、抗 syntaxin-4 抗体 (1:200) を添加し、1 時間反応させた。そこへプロテイン G ビーズ (GE Healthcare 社製) を添加した。1 時間反応させた後、ビーズを細胞溶解緩衝液で洗浄し、1 \times SDS サンプルバッファーを添加後、ウェスタンブロッティング法にて HRP 標識ストレプトアビジン (Sigma-Aldrich

社製) (1:1000) および抗 T7 抗体 (1:1000) (Novagen 社製) にて検出した。

第 7 節 組換えタンパク質の作製

組換えタンパク質 Green Fluorescent Protein (GFP)、syntaxin-4 の Fragment1 (F1)、Fragment2 (F2) および Fragment3 (F3) は、TaKaRa Competent Cell BL21 (Takara 社製) に発現させた。これらの組み換えタンパク質を作製するために使用したコンストラクトは当研究室で既に作製されていた⁶⁶。GFP、F1 (Met1~Glu110)、F2 (Ala111~Arg197) および F3 (Gln198~Lys272) の各々の N 末端に His タグ (ヒスチジン 6 個) を付加したインサートをタンパク質高発現ベクター pET3a ベクター (Novagen 社製) の *Eco* R I サイトに組み込んだベクター (GFP-pET3、F1-pET3a、F2-pET3a および F3-pET3a) を用いた。各種プラスミドを用いて TaKaRa Competent Cell BL21 を形質転換後、アンピシリン含有 LB 培地に播き、30℃で 16 時間振盪培養後、終濃度 2 mM の IPTG (Takara 社製) によりタンパク質の発現誘導を行った。30℃で 2 時間振盪培養した後、菌液を 5,000 rpm、10 分間、4℃で遠心し大腸菌を回収した。lysozyme (Sigma-Aldrich 社製) を 2 mg/mL の濃度に添加した洗浄用緩衝液 (0.1 M NaH₂PO₄、0.01 M Tris-HCl [pH 8.0]) に回収した大腸菌を懸濁し、30 分間反応させた。−80℃で 1 時間凍結した後、室温で溶解する行程を 3 回繰り返した。菌液に 1 mg/mL の DNase (Sigma-Aldrich 社製) を 100 μL 添加し 1 時間 37℃に置いた。菌液の粘性がなくなったところで 8 M urea 溶液 (洗浄用緩衝液に urea を 8 M の濃度に添加した溶液) を加え氷上で超音波破碎した。得られた破碎液は 7,000 rpm で 30 分間、常温で遠心し上清を回収した。Ni-NTA-agarose カラム (Qiagen 社製) を PBS (-) 溶液で平衡化した後、細胞溶解液の上清を通し、His タグ融合タンパク質をカラムに吸着させた。8M urea 溶液で洗浄後、イミダゾール溶液 (8 M urea に 250 mM の濃度にイミダゾールを添加し、pH8.0 に合わせた溶液) で溶出した。溶出したタンパク質溶液を透析チューブ (Spectrum Labs 社製) に入れ、1 L の PBS (-) で 12 時間ずつ、合計 3 回 PBS (-) を交換し透析した。

透析したタンパク質溶液を回収し、13,000 rpm、30 分間、4°Cで遠心し、上清（可溶性画分）と沈殿（不溶性画分）に分離し、可溶化区分を実験に使用した（組換えタンパク質 GFP、F1、F2 および F3）。

第 8 節 RT-PCRおよびqRT-PCR

培養細胞を 12 穴プレート (falcon社製) に播種し、翌日RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製) を用いてRNA抽出を行った。得られたRNA溶液に、RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ社製) に添付のプロトコルに従い、逆転写酵素およびRandom primerを含む逆転写用試薬を加えて、65°C、5 分間熱処理を行った後に、逆転写反応によりmRNAを鋳型とするcDNAを合成した。次いで、逆転写反応後溶液に、以下のプライマーセット、T7-syntaxin-4 (5'- GGG GCG GCC GCA TGG CTA GCA TGA CTG GTG GAC-3'、 5'-TTT TAG CTG CGC CCG GAC C-3') およびgapdh (5'-GGATTTGCCCGTATTGG-3'、 5'-TCATGGATGACCTTGCC-3') とQuick Taq HS DyeMix (TOYOBO社製) を用いて最終液量を 25 μ Lとなるよう調整し、94°C10 秒間、55°C 30 秒間、68°C1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクルのPCRをサーマルサイクラー用いて行った。PCR反応後溶液をエチジウムブロマイド入り 2.0%アガロースゲルにより電気泳動を行い、トランスイルミネーターを用いてUV照射下で写真撮影を行った。

qRT-PCR では、同上の条件で精製したcDNAとFastStart Essential DNA Green Master (Roche 社製) を最終液量 10 μ L となるように調整し、LightCycler Nano system (Roche 社製) を用いて PCR を行った (45 サイクル)。なお、定量化した全ての遺伝子発現はインターナルコントロールである β -actin の値で標準化した。用いたプライマーセットを以下に示す (表 1)。

表 1: qRT-PCRで使したプライマーセット

Target	Forward	Reverse
E-cadherin	GCTCTCATCATCGCCACAG	GATGGGAGCGTTGTCATTG
P-cadherin	GCACTGCTGACCCTTCTACTG	GGGCTCTTTGACCTTCCTCT
Brachyury	CCACAAAGATGTAATGGAGGAAC	GAACAAGCCACCCCCATT
α SMA	CTCTCTTCCAGCCATCTTTCAT	TATAGGTGGTTTCGTGGATGC
MHC	GAAGGAGGAGGAGCTTCAGG	TCCTTGAAGCCTTTTCAGACTC
BMP4	GAGGAGTTTCCATCACGAAGA	GCTCTGCCGAGGAGATCA
Tuj1	CCCACTCCATGTGAGTCCA	GCAACATAAATACAGAGGTGGCTA
Nanog	TTCTTGCTTACAAGGGTCTGC	CAGGGCTGCCTTGAAGAG
Oct3/4	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA	CTCCTTCTGCAGGGCTTTC
Slug	CATTGCCTTGTGTCTGCAAG	AGAAAGGCTTTTCCCCAGTG
Snail	CTTGTGTCTGCACGACCTGT	CAGGAGAATGGCTTCTCACC
Foxc2	GCAACCCAACAGCAAACCTTTC	GACGGCGTAGCTCGATAGG
Vimentin	TGCGCCAGCAGTATGAAA	GCCTCAGAGAGGTCAGCAAA
Cofilin	TCCTTCTTCTCGTCCCAGTG	TCATTCACTGTAACCTCAGATGC
Zscan4	GACTGAACTATCTAACATCCTCAGCA	TTGCAACATTCTTCTCTCTTTGA
Gata4	GGAAGACACCCCAATCTCG	CATGGCCCCACAATTGAC
AFP	TGGATGTCAGGACAATCTGG	GCAGCTTTGCTTGGACAGT
Zeb1	ACCCCTTCAAGAACCGCTTT	CAATTGGCCACCACTGCTAA
Gapdh	TGACCACAGTCCATGCCATC	GACGGACACATTGGGGGTAG
β -actin	CCTCACCCCTCCCAAAAGC	GTGGACTIONCAGGGCATGGA

第 9 節 細胞表面タンパク質の免疫蛍光染色法による検出

コラーゲンA1 (新田ゼラチン社製) でコートした 4 穴チャンバースライドに 50%の細胞密度で細胞を播種し、37°C、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で 2 日間培養した。培地中に一次抗体を添加し、1 時間 37°Cにインキュベートした後に培養上清を除去し、TBSで洗浄 (5 分×3 回) 後、4% PFA (PBS中に 4%となるようPFAを混合しpHを 7 から 8 に調整した溶液) で 10 分間固定した。さらに、TBSで洗浄 (5 分×3 回) 後、冷メタノールで 10 分間固定した。二次抗体をTBSで希釈した 5%スキムミルクで、1 時間反応させた。TBSにて洗浄 (5 分×3 回) 後、DAPI (1:1000) で核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡A1 もしくは CCD camera VB-7010 (Keyence, Japan 社 製) 付きの fluorescence microscope AXIOSHOP (Zeiss社製) を用いて染色状況を観察した。以下、免疫染色に用いた抗体と希釈率を示す。一次抗体は、抗syntaxin-4 抗体 (1:100)、抗T7 抗体 (Novagen社製) および抗β-actin抗体 (1:100) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。二次抗体はAlexa-fluor 488 標識抗ラビットIgG抗体 (1:200) (Molecular Probe社製)、Cy3 標識抗マウスIgG抗体 (1 :200) (Millipore社製) を使用した。

第 10 節 細胞外 syntaxin-4 による細胞形態の解析

細胞形態の観察のために、F9-STstx4、F9-P-cad、ES-STstx4 および P19-STstx4 を DOX 有り無しで 2 日間 (F9-STstx4、F9-P-cad)、3 日間 (ES-STstx4 and P19-STstx4) 培養した。長さ 10 μm 以上の仮足が 3 本以上伸展している細胞の数を計測した。P19-STstx4 に関しては、1 細胞の占める面積の割合を解析ソフト ImageJ を用いて定量化した⁶⁵。

第 11 節 RNA シーケンス解析

細胞外 syntaxin-4 により発現量に変化する遺伝子(differentially expressed (DE) genes) を調べるために、RIKEN CLST の分子配列比較解析ユニットにて次世代シーケンサーによる解析を行った。ES-STstx4 および親株の ES 細胞を DOX 有り無しで 3 日間培養した後 RNA を回収し、発現変動遺伝子を網羅的に解析した。ES-STstx4 で変化した遺伝子のうち親株で変化した発現量を差し引いて、細胞外 syntaxin-4 による変動遺伝子を 138 個見出した (発現変動率 2 倍以上かつ有意水準 q-value 0.01 以下のもの)。

第 12 節 Zscan4 遺伝子のノックダウン

Zscan4 遺伝子を ES 細胞において発現抑制するために、先行研究で報告されていたオリゴヌクレオチド siRNA (Nippon Gene 社製) を細胞に導入した³⁷。Zscan4 の Exon II に対する 4 本の siRNA (siRNA Zscan4 #1-4) (dTdT はオーバーハング⁶⁷) とコントロールである Hilyte488-labeled NEGS/NEGAS (Nippon Gene 社製) を 12 穴細胞培養皿に播種した ES 細胞にそれぞれ Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen 社製) を用いて導入した。3 日後 Zscan4 および P-cadherin の mRNA 発現量を qRT-PCR にて解析した。以下に用いた配列および Zscan4 siRNA のターゲット配列を示す (表)。

siRNA Zscan4#1

5' guagcgauaugaggagauudTdT 3'
3' dTdTcaucgcuaucuccucuaa 5'

siRNA Zscan4#2

5' gaccaacaauuagaguudTdT 3'
3' dTdTcugguuguuaaaucaaaa 5'

siRNA Zscan4#3

5' caccaagugcucagcuaaadTdT
3' dTdTgugguucacgagucgauuu 5'

siRNA Zscan4#4

5' gcugcaaagucucuggaagdTdT 3'
3' dTdTcgacguucagagaccuuc 5'

Control siRNA

Hilyte 488 -labeled NEGS/NEGAS
(universal negative control)

表 2: siRNA Zscan4 #1-4 のターゲット配列

Name of siRNA	Target position on cDNA (bp)	Target Sequences
siRNA Zscan4#1	514-532 (exon II)	gtagcgatatgaggagatt
siRNA Zscan4#2	236-254 (exon II)	gaccaacaatttagagttt
siRNA Zscan4#3	304-322 (exon II)	caccaagtgctcagctaaa
siRNA Zscan4#4	362-380 (exon II)	gctgcaaagtctctggaag

第 13 節 データ処理

定量結果の有意差検定には少なくとも 3 回の再現性確認実験とStudentのt検定、もしくはMann-WhitneyのU検定を用い、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

第 4 章 結果

第 1 節 マウスES細胞におけるsyntaxin-4 の細胞外局在

ES細胞表面でのsyntaxin-4 の自発的な発現

未分化維持因子LIFを添加した状態で培養したES細胞を用い、内在性syntaxin-4 の細胞外提示について免疫蛍光染色にて検証した。膜透過処理を行った後に一次抗体を作用し、細胞内外すべてのタンパク質を染色したもの (Total) では、細胞内タンパク質である β -actin とともにsyntaxin-4 がコロニー内で均一に局在していることがわかった (図 1-1 A)。一方、膜透過処理をする前に一次抗体を作用し、細胞外のタンパク質を染色したもの (Cell surface) では、細胞表面に提示されたsyntaxin-4 のみが染色された。さらに、その発現量は一つのコロニー内でも個々の細胞で大きく異なっており、syntaxin-4 は未分化維持培地中のES細胞表面で、不均一な発現パターンを示すことが明らかとなった (図 1-1 B)。

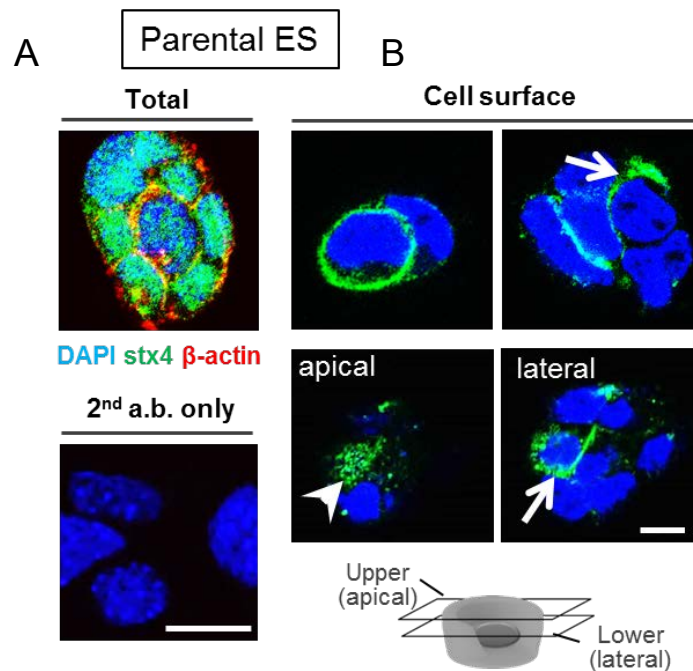


図 1-1: ES 細胞表面での syntaxin-4 の自発的な発現

A: 上: 膜透過処理後に一次抗体として syntaxin-4 (stx4) 抗体および β-actin 抗体を作
用し、細胞内外のタンパク質を染色した (Total)。

下: 二次抗体のみの染色

B: 上: 膜透過処理前に一次抗体を作用し、細胞外のみタンパク質を染色した (Cell
surface)。

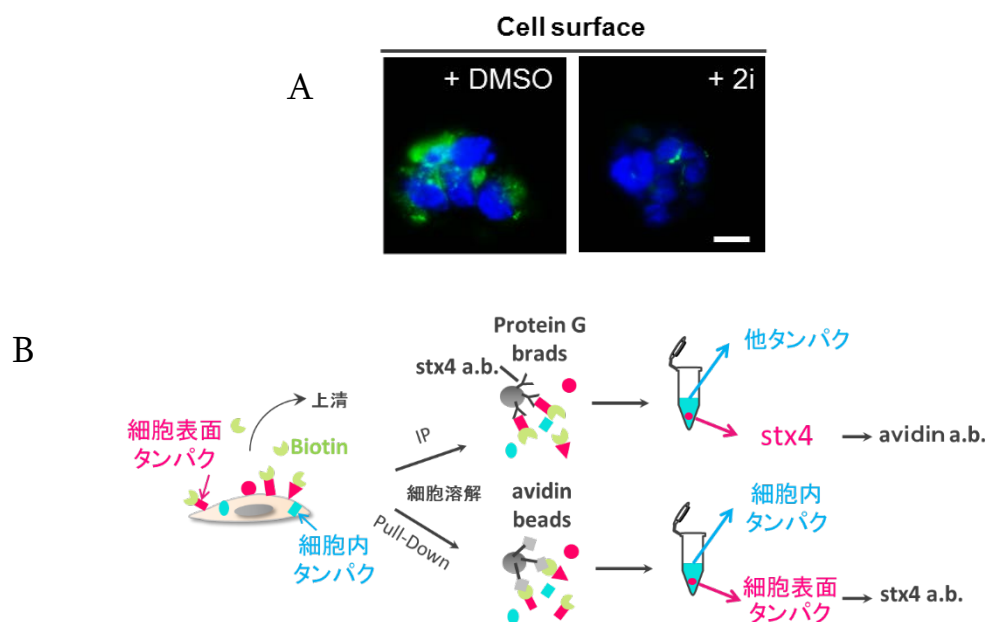
下: ひとつのコロニーの Apical 面と Lateral 面に焦点を当てた染色図

矢印および矢じりは syntaxin-4 の局在を示す。

内在性 syntaxin-4 (緑)、β-actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μm

MEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤による細胞外syntaxin-4 の発現変化

次に、マウスES細胞を強力に均一な未分化状態 (Ground state) で維持する作用を持ったMEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤 (2i)⁴を添加した場合の細胞外syntaxin-4 の局在を確認した。細胞表面の免疫染色にてコントロールのDMSOと比較したところ、その細胞外提示は抑制される傾向であることが分かった (図 1-2 A)。また、免疫染色で見られた、2iの作用によるsyntaxin-4 の細胞外提示の抑制を検証するために、T7 タグ付きのsyntaxin-4 (シグナルペプチド無し) を一過的に発現させたES細胞に 2iを作用させ、細胞表面タンパクのビオチン化を行った。その後、一つはsyntaxin-4 抗体で免疫沈降 (IP) を行い、T7 抗体で細胞内外のsyntaxin-4 (Total) と、ストレプトアビジン抗体で細胞表面のsyntaxin-4 (Cell surface) を検出した。もう一つは、NeutrAvidin agarose beadsを用いてプルダウンアッセイ (Pull-Down) を行い、syntaxin-4 抗体で検出した (図 1-2 B)。結果として、どちらの方法からも細胞外表面におけるsyntaxin-4 の発現量は 2iによって減少することが明らかとなった (図 1-2 C,D)。さらに、プルダウンアッセイにおける発現量の定量化を行ったところ、2iによる有意なsyntaxin-4 の細胞外提示抑制効果が見られた (図 1-2 D)。



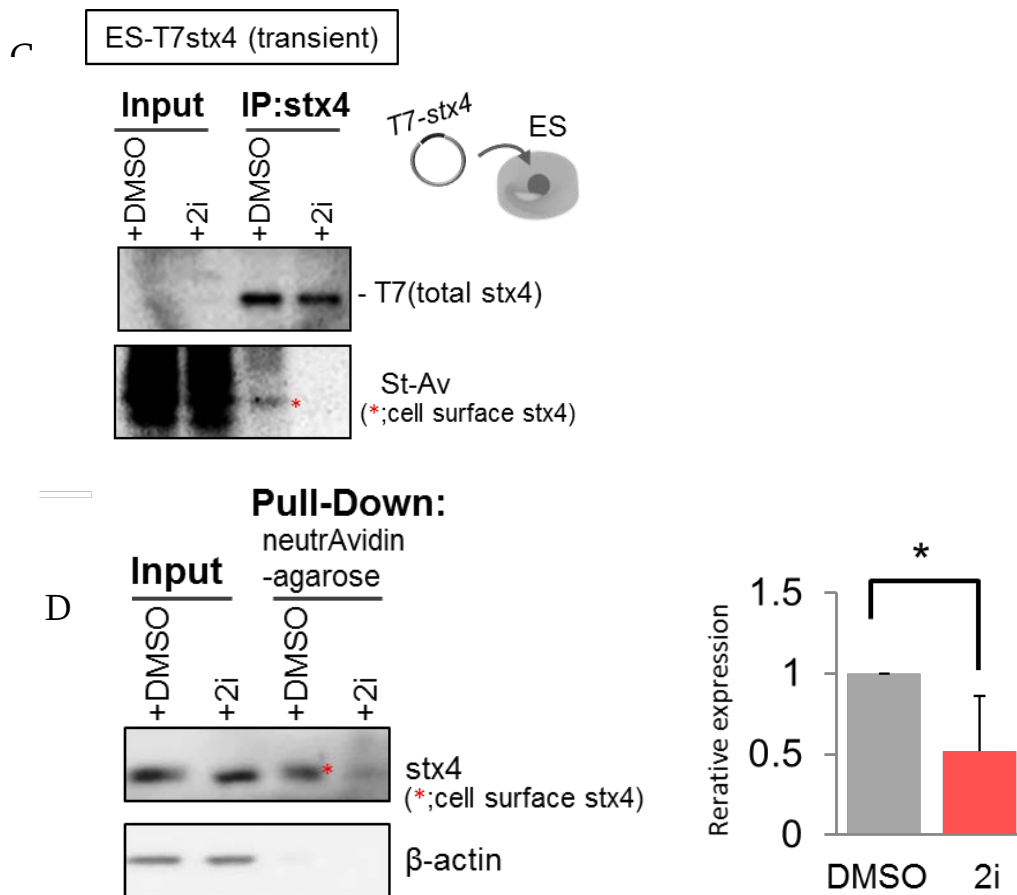


図 1-2: MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤 (2i) による細胞外 syntaxin-4 の発現量変化

- A: 2i (MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤) を添加したときの syntaxin-4 の局在を膜透過処理前に一次抗体を作用した細胞外染色にて調べた (Cell surface)。コントロールとして DMSO を使用した。
内在性 syntaxin-4 (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μ m
- B: 免疫沈降 (IP) およびプルダウンアッセイ (Pull-Down) の概要
- C: syntaxin-4 抗体で免疫沈降を行い、細胞内外 syntaxin-4 (Total) を T7 抗体で、細胞外 syntaxin-4 (Cell surface) を Strept avidin (St-Av) 抗体で検出した。
- D: 左:NeutrAvidin agarose beads でプルダウンアッセイを行い、syntaxin-4 抗体と β -actin 抗体 (インターナルコントロール) で検出した。
右:プルダウンアッセイによる細胞外 syntaxin-4 の発現量を β -actin の発現量で割り (Relative expression)、定量化した。N=3 *P<0.05

細胞外syntaxin-4 の発現細胞の割合

次に、LIF添加時に不均一な発現パターンを示したsyntaxin-4 の細胞外提示について定量化するために、T7 タグ付きのsyntaxin-4 を強制発現したES細胞を用いて免疫染色を行った。まず細胞膜透過処理を行った後にT7 抗体にて遺伝子導入効率を算出した、約 30%であることをたしかめた (図 1-3 A,C)。一方、同じ時に同条件で培養したサンプルを膜透過処理前にT7 抗体で検出したところ、細胞表面にsyntaxin-4 を発現していた細胞は約 6%であった (図 1-3 B,C)。このことから、遺伝子導入によって細胞内に多量にsyntaxin-4 が発現している細胞を 100%としたとき、そのうちの約 20%の細胞が膜表面にsyntaxin-4 を提示することが明らかとなった。

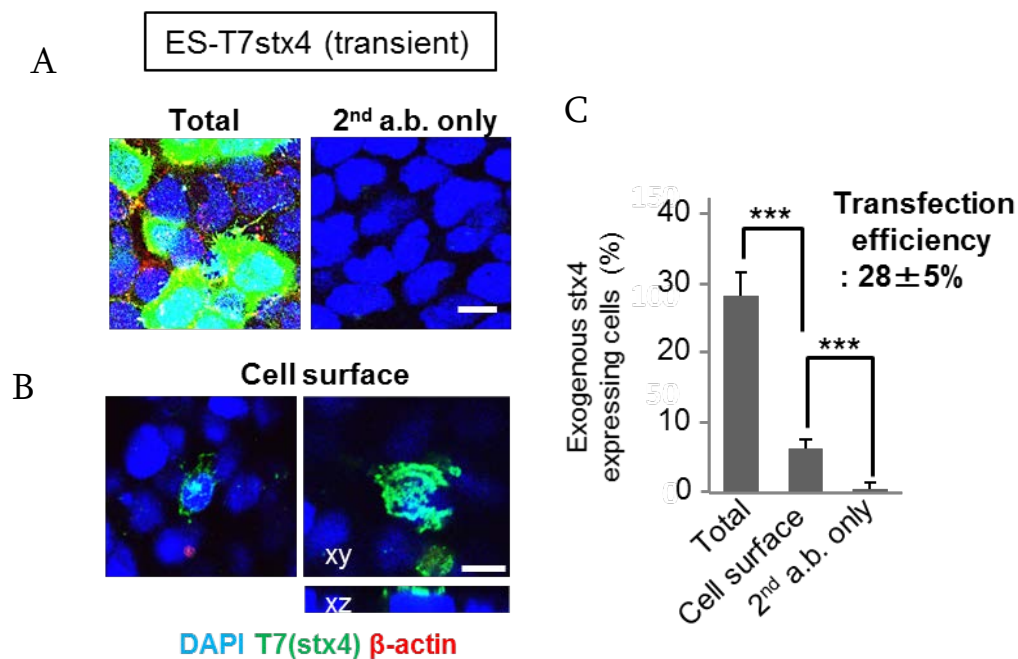


図 1-3: 細胞外 syntaxin-4 の発現量変化

T7-タグ付きの syntaxin-4 を一過的に発現させた ES 細胞 (ES-T7stx4) を LIF 存在下で培養し、免疫染色を行った。

A: 左:膜透過処理後に一次抗体として T7 抗体および β -actin 抗体を作用し、細胞内外のタンパク質を染色した(Total)。

右:二次抗体のみの染色

B: 左:膜透過処理前に一次抗体を作用し、細胞外のみタンパク質を染色した(Cell surface)。

右:同様に細胞外 syntaxin-4 を染色したものを XY 軸と XZ 軸で同時に撮影した図

内在性 syntaxin-4 (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μ m

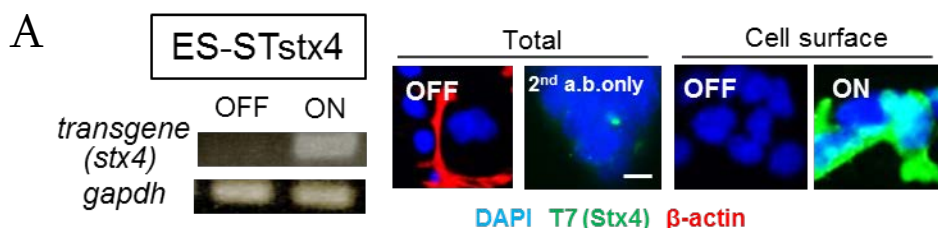
C: Total、Cell surface および二次抗体のみで、T7 抗体によって染色された細胞数を一視野あたりの細胞数で割った割合。Total からトランスフェクション効率($28 \pm 5\%$)を算出した。

N=18 ***P<0.001

第 2 節 細胞外syntaxin-4 による形態・分化への影響

細胞外syntaxin-4 によるES細胞の形態への影響

これまでの結果として、未分化なES細胞表面でsyntaxin-4 は不均一に発現しており、さらにその発現は未分化状態を均一化する 2iL によって抑制されることが明らかとなった。これらは、序論で述べたように、ES細胞の分化状態の不均一性にsyntaxin-4 が関わる可能性を示していると考えた。そこで次に、細胞外に提示されたsyntaxin-4 が多能性幹細胞であるES細胞にどのような影響を与えるのか、形態と分化に焦点を当て検討することとした。はじめに、細胞外に強制的に提示させるためのシグナルペプチドとT7 タグを付加したsyntaxin-4 をDOX (Doxycycline) によって発現誘導可能な細胞 (ES-STstx4) を樹立した。RT-PCRと免疫染色を用いて導入したsyntaxin-4 の発現確認を行った後に (図 2-1 A)、LIF 添加培地にて syntaxin-4 の発現誘導なしの細胞 (OFF) とDOX添加により発現を誘導した細胞 (ON) の形態について比較した。その結果、発現誘導なしの細胞では、親株のES細胞と同様に細胞同士が密に接着したコロニーを形成するのに対し、細胞外syntaxin-4 を発現誘導した細胞は、細胞形態が扁平化するとともに仮足が形成され、さらに細胞間の接着は弱まった形態を示した (図 2-1 B)。



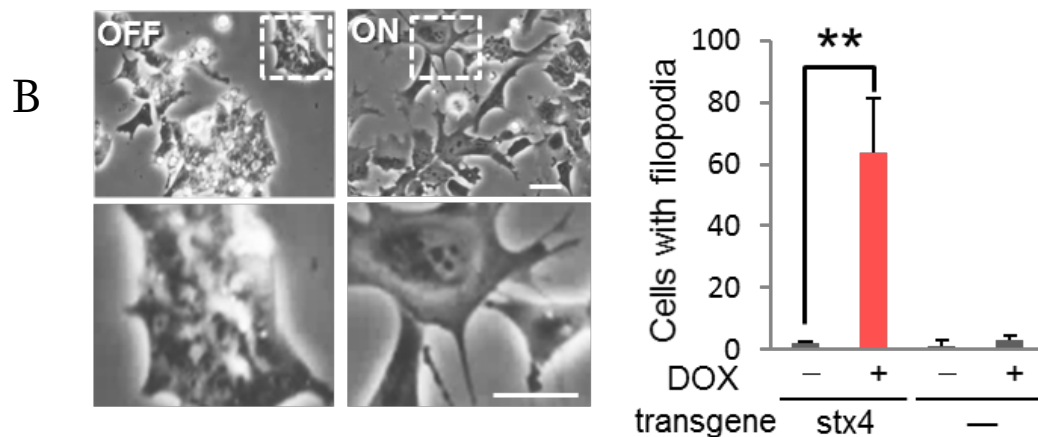


図 2-1: 細胞外 syntaxin-4 の発現確認とその形態への影響

A: 外来性 syntaxin-4 の発現確認

細胞外に提示させるためのシグナルペプチドおよび T7 タグを付加した syntaxin-4 のコンストラクトを ES 細胞に導入した syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞 (ES-STsx4) に DOX を添加して 2 日後、発現確認を行った。DOX 非添加 (遺伝子発現 OFF)、DOX 添加 (遺伝子発現 ON)、

左: RT-PCR インターナルコントロールとして *gapdh* を用いた。

右: 免疫染色 細胞内外の染色 (Total)、細胞外染色 (Cell surface)

T7 (stx4) (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μ m

B: 細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態変化

左: DOX を添加して 2 日後に細胞形態を観察した。下の写真は上の写真の拡大図

右: 細胞仮足形成細胞数の定量化 N=4、** $P<0.01$ スケールバー 20 μ m

E- to P-cadherinスイッチへの影響

未分化維持因子LIFの存在下で細胞外syntaxin-4 により誘導される形態変化は、上皮間葉転換 (EMT) で見られる変化に近いことから、次にEMTでよく観察されるcadherinスイッチについて検証した。一般的なEMTでよく見られるcadherinスイッチはE- to N-cadherinスイッチであるが⁶⁸、後述の網羅的遺伝子解析結果からsyntaxin-4 によるN-cadherinの発現量変化は認められなかった (参考資料 1-3)。そこで、近年癌細胞などのEMTで見られているE- to

P-cadherinスイッチについて検証するために³³、ES-STstx4 細胞を用いてE-cadherinとP-cadherinの発現量を調べたところ、E-cadherinはタンパク質レベルでの発現減少が確認された一方で、P-cadherinはタンパク質およびmRNAの両方が発現上昇することが分かった (図2-2)。

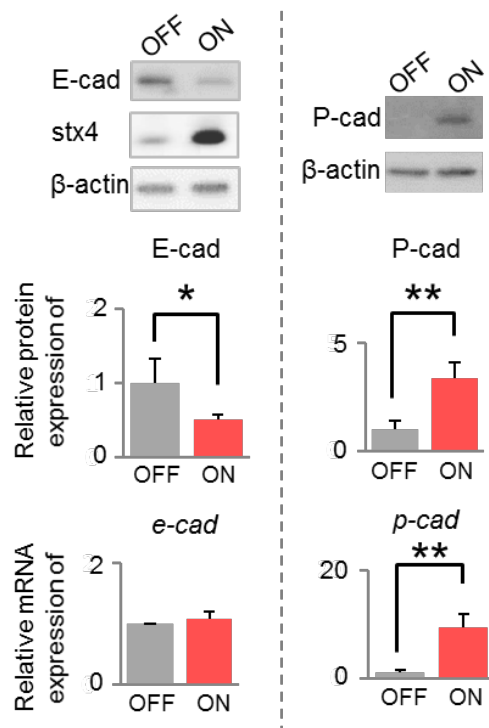


図 2-2: 細胞外 syntaxin-4 による E- to P-cadherin スイッチへの影響

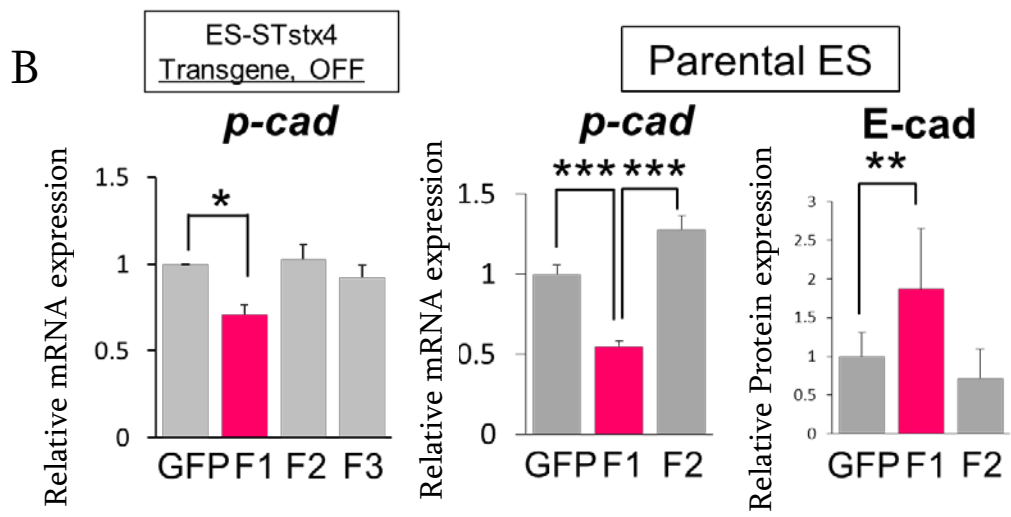
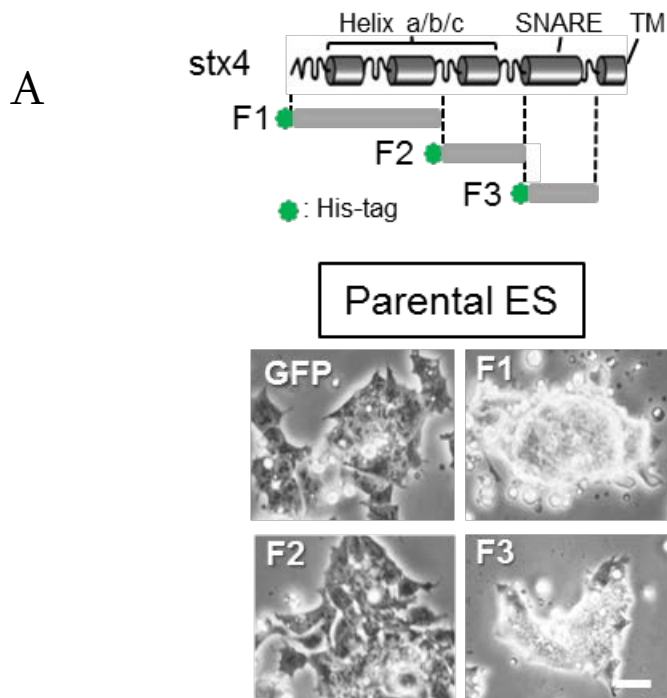
syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞に DOX を添加して 3 日後タンパク質と RNA を回収し E-cadherin と P-cadherin の発現量をそれぞれ解析した。

上:ウエスタンブロッティングのメンブレン 中・下:タンパク質および mRNA 発現量の定量化

左: E-cadherin の発現量 N=4、*P<0.05、 右:P-cadherin の発現量 N=3、** P<0.01

syntaxin-4 フラグメントによる細胞外syntaxin-4 の機能の検証

これまでに、syntaxin-4 は未分化なES細胞表面に不均一に発現すること、また、細胞外 syntaxin-4 発現誘導ES細胞であるES-STstx4 を用いた実験からsyntaxin-4 はES細胞の形態の扁平化とE- to P-cadherinスイッチを引き起こすことが判明した。しかし、今回示された syntaxin-4 の効果が外来遺伝子を導入したことによるアーティファクトである可能性を払拭できていない。先行研究において、syntaxin-4 のフラグメントが乳腺上皮細胞の細胞外 syntaxin-4 の活性を抑制することが示されていたことから⁶⁶、同フラグメントの組み換えタンパク質を作成し、それらのアンタゴニスト活性について検討した。syntaxin-4 のHelix aおよびbを含むフラグメント1 (F1)、Helix cを含むフラグメント2 (F2)、SNAREドメインを含むフラグメント3 (F3) の組み換えタンパク質をそれぞれ作成し、親株のES細胞に添加して細胞形態について観察した。その結果、F1 およびF3 添加した細胞はコントロールであるGFPと比較して細胞が丸くなり密なコロニーを形成する、細胞外syntaxin-4 を発現誘導した際と逆の作用が示された (図 2-3 A)。次に、ES-STstx4 のDOX非添加時の*p-cadherin*の発現量を解析したところ、F1 のみで発現抑制効果が見られた (図 2-3 B)。また、親株のES細胞を用いてE-cadherinおよび*p-cadherin*の発現量を解析したところ、これについてもsyntaxin-4 の発現誘導時とは逆に、F1 によってE-cadherinの発現量は上昇し、*p-cadherin*の発現量は減少した (図 2-3 B)。さらに、ES-STstx4 にDOXを添加して強制的にsyntaxin-4 を細胞表面に発現させた際の各フラグメントの効果を調べた。その結果、syntaxin-4 によって扁平化した細胞形態がF1 により抑制され、*p-cadherin*の発現量も減少することが示された (図 2-3 C)。以上の結果より、今回作製したF1 は細胞外syntaxin-4 の効果を阻害するアンタゴニストとして作用すること、ならびに細胞外syntaxin-4 の強制発現による効果は遺伝子導入によるアーティファクトではないことが判明した。



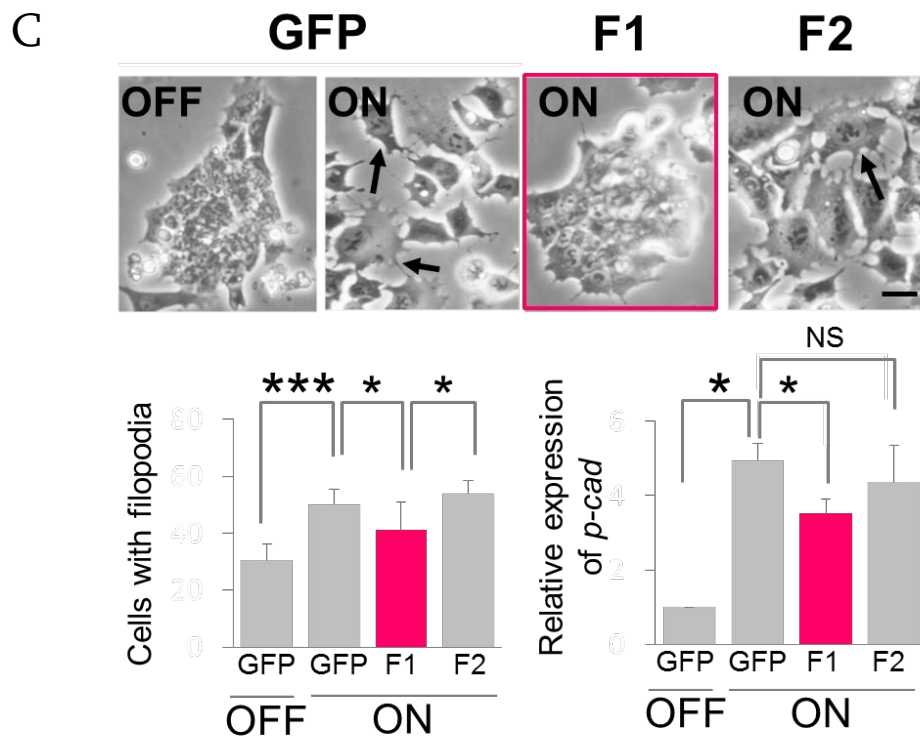


図 2-3: syntaxin-4 フラグメントによる形態と cadherin への効果

syntaxin-4 のフラグメントを各細胞に 50 ng/ml 添加し 2 日間培養した後の細胞形態を観察し、タンパク質および RNA を回収した。

A: 上: 各フラグメントの模式図

下: 親株の ES 細胞 (Parental ES) に各フラグメントを添加した際の形態 (矢印: 仮足形成細胞)

B: 左: ES-STx4 (DOX 非添加) の P-cadherin の mRNA 発現量

右: 親株の ES 細胞における P-cadherin (mRNA) と E-cadherin (Protein) の発現量

C: 上: ES-STx4 の各フラグメントによる形態への効果

下: 仮足形成細胞数の割合および P-cadherin (mRNA) の発現量

スケールバー 20 μ m N=3, * $P>0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

細胞外syntaxin-4 によるEMT関連因子及び中胚葉分化への影響

細胞外syntaxin-4 によりEMT様の形態変化とE- to P-cadherinスイッチが誘導されたことから、次に、典型的なEMTの関連マーカーおよび分化マーカーの発現について調べることにした。まず、EMT関連マーカーとしてE-cadherinを転写レベルで抑制する転写因子Snail、Slug、Foxc2 や、EMTで発現上昇する中間系フィラメントのVimentin、およびF-actinの脱重合を促進するCofilinのmRNA の発現量を調べた^{24,69-71}。結果として、細胞外syntaxin-4 を発現誘導しても、EMT関連転写因子やVimentinの発現はほとんど変化しない、もしくは減少することがわかった (図 2-4 A)。このことから、細胞外syntaxin-4 によって誘導された形態変化およびcadherinスイッチは、典型的なEMTとは異なる可能性が考えられる。つづいて、多能性幹細胞の形態変化と密接に関与することが知られている分化への影響を調べた。各方向への分化マーカーのmRNA量を検討した結果、細胞外syntaxin-4 はBrachyury、 α SMA、MHCなど中胚葉系列の分化を促進するとともに、未分化維持因子のNanogを抑制することが分かった。その他、外胚葉マーカーのTuj1 やbmp4 などは変化しなかった。このことから、細胞表面に提示されたsyntaxin-4 により中胚葉系列の細胞に分化が誘導されることが明らかとなった (図 2-4 B)。

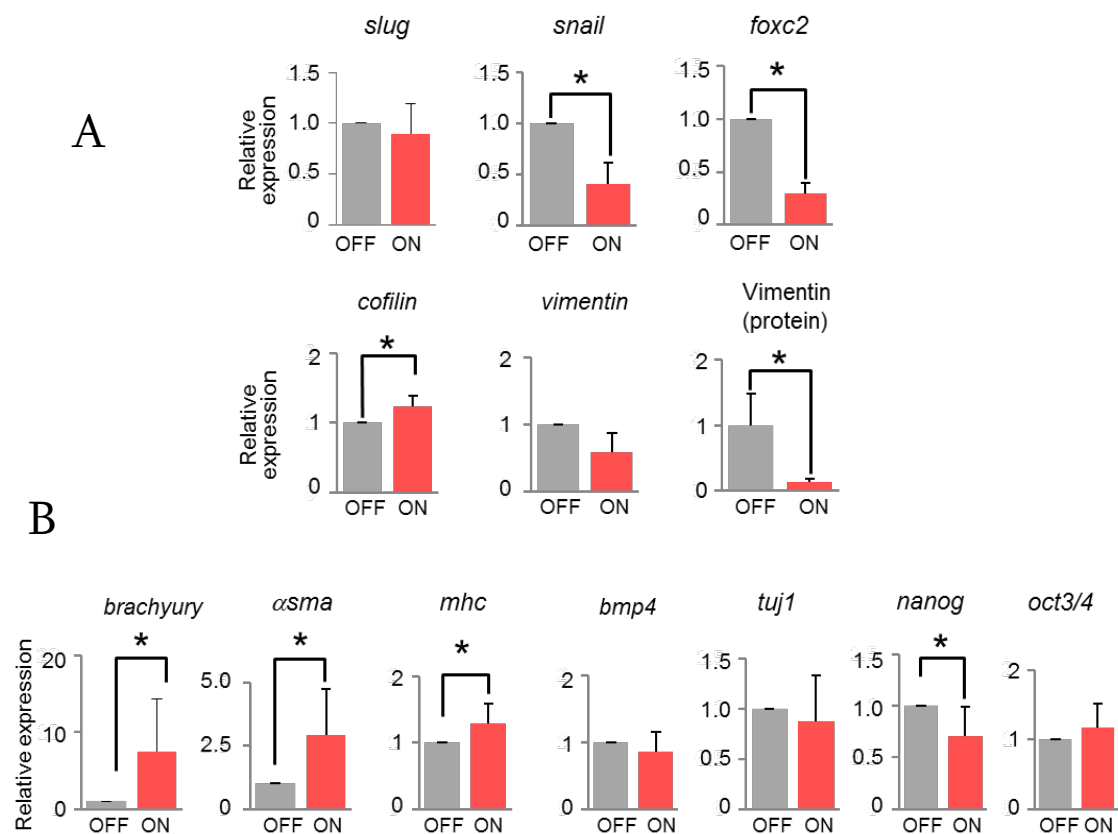


図 2-4: 細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子と分化マーカーへの影響

A: EMT 関連転写因子 Slug、Snail、Foxc2 および細胞骨格マーカーCofilin や Vimentin の mRNA レベルを qRT-PCR にて調べた。また、Vimentin についてはタンパク質発現量も定量化した。

B: 各分化マーカーおよび多能性関連マーカーについての mRNA 発現量を調べた。

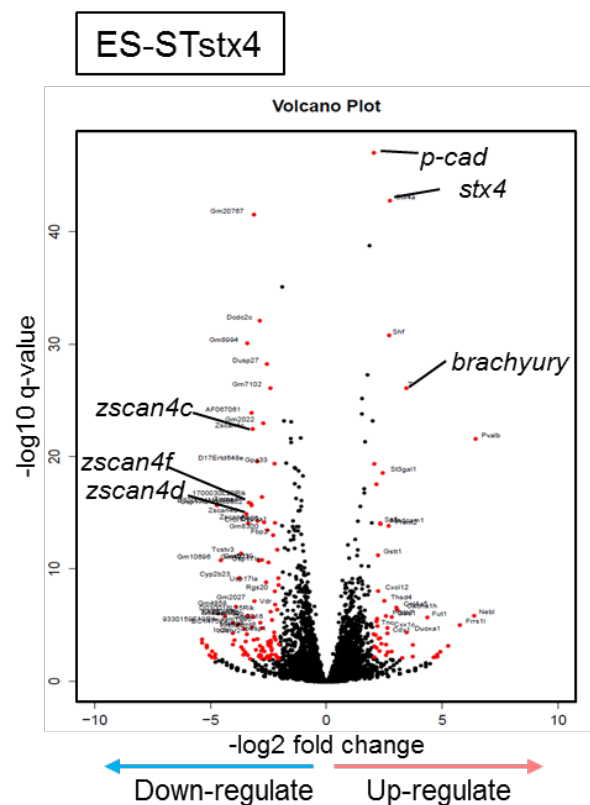
N = 4 *: P < 0.05

第3節 細胞外syntaxin-4の下流因子の同定

次世代シーケンサーによる細胞外syntaxin-4の下流因子の探索

細胞外syntaxin-4のさらなる下流因子の手がかりを探るため、ES-STstx4を用いて次世代シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った。その結果細胞外syntaxin-4を発現誘導することで*p-cadherin*や*brachyury*などこれまで明らかとなった因子の他に未分化関連因子*zscan4*の発現が抑制されることがわかった(図3-1 A)。遺伝子発現変動が4倍以上かつ有意水準のQ-valueが0.01以下の遺伝子について、解析ソフトPANTHERを用いて機能分類を行ったところ、細胞間結合因子や触媒活性をもつ因子、さらに転写因子などが変動することが分かった(図3-1 B)。

A



B

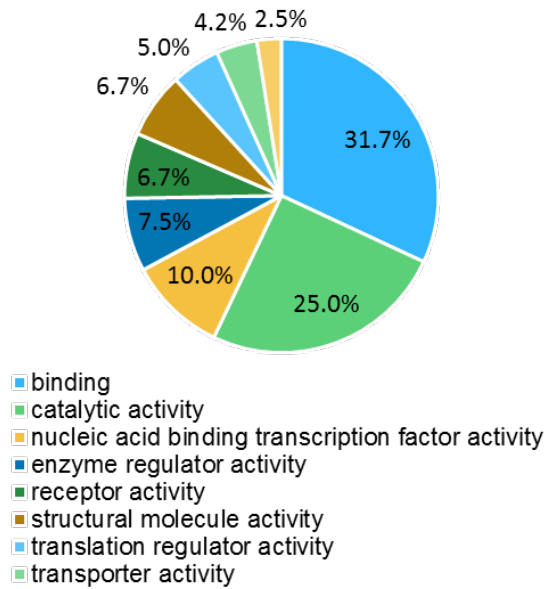


図 3-1: 細胞外 syntaxin-4 によって変動する遺伝子の網羅的解析

A: ES-STstx4 を用いて DOX 添加により発現を誘導した細胞で変化する遺伝子を Volcano Plot 形式で示した。横軸中央の 0 から右側が発現上昇した遺伝子、左側が減少した遺伝子を示す。縦軸は有意水準を示し、上部ほど高い有意水準で変動した遺伝子であることがわかる。また赤色で示したドットは発現変動が 4 倍以上かつ有意水準 q-value が 0.01 以下の遺伝子を示す。

B: 変動遺伝子の機能的分類

解析ソフト PANTHER-GO-Slim を用いて、A の赤色で示した発現変動遺伝子を機能分類した。(binding は主に Protein binding および Nucleotide binding を示す)

細胞外syntaxin-4 と未分化状態安定化因子Zscan4 との関係

次に、機能的分類のうち転写因子のグループに含まれた未分化状態の安定化に寄与するとされるZscan4 ファミリーに着目した。この遺伝子は、6 つのパラログ (a-f) をもつ遺伝子で、ES細胞では未分化状態を保ったまま自己増殖するために必要とされている^{1,37}。今回の次世代シーケンサーの結果、このZscan4 ファミリー全てがsyntaxin-4 発現誘導時に抑制されていることが分かった。さらに、qRT-PCRにてmRNA量を解析したところ、同様に*zscan4* の発現量の減少が見られた (図 3-2 A)。そこで、Zscan4 が細胞外syntaxin-4 の下流因子であることを確かめるため、親株ES細胞を用いて*zscan4* をノックダウンした際に、syntaxin-4 で発現上昇することが示された*p-cadherin* (図 2-2) の発現について調べることにした。その結果、siRNAで*zscan4* を抑制すると、*p-cadherin*が発現上昇することがわかった (図 3-2 B)。しかし、*zscan4* ノックダウンによる*p-cadherin*の発現上昇度合いは、細胞外syntaxin-4 を発現誘導したときと比較し小さかったことから、Zscan4 は細胞外syntaxin-4 の下流因子ではあるが、その効果は一部であることが示された。

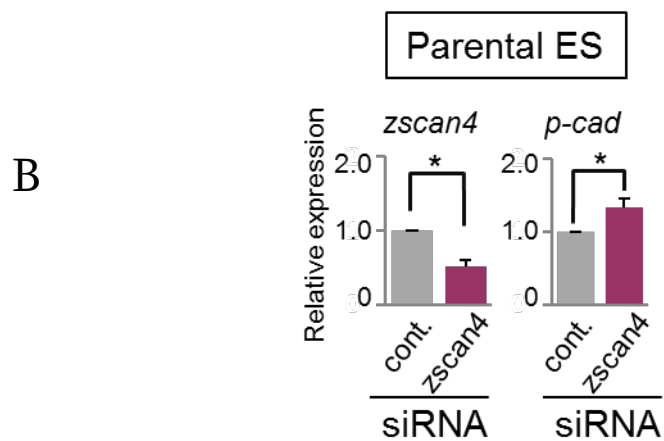
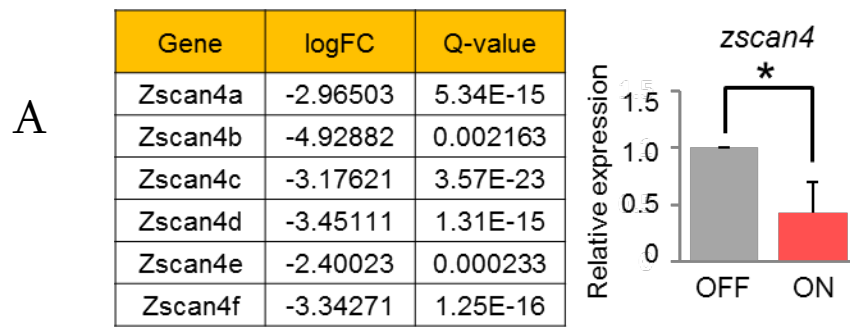


図 3-2: syntaxin-4 による Zscan4 への影響

ES-STstx4 を用いて DOX 添加により Zscan4 の発現変化を解析した。

A: 左: 次世代シーケンサーによる *zscan4* ファミリーの発現変動

右: qRT-PCR による *zscan4* の発現変動解析 N=3 * P<0.05

B: siRNA を用いて *zscan4* をノックダウンした際の *zscan4* および *p-cadherin* の

発現変化を qRT-PCR を用いて解析した。N=3 * P<0.05

細胞外syntaxin-4 によるPI3K/Aktシグナルへの影響

Zscan4 ファミリーはES細胞において、PI3K/Aktシグナルによって正に制御されていることがわかっている⁴¹。そこで、細胞外syntaxin-4 の下流シグナルとの関わりを調べるため、活性化型のAktの発現量を調べた (図 3-3 A)。その結果、細胞外syntaxin-4 により、リン酸化Aktの量は有意に減少することがわかった。さらに、親株のES細胞にPI3Kの阻害剤 (LY294002)を添加し、これまで判明したsyntaxin-4 の下流因子、*p-cadherin*および*brachyury*への影響を調べた。結果として、PI3K阻害剤の濃度依存的に*zscan4* の発現量は減少し、反対に*p-cadherin*は上昇することがわかった (図 3-3 B)。また、*brachyury*に関して効果は見られなかった。

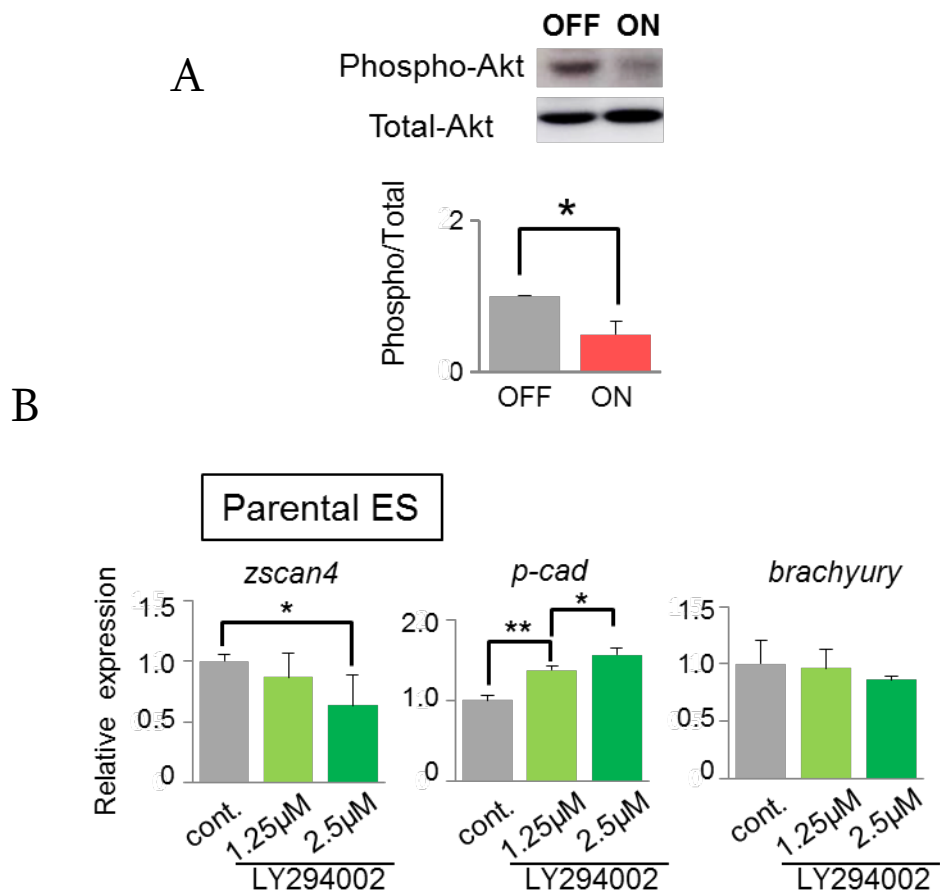


図 3-3: PI3K/Akt シグナルと細胞外 syntaxin-4 の関わり

A: 細胞外 syntaxin-4 を発現誘導したときのリン酸化型 Akt の発現量を調べた。

リン酸化型 Akt を Total の Akt で割り、定量化した。N=4 * P<0.05

B: PI3K の阻害剤 (LY294002) を親株の ES 細胞に添加し、その際の Zscan4、P-cadherin および Brachyury の mRNA 量を定量化した。N = 4 * P<0.05 ** P < 0.01

MEK1/2 およびGSK3 β 阻害剤による細胞外syntaxin-4 の

機能への影響

前述の結果 (図 1-2) より、syntaxin-4 の細胞外提示はES細胞の未分化性を均一に保つ MEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤 (2i) によって抑制されることがわかっている。そこで次に、細胞外syntaxin-4 の機能とこの 2 つの経路の関係について調べるため、2iを添加すると同時にsyntaxin-4 の発現を誘導し、形態や分化への影響を解析した。その結果、2i未添加のES細胞は細胞外syntaxin-4 によって形態の扁平化が促進されたが、2iを添加した細胞では、syntaxin-4 による細胞形態の変化は見られなくなった (図 3-4 A)。一方、これまでsyntaxin-4 によって誘導された主な分化マーカーである*p-cadherin*、*brachyury*および*zscan4* について 2iを添加した状態で調べたところ、各遺伝子はこれまで同様、細胞外syntaxin-4 によって発現量が上昇することが判明した (図 3-4 B)。このことから、細胞外syntaxin-4 による形態変化にはこの 2 つの経路の少なくともどちらかが関与する可能性が考えられる。また、2iは強力な未分化性維持因子であるにもかかわらず、強制的にsyntaxin-4 を細胞外提示しただけで、中胚葉系列への分化が誘導されることが分かった。このことは 2iの未分化性維持因子としての主要な役割は、syntaxin-4 の細胞外提示の抑制であるという可能性を示している。

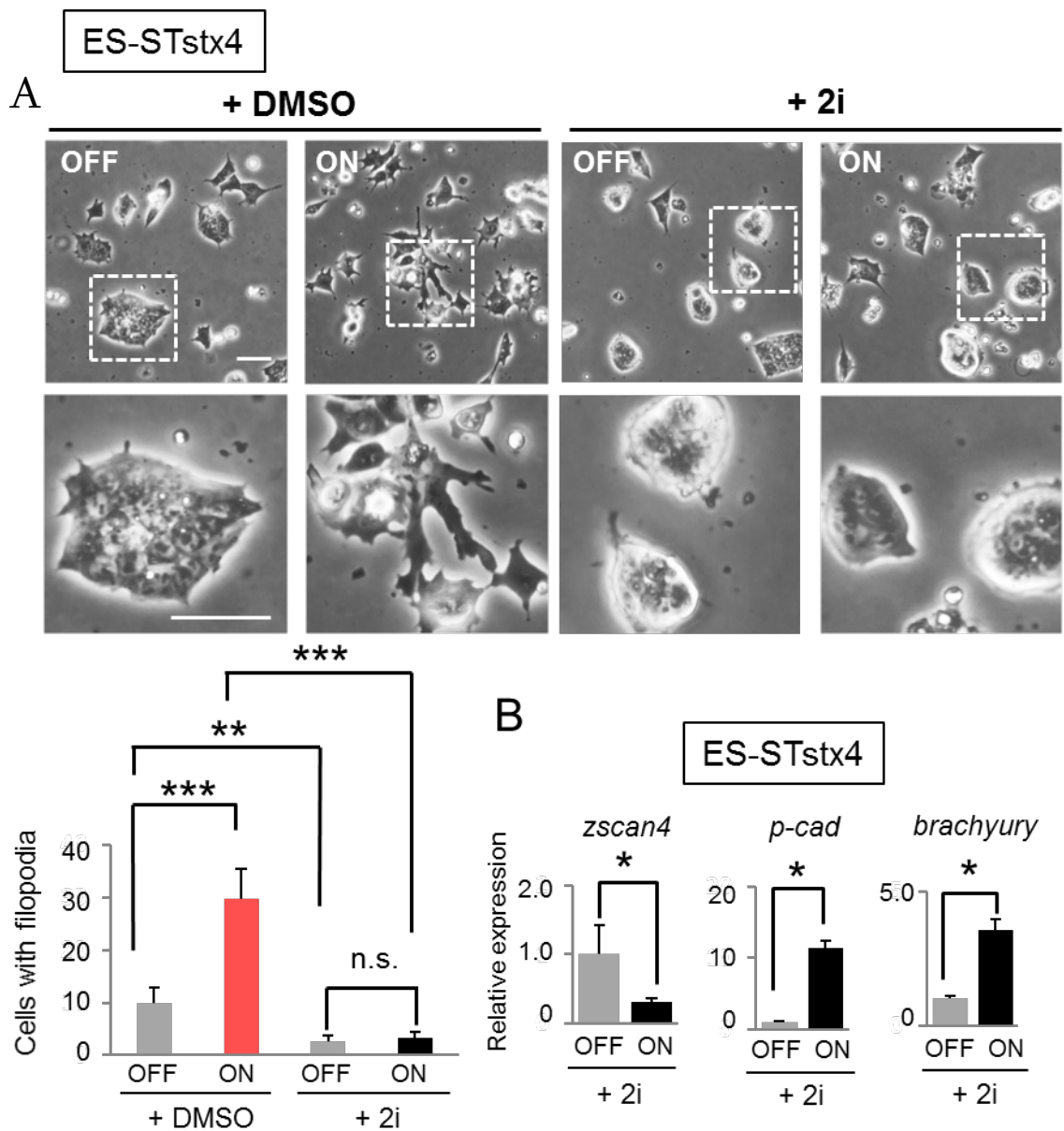


図 3-4: 細胞外 syntaxin-4 の形態・分化への影響と MEK1/2 および GSK3 β の関係

A: 上: コントロールとして DMSO を添加したものと、2i を添加したもので、細胞外 syntaxin-4 による形態への影響を比較した。下段の写真は上段の拡大図を示す

下: 仮足形成細胞数の定量化 N=4 ** P<0.01 *** P<0.001

B: 2i を添加した状態で細胞外 syntaxin-4 を発現誘導したときの分化マーカーの mRNA 量を定量化した。N=4 * P<0.05

第 4 節 F9 細胞における細胞外syntaxin-4 の機能 (cadherinスイッチと形態との関わり)

細胞外syntaxin-4 によるF9 細胞の形態への影響

これまでの結果として、①LIFによる未分化状態のES細胞の一部で内在性syntaxin-4 が細胞外提示していること、②細胞外syntaxin-4 を発現誘導したES細胞で、形態の扁平化、E-to P-cadherinスイッチおよび中胚葉系列への分化が促進されることが明らかとなった。次に、これらの表現型の関連性を調査するにあたり、適切な評価細胞の選定を行った。ES細胞はzscan4 を含む様々な未分化および分化関連因子が複雑に絡み合っているため⁷²、一つの要素が変化することで複数の細胞応答が導かれてしまう可能性が高い。そこで今回は、一つ一つの要素の繋がりを探る手段として、ES細胞より単純な系であるEC (胚性癌) 細胞を用いることとした。EC細胞はマウスES細胞の樹立が成功していなかった 1980 年代から多能性幹細胞のモデルとして世界中で広く使用されていた細胞で、ES細胞と同様にテラトーマ形成能を有することから潜在的な多能性を有しているにもかかわらず、非常に簡便な培養条件 (LIF や 2iを必要としない) で安定的に未分化性を維持できることが知られている⁷³⁻⁷⁵。その中でも今回用いたF9 細胞は、培養下では内胚葉系列への分化誘導が可能な未分化細胞であり、E-cadherinが発現した密なコロニーを形成する一方で、zscan4 の発現は認められない⁷³。よって、この細胞を用いることで、中胚葉分化およびzscan4 の関与を除外し、細胞外syntaxin-4 のcadherinスイッチと細胞形態の関連性に着目した解析を行えると考えた。

まず、ES細胞と同様にDOX添加の有無で細胞外syntaxin-4 の発現誘導が可能なF9-STtx4 細胞を樹立した (図 3-4 A)。この細胞の形態について観察すると、ES細胞と同様に、syntaxin-4 を発現した細胞では細胞間結合が抑制され、仮足形成が促進された (図 3-4 B)。

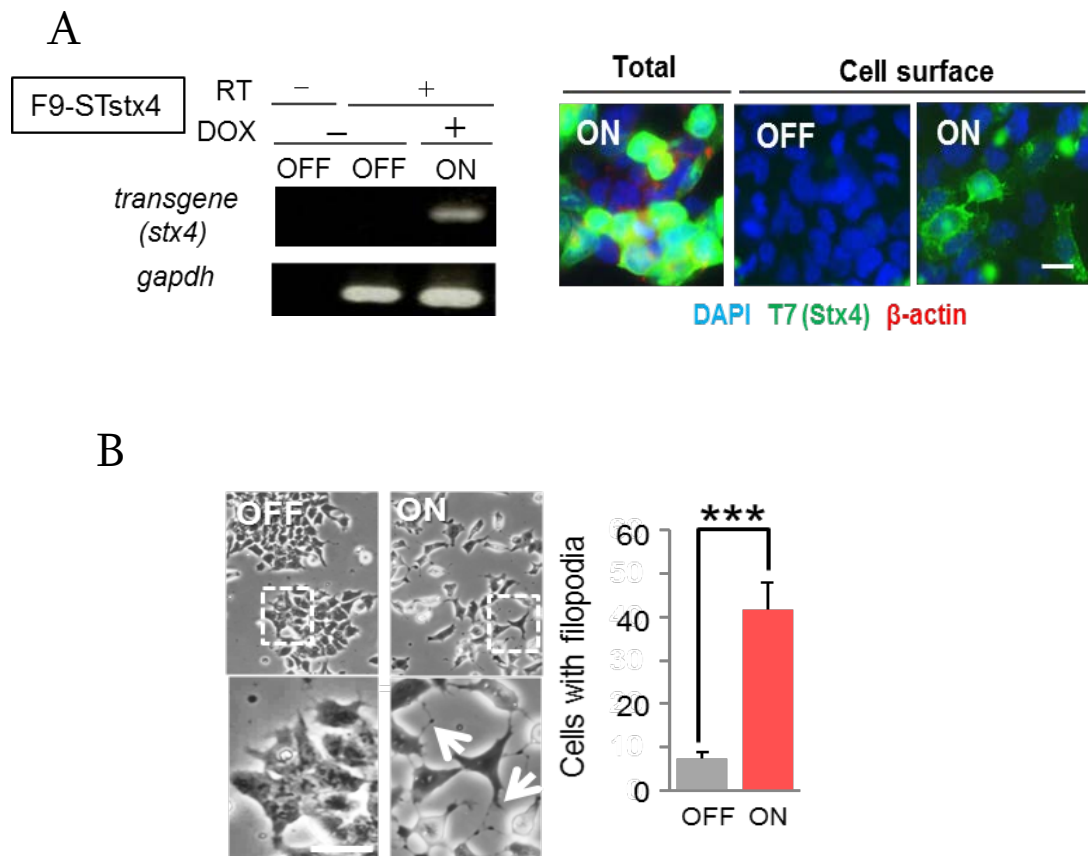


図 4-1: 細胞外 syntaxin-4 の発現確認とその形態への影響

A: 外来性 syntaxin-4 の発現確認

細胞外に提示させるためのシグナルペプチドおよび T7 タグを付加した syntaxin-4 のコンストラクトを F9 細胞に導入した syntaxin-4 発現誘導 F9 細胞 (F9-STstx4) に DOX を添加して 2 日後、RT-PCR (左) と免疫染色 (右) を用いて発現確認を行った。

T7 (stx4) (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μ m

B: 細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態変化

左: DOX を添加して 2 日後に細胞形態を観察した。下の写真は上の写真の拡大図
矢印は仮足形成細胞を示す。

右: 仮足形成細胞数の定量化 N=4、*** $P < 0.001$ スケールバー 20 μ m

E- to P-cadherinスイッチへの影響

F9 細胞においても細胞外syntaxin-4 の発現によりES細胞と同様の形態変化が見られたことから、次にcadherinスイッチについて検討した。その結果、F9 細胞でもE-cadherinのタンパク質レベルでの発現減少とP-cadherinの転写レベルでの発現上昇が確認された (図 4-2 A)。また、リン酸化Aktの発現量についても確認したところ、細胞外syntaxin-4 によって減少することがわかった (図 4-2 B)。以上のことから、F9 細胞においても細胞外syntaxin-4 は cadherinスイッチとAktシグナルに関してES細胞と同様の効果を示すことが判明した。

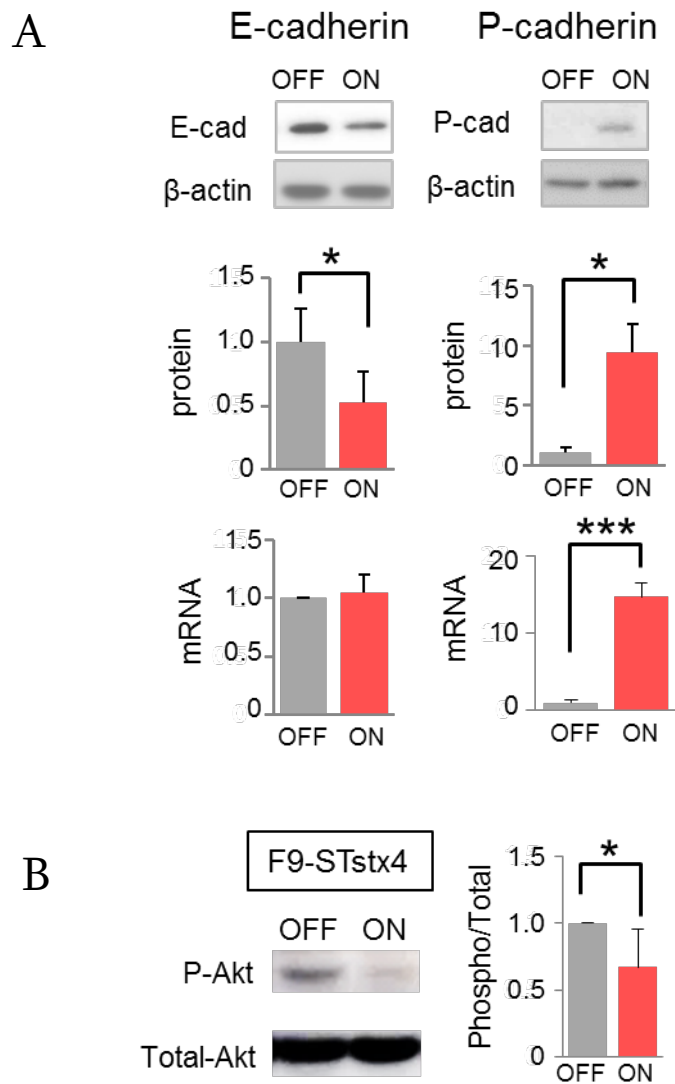


図 4-2: 細胞外 syntaxin-4 による E- to P-cadherin スイッチへの影響

A :syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞に DOX を添加して 2 日後タンパク質と RNA を回収し E-cadherin と P-cadherin の発現量をそれぞれ解析した。

上 :ウエスタンブロッティングのメンブレン 中下:タンパク質および mRNA 発現量の定量化

左 :E-cadherin の発現量 右 :P-cadherin の発現量 N=4、** P<0.01

B :細胞外 syntaxin-4 によるリン酸化型 Akt の発現量を調べた。

左:メンブレン 右 :リン酸化型 Akt (p-Akt) を Total の Akt で割り、定量化した。

N=4 * P<0.05

細胞外syntaxin-4 によるEMT関連因子および分化マーカーへの影響

形態およびcadherinスイッチの変化はES細胞とF9 細胞で酷似していたことから、続いて EMT関連因子と分化マーカーについての検討を行った。典型的EMTで発現誘導されるSnail、Slug、Zeb1、VimentinおよびCofilinの発現量は変化しなかった。また、中胚葉マーカーである α SMAおよびMHCも変化は見られなかった。培養下でF9 細胞はレチノイン酸 (RA) によって内胚葉系列の細胞のみに分化することが知られているが、syntaxin-4 は発現誘導しても内胚葉分化マーカーであるGata4 およびAfp⁷⁶ の発現変化は見られなかった (図 4-3)。

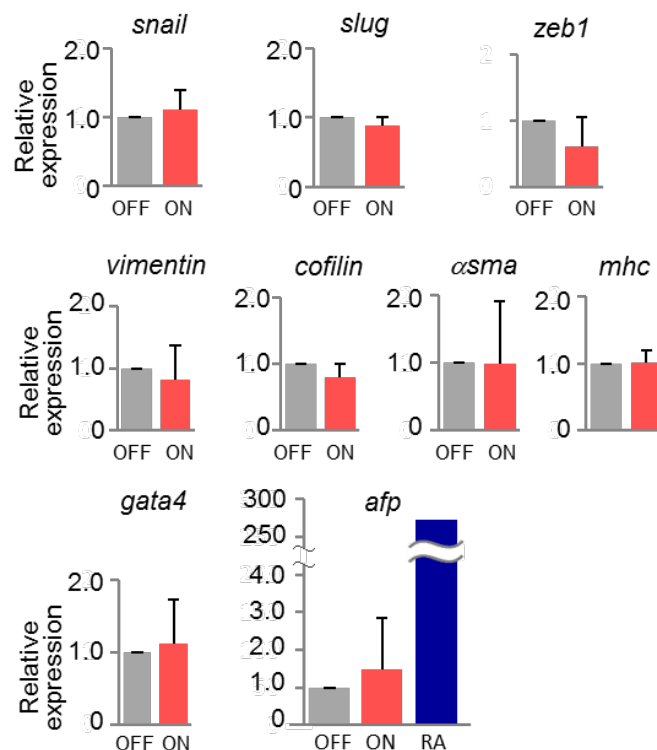


図 4-3: 細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子と分化マーカーへの影響

細胞外 syntaxin-4 を発現誘導して 2 日後 RNA を回収し、EMT 関連転写因子 Snail、Slug、Zeb1 および細胞骨格マーカーCofilin および Vimentin とともに、中胚葉マーカーの α SMA および MHC、内胚葉マーカーの Gata4 および Afp の mRNA レベルを qRT-PCR にて解析した。RA は内胚葉分化のポジティブコントロールとして用いた。N = 4 * P < 0.05

P-cadherin強制発現による形態への影響

F9 細胞においてもES細胞と同様のE- to P-cadherinスイッチおよび形態変化 (①仮足形成 ②細胞間接着の抑制) が見られたことから、これらの関係性を調べるため、まずF9 細胞にP-cadherinを強制発現させた際の形態への影響を観察した。細胞外syntaxin-4 と同様にDOX添加によりP-cadherinの発現誘導可能な細胞 (F9-Pcad) を作製した。DOXを添加して2日後の形態を観察したところ、P-cadherinを発現させた細胞では仮足形成が促進していたが、細胞間接着の抑制は見られなかった (図 4-4 A)。また、免疫染色にてF-actinとP-cadherinを共染色したところ、やはりP-cadherinの発現細胞で仮足形成の促進は見られたが、細胞間接着は保たれたままだった (図 4-4 B上)。さらにこの仮足形成への効果はP-cadherinの機能阻害抗体PCD1 を培地に添加することで阻害されることがわかった (図 4-4B下)。

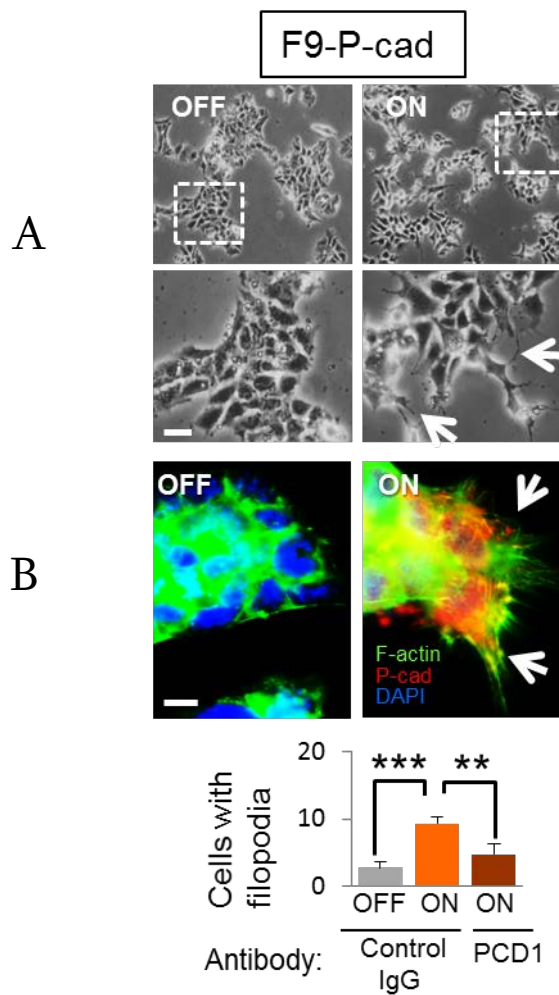


図 4-4: P-cadherin 強制発現による形態への影響

P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) に DOX を添加し二日後の細胞を観察した。矢印は仮足形成細胞を示す。

A: 明視野の写真 上図を拡大した写真を下に示す。

B: 上: 免疫染色写真 F-actin (緑)、P-cad (赤)、DAPI (青)

下: P-cadherin の ON/OFF に加え、DOX を添加すると同時に P-cadherin 阻害抗体である PCD1 を添加したものも併せて仮足形成細胞数を計測した。

N = 4 ** P < 0.01 *** P < 0.001 スケールバー: 20 μ m

E-cadherin の機能阻害による形態変化

P-cadherinを発現させたF9細胞では仮足形成の促進は見られるのに対し、細胞外syntaxin-4で観察された細胞間接着の抑制は見られなかった。そのため、次に細胞間接着の主要な構成因子であり、syntaxin-4により有意な発現減少が見られたE-cadherinの機能阻害を行った。親株のF9細胞にコントロール抗体とE-cadherinの機能阻害抗体であるECCD1をそれぞれ添加し、2日後形態を観察した。すると、ECCD1を添加した細胞では細胞間結合が弱まった形態を示したが、P-cadherinの強制発現細胞で見られたような仮足形成の促進は観察されなかった(図 4-5 A)。一方、細胞形態とE-cadherinの関係性を調べる別の実験として、人工的に基質への進展を制御した際のE-cadherinの発現量について検討した。具体的には、ペトリディッシュ上で細胞を培養し、基質への進展を阻害した場合と、Poly-L-lysineコートによって物理的に細胞を進展させた場合でのE-cadherinの発現量をタンパクおよびmRNAレベルで解析した。その結果、Poly-L-lysine上で進展した細胞でE-cadherinのタンパク質レベルでの発現減少が観察された(図 4-5 B)。

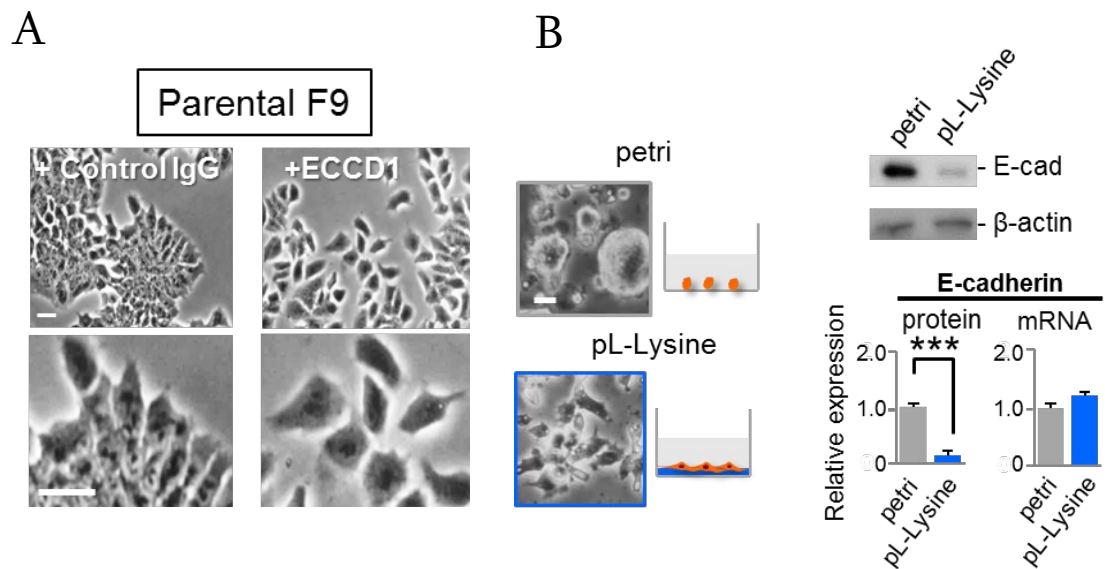


図 4-5: E-cadherin 阻害による形態への影響

A: 親株の F9 細胞 (Parental F9) に E-cadherin の機能阻害抗体である ECCD1 を添加し、細胞形態を観察した。

上図を拡大した写真を下に示す。

B: 左: ペトリディッシュ上で培養した細胞 (petri) と Poly-L-lysine コート上で培養した細胞 (pL-Lysine) の細胞形態

右: E-cadherin の発現量をタンパク質レベルおよび mRNA レベルで解析した。

N = 4 *** P<0.001 スケールバー: 20 μ m

E- to P-cadherinスイッチの模倣による形態変化

これまでの結果から、P-cadherinを発現させた細胞では仮足形成のみが促進され、E-cadherinを機能阻害した場合は、細胞間接着の抑制のみが見られた。そこで、この二つの条件を組み合わせることで、E- to P-cadherinスイッチを模倣した場合、細胞外syntaxin-4 による形態変化と同様の効果が見られるのかを検討した (図 4-6 A)。その結果、P-cadherinを発現誘導した場合と比較して、P-cadherinの発現と同時にECCD1 を添加した場合では、仮足形成とともに細胞間接着の抑制も見られ、細胞外syntaxin-4 による形態変化と似た様子が観察された (図 4-6 B)。

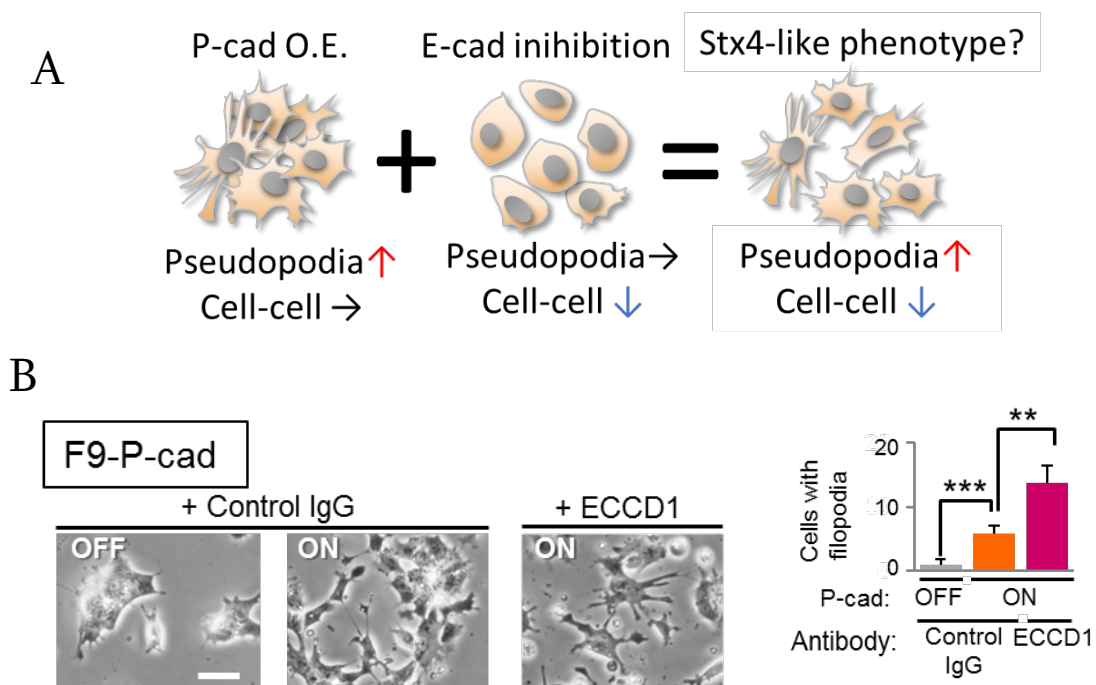


図 4-6: 人工的な E- to P-cadherin スwitchの模倣による形態への影響

P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) にコントロール抗体および ECCD1 抗体をそれぞれ添加し、その形態を観察した。

A: E- to P-cadherin スwitch再現の模式図

B: 左: 明視野の写真

右: 仮足形成細胞数の定量化

N = 4 ** P<0.01 *** P<0.001 スケールバー: 20 μm

長期的な細胞外 syntaxin-4 の発現による分化への影響

培養系では内胚葉のみに分化誘導が可能なF9 細胞において、短期的にsyntaxin-4 を発現させても、分化には影響がないことが示されたため、次に長期間発現させた場合の分化への影響について調べることにした。これまで使用していたDOXによる発現誘導細胞であるF9-STsxt4 は、DOX添加 4 日前後で細胞がアポトーシスを起こし長期間の維持ができなかった。そのため、幹細胞では過剰発現の程度が緩やかなCMV (Cytomegalovirus) プロモーターの下流にシグナルペプチドを付加したsyntaxin-4 導入したコンストラクトを用いて細胞外syntaxin-4 の安定発現細胞株sig-stx4 を作製した。コントロールのEmptyベクターを導入した細胞と比べ、syntaxin-4 の安定発現細胞では仮足形成の促進が観察された (図 4-7 A)。またその際のF9 細胞が内胚葉系列へ分化し際に発現上昇することが知られるGata4、Cofilin およびVimentinについて確認したところ、全ての発現量の上昇が確認できた (図 4-7 B)。したがって、F9 細胞において、細胞外syntaxin-4 の短期間の発現では形態のみに作用するが、長期間発現することで内胚葉へも分化誘導が行われる可能性が示された。

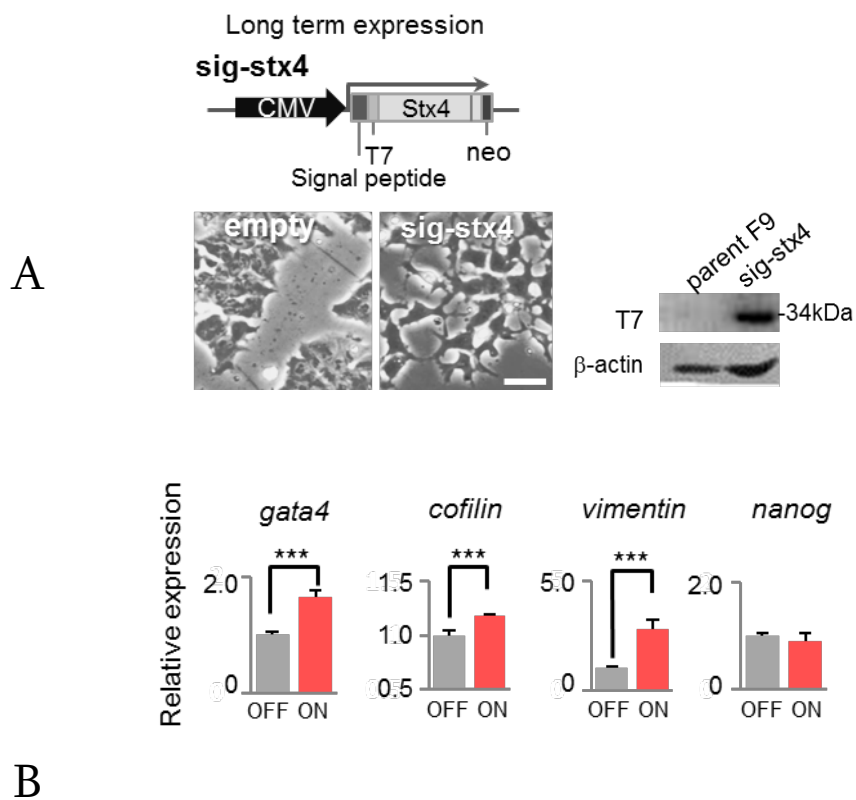


図 4-7: 細胞外 syntaxin-4 安定発現細胞の分化への影響

A: 細胞外 syntaxin-4 を長期間安定発現させるために CMV プロモーターの下流にシグナルペプチドと T7 タグを付加した syntaxin-4 を繋いだコンストラクトを F9 細胞に導入した (sig-stx4)。スケールバー: 20 μ m

上: コンストラクトの模式図

右: T7 抗体を用いて導入した syntaxin-4 の発現確認を行った。

下: コントロールの Empty ベクターを導入した細胞と sig-stx4 細胞の形態

B: コントロール細胞と sig-stx4 細胞の RNA を抽出し、F9 細胞が内胚葉へ分化した際のマー

第 5 節 P19CL6 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能 (P-cadherin と中胚葉分化の関係)

細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態への影響

前述のF9 細胞を用いた実験において、syntaxin-4 による形態変化にはE- to P-cadherin スイッチが深く関与する可能性が示されたが、このcadherinスイッチと中胚葉分化の関係については未だ明らかになっていない。そこで次に、F9 細胞と同様に*zscan4* の発現は見られない一方で、培養条件下でも中胚葉への分化誘導が可能なEC細胞の一種、P19CL6 細胞を用いることとした^{77,78}。細胞外syntaxin-4 発現誘導P19CL6 細胞 (P19-STstx4) を作製し発現確認を行ったのちに (図 5-1 A)、その形態について観察したところ、ES細胞と同様に細胞外syntaxin-4 により細胞形態の扁平化が確認された (図 5-1 B)。

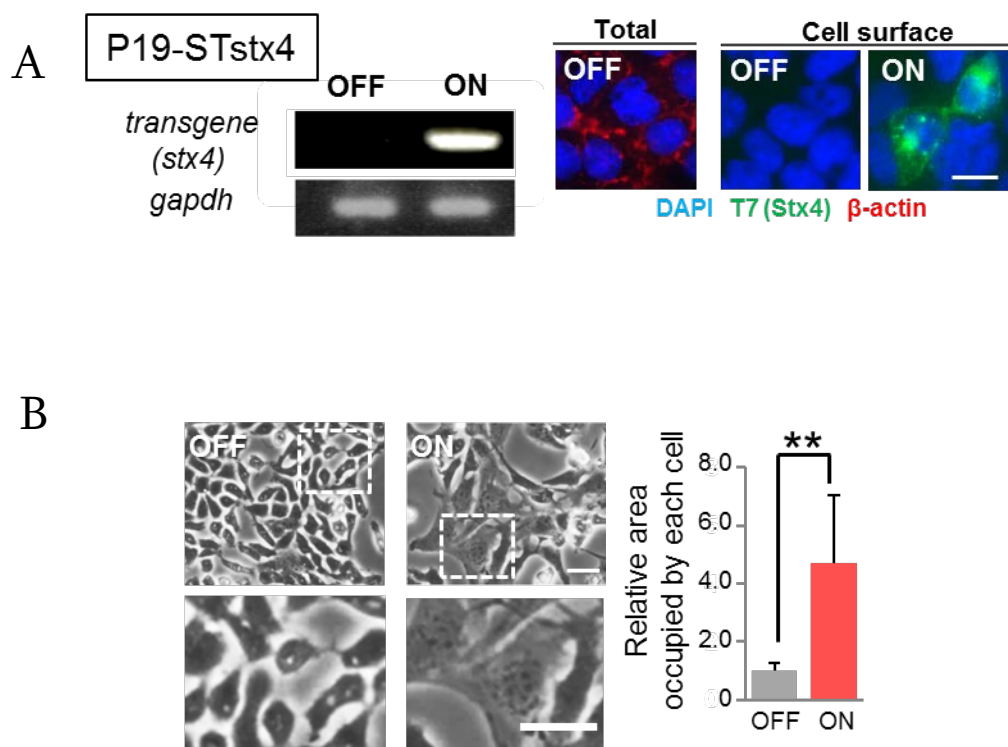


図 5-1: 細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態変化

A: 細胞外 syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) に DOX を添加して 3 日後 RT-PCR と免疫染色を行い syntaxin-4 の発現を確認した。インターナルコントロール: *gapdh*

T7 (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)

B: P19-STstx4 細胞に DOX を添加して 3 日後細胞形態を観察した。

左: 明視野の写真 下の図は上の拡大図を示す。スケールバー: 20 μ m

右: 各細胞の占める面積の平均値 N=10 **: P < 0.01

細胞外syntaxin-4 による中胚葉分化への影響

P19CL6 細胞でも細胞外syntaxin-4 により細胞形態の変化が見られたことから、ES細胞と同様にE-to P-cadherinスイッチおよび中胚葉分化マーカーの発現について変化が見られるのか確認した。P19CL6 細胞ではE-cadherinの発現は検出限界以下であったが、P-cadherinは細胞外syntaxin-4 により発現上昇することがわかった (図 5-2 A)。またその際、中胚葉マーカーである α SMAの発現をウエスタンブロッティングおよび免疫染色で確認したところ、細胞外syntaxin-4 によって発現量が上昇することが判明した (図 5-2 B)。さらに、免疫染色の結果から α SMAを強く発現した細胞より扁平化することが確認できた。また、他の分化マーカーについてmRNAレベルで検討したところ中胚葉マーカーである*brachyury*は発現上昇したが、その他の分化マーカーは変動しなかった (図 5-2 C)。このことから、P19CL6 細胞においても細胞外syntaxin-4 は形態変化および中胚葉分化を促進することが確かめられた。

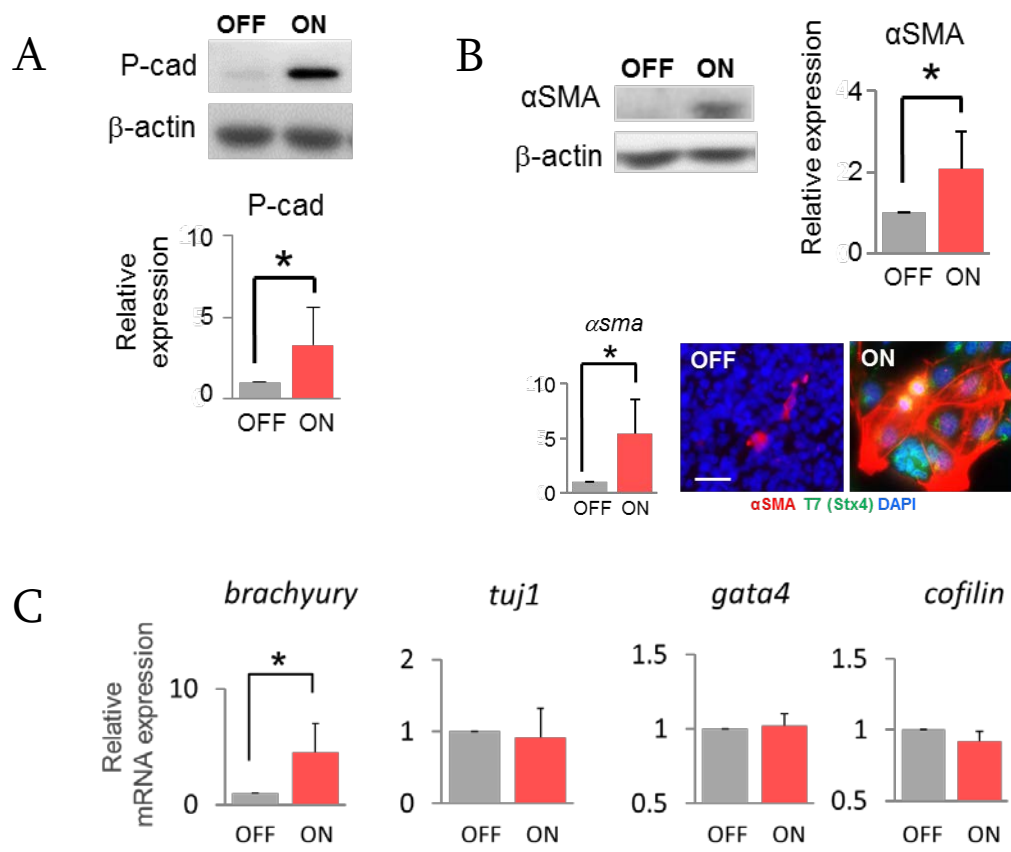


図 5-2: 細胞外 syntaxin-4 による P-cadherin および中胚葉分化への影響

細胞外 syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) に DOX を添加して 3 日後サンプルを回収した。

A: P-cadherin の発現をウエスタンブロッティングにて確認した。

N = 4 *: P < 0.05

B: 中胚葉マーカーの αSMA の発現をウエスタンブロッティング、qRT-PCR および免疫染色にて確認した。

左: αSMA のタンパク質レベルの発現量 中: αSMA の mRNA レベルでの発現量

N = 4 *P < 0.05

右: αSMA の免疫染色 αSMA (赤)、T7 (緑)、DAPI (青) スケールバー: 20 μm

C: 各分化マーカーの mRNA レベルの発現量 Brachyury (中胚葉)、Tuj1 (外胚葉)、Gata4 (内胚葉)、Cofilin (細胞骨格) N = 4 *: P < 0.05

P-cadherin強制発現による形態と中胚葉分化への影響

最後に、P-cadherinの発現と形態変化及び中胚葉分化への影響を調べるため、親株のP19CL6 細胞にP-cadherinを一過的に発現させた際の形態および中胚葉マーカーについて検討した。免疫染色によってP-cadherinを発現した細胞では細胞の扁平化及び仮足形成が確認された (図 5-3 A)。一方、mRNAを回収し*p-cadherin*および中胚葉マーカーである*asma*の発現を確認したところ、*p-cadherin*の発現上昇は確認されたが、*asma*の発現に変化は見られなかった (図 5-3 B)。このことから、P-cadherinは中胚葉分化には寄与しない可能性が示された。

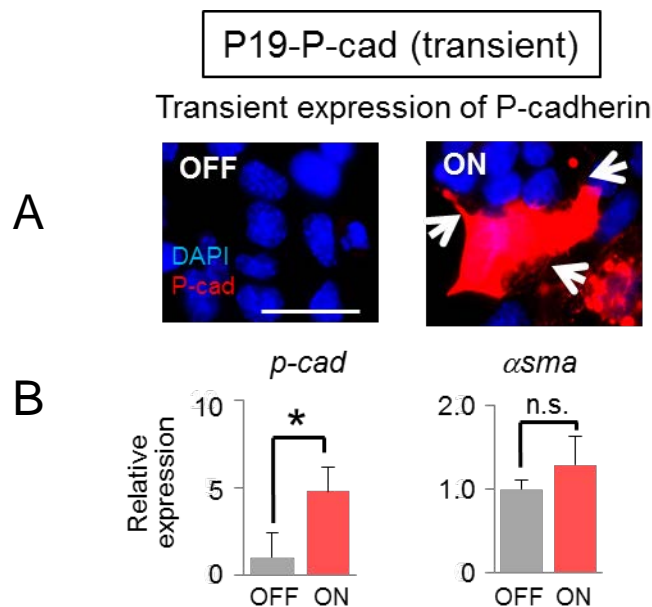


図 5-3: P-cadherin 強制発現による形態および中胚葉分化への影響

P-cadherin を一過的に発現した P19CL6 細胞 (P19-P-cad) を用い免疫染色にて形態変化を、qRT-PCR にて中胚葉分化への影響を調べた。

A: P-cadherin の免疫染色 P-cadherin (赤) DAPI (青) スケールバー: 20 μ m

B: *p-cadherin* および中胚葉マーカーの *asma* の発現を qRT-PCR にて確認した。

N=4 *P<0.05

第 5 章 考察

syntaxin-4 の細胞外局在について

本研究結果より、t-SNAREタンパク質であるsyntaxin-4 は、ES細胞集団の一部で局所的に細胞外に提示され、形態変化や中胚葉系列への分化を誘導することが明らかとなった。さらに、これらの変化は未分化維持因子LIFの添加培地において確認されたことから、syntaxin-4 の細胞外提示は未分化なES細胞における分化状態の不安定化に関与する可能性が考えられる (図 6)。しかし、未だsyntaxin-4 がどのようなメカニズムで細胞外に提示されるのかについては明らかになっていない。今回の結果からMEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤である 2iLによってsyntaxin-4 の細胞外での発現が抑制されたことから、syntaxin-4 の細胞外提示にはMEKおよびGSK3 β のシグナルが関与する可能性があると考えられる。一方、最近の研究で、syntaxin-4 と立体構造が酷似したepimorphin (syntaxin-2) は細胞膜でAnexin II やSynaptotagminと複合体を形成しており、アポトーシスシグナルに応答した膜反転に伴い細胞外に提示されることがわかっている⁵⁵。さらに、ES細胞では単一コロニーの一部で局所的にアポトーシスが誘導される細胞競合という現象が確認されており、2iLはそのアポトーシスを抑制することが明らかになっている^{79,80}。これらのことから、2iLによってES細胞集団での局所的なアポトーシスシグナルが抑制されたことで、間接的にsyntaxin-4 の細胞外提示が阻害された可能性も考えられる。また、これまで 2iLは、ES細胞からEpiblast様の細胞への分化に必要なFGFシグナルを阻害することで未分化状態の維持に寄与すると考えられてきたが⁸¹、今回 2iLを作用させた状態でも、細胞外syntaxin-4 を強制的に発現させることで分化が誘導されたことから、2iLによる未分化状態の維持にはsyntaxin-4 の細胞外提示阻害も重要である可能性が見いだされた。

syntaxin-4 フラグメントの効果

本研究で用いたsyntaxin-4 の組み換えタンパク質であるF1 (syntaxin-4 のHelix aおよびb) はES細胞で見られた細胞外syntaxin-4 による形態変化および分化を阻害するアンタゴニストとして作用することがわかった。この効果はsyntaxin-4 強制発現細胞だけでなく、親株のES細胞でも見られた。F1 がアンタゴニストとして機能する際の結合パートナーとしては二つに分子が想定される。ひとつは細胞外syntaxin-4 の受容体であり、もうひとつは細胞外提示されたsyntaxin-4 自身である。後者については、培養液中に添加したF1 が細胞外syntaxin-4 と直接結合し、その立体構造を変化させたことで、受容体への結合が抑制された可能性が考えられる。先行研究において、epimorphinおよびsyntaxin-4 は細胞内で多量体を形成することが示されている^{57,82}。これにはsyntaxinファミリー分子はコイルドコイル領域を持つため、疎水結合によりsyntaxin同士で多量体形成をしやすい構造であることが原因として考えられる⁴⁷。一方、形態変化に関しては、F1 だけでなくF3 も抑制効果を示していた。全く違う配列をもつF1 とF3 が同一受容体に結合することは考えにくい。フラグメントをPBSで透析する段階で、溶解液に用いた尿素の拡散と共に、F3 はその大部分が凝集し、析出してくることがわっている。このことから今回阻害効果を示したF1 および 3 のどちらか一方、もしくはその両者は、内在性の細胞外syntaxin-4 と直接結合しアンタゴニストとして作用した可能性が考えられる。フラグメントによる阻害効果のメカニズムを探るためにも、さらなる細胞外syntaxin-4 によるシグナル経路を調べるためにも受容体の同定は必須であるが、これまで細胞外syntaxin-4 の効果が報告されている表皮や乳腺の細胞においても受容体は同定されていない^{52,66}。syntaxin-4 と立体構造が酷似しているepimorphinの受容体はIntegrin α V β 1 であり⁵⁵、さらに、今回明らかとなったPI3Kの活性化にもIntegrin β 1 が関与することから⁸³、細胞外syntaxin-4 の受容体もIntegrinである可能性が考えられる。

syntaxin-4 による形態変化におけるGSK3 β シグナルの関与

強制的にsyntaxin-4 を細胞外に発現誘導した際、2iによって形態の扁平化が阻害された。syntaxin-4 はGSK3 β を抑制することで知られるPI3K/Aktシグナル³を阻害することが今回明らかになった。そのため、syntaxin-4 による形態変化にはGSK3 β シグナルが関与する可能性もあると考えられる。さらに、GSK3 β はE-cadherinの発現制御にも深く関与するとともに、ES細胞のコロニー形成の抑制にも働くことが示されている^{84,85}。以上のことからsyntaxin-4 による形態変化にはPI3K/Aktシグナル抑制によるGSK3 β の活性化が寄与している可能性は主として考えられるが、実際に関連性を調べるにはGSK3 β のリン酸化や局在変化とともにその下流シグナルの活性化を追跡する必要がある。

syntaxin-4 による形態変化とE- to P-cadherinスイッチの関係

今回、E- to P-cadherinスイッチは細胞外syntaxin4 による形態変化の鍵となる可能性が示された。ES細胞において、PI3K/AktシグナルはE-cadherinを正に制御することが報告されているため、syntaxin-4 によるPI3K/Aktシグナルの抑制がE-cadherinの発現減少の引き金となった可能性が考えられる^{86,87}。また、PI3K/AktはLIFシグナルによって活性化され未分化維持に働く主要な経路の一つであるが、本実験においては、LIF存在下でもsyntaxin-4 の細胞外提示により分化が促進された。このことから、syntaxin-4 によるPI3Kシグナルの抑制効果はLIFからのPI3K/Aktシグナルに対して優勢に働いたと考えられる^{28,88}。また、E-cadherinの発現減少は細胞質で働く β -cateninを増加させることが知られており、細胞膜近傍から離れた β -cateninは*p-cadherin*の転写活性を促進することが報告されていることからsyntaxin-4 による*p-cadherin*の発現上昇には β -cateninが関与する可能性があると考えられる⁸⁹。別の報告で*p-cadherin*の発現上昇には、p63 やC/EBP β といった他の転写因子が関与することも示

されているが^{90,91}、それらの遺伝子はsyntaxin-4 発現誘導時のトランスクリプトーム解析から発現変動しないことを確認している。また、クラシックcadherinに属するE-、P-およびN-cadherinは細胞間接着の主要な因子として知られているが、別の機能として、Small GTPaseを介した細胞運動に対しても効果を示すことが明らかにされている⁹²⁻⁹⁴。最近の研究で、E-cadherinではなくP-cadherin特異的にCdc42の活性化を介して、細胞遊走の促進を行う機構が新たに判明した⁹⁵。さらに、乳腺や膵臓などの悪性度の高い癌でP-cadherinは高発現しており、それらが癌細胞の浸潤・転移を促進することも示されている⁹⁶。また、P-cadherinの細胞遊走や形態への影響にはIntegrin $\alpha 6 \beta 4$ などが関わることも報告されているため³²、このような細胞膜に発現しているタンパク質の機能によりsyntaxin-4 による形態変化は制御されている可能性もある。

PI3K/Aktシグナルと細胞外syntaxin-4 による分化の関係

PI3K/AktシグナルはES細胞の分化を誘導するMAPK経路を阻害するとともに、多能性関連遺伝子である*nanog*をはじめとする未分化維持に関わる因子を発現上昇させることがわかっている^{88,97}。そのため、細胞外syntaxin-4 による分化刺激によりPI3K/Aktシグナルの不活性化が引き起こされたことは合点がいく。しかし、PI3K/Aktシグナルを阻害した実験において、syntaxin-4 によって発現が減少する*zscan4* では同様の変化があったのに対し、中胚葉分化マーカーである*brachyury*は変化が見られなかった。このことから、PI3K/Aktシグナルは未分化性を維持させるための主要な因子ではあるが、その不活性化のみで中胚葉への分化が促進されるわけではないことがわかった。syntaxin-4 によるES細胞の分化誘導にはPI3K/Aktシグナル以外にもさらに主として機能する経路が存在すると考えられる。

分化と形態変化の関係

本研究において、細胞分化と形態変化の関連は非常に重要なポイントのひとつである。細胞分化にともなって形態変化が観察されることは一般的によく知られているが、これに当てはまらない場合もいくつか存在する。たとえば、E-cadherinの組み換えタンパク質を工学的に作製し、ES細胞に作用させた細胞は形態の扁平化は見られるのに対し、分化は誘導されない⁹⁸。今回の研究においても、P19CL6 細胞にP-cadherinを強制発現し、細胞形態の扁平化を促しても、中胚葉分化には大きく作用しないことがわかった。またES細胞に2iを作用させた場合、細胞外syntaxin-4 による形態変化は阻害されたが、分化は誘導されていた。これらの結果から、今回のES細胞の分化は形態非依存的に起こるものではないと示唆される。一方、F9 細胞の実験において、細胞外syntaxin-4 の短期間の発現誘導では形態変化のみが見られたのに対し、長期的に発現させることで、内胚葉系列への分化マーカーが発現してくることが示された。このことから、細胞外syntaxin-4 は細胞形態に大きく作用し、それが引き金となって内胚葉（中胚葉以外）の分化にも寄与する可能性も考えられる。

生体内における細胞外syntaxin-4 の機能

これまでの結果からは生体内での初期発生に細胞外syntaxin-4 がどのように関与するのかについてはわかっていない。しかし、今回明らかとなった細胞外syntaxin-4 のEMT様の形態変化や、中胚葉マーカー*brachyury*の発現は、生体内で初めに起こる細胞遊走である原腸陥入や、神経堤細胞の遊走で見られる変化に近い^{99,100}。また、細胞内のsyntaxin-4 の全身でのKOマウスは原腸陥入が起きた直後の胎生 7 日目までで致死となることがわかっている¹⁰¹。プレリミナリーな結果ではあるが、ラット胎児の原腸陥入時期に相当する胎生 8.5 日目において、細胞外syntaxin-4 のホールマウント染色を行ったところ、原腸陥入領域に特異的な発現というものは確認できなかった。また、徳島大学との共同研究において、シグナルペプ

チドとT7 タグを付加したsyntaxin-4 を強制発現するマウスの作製を試みたが、計 62 個の遺伝子導入を行った受精卵から、胎生 13 日まで発生が進んだ個体は 1 つしか得られず、しかもその 1 個体についてT7 抗体を用いて解析したところ、導入したsyntaxin-4 はタンパク質レベルで発現していないことが判明した。このことから、細胞外syntaxin-4 を強制発現させることで、胎生 13 日までの発生に支障をきたす可能性も考えられるが、胚発生と細胞外syntaxin-4 の関係を結論づけるには、さらなる詳細な対象実験および再現性によって注意深く検証する必要がある。

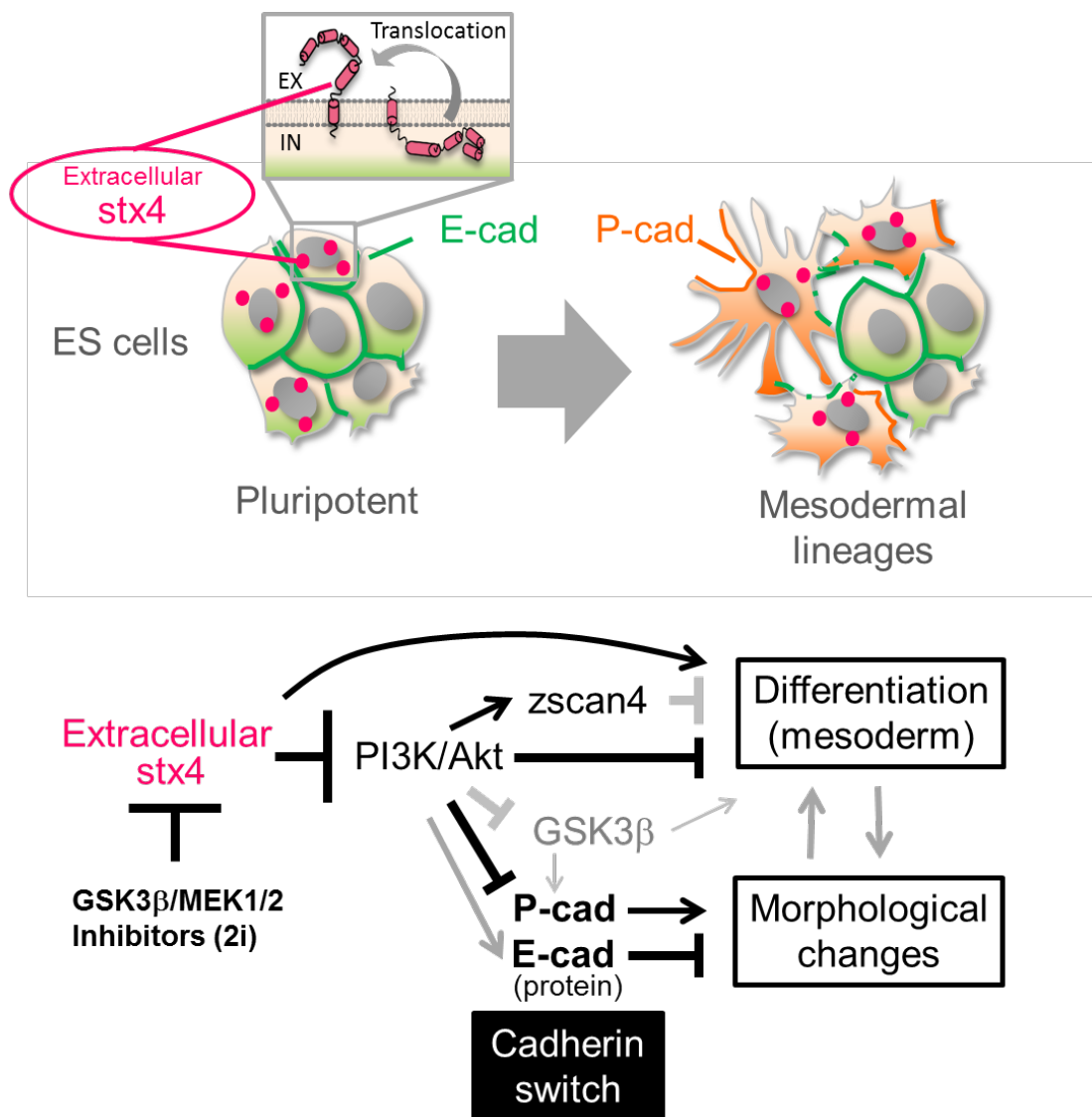


図 6: 細胞外 syntaxin-4 の発現と機能のモデル

上: ES 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能の模式図

未分化維持因子 LIF 存在下の ES 細胞表面で細胞外 syntaxin-4 はコロニー内で不均一に発現し中胚葉分化および cadherin スイッチを誘導する

下: 細胞外 syntaxin-4 のシグナル伝達経路

黒色: 本研究から明らかになった経路

灰色: 先行研究から考えられる経路

細胞外に提示された syntaxin-4 により、PI3K/Akt シグナルを介した分化や形態変化が誘導される。さらに、syntaxin-4 の細胞外提示は ES 細胞の均一化に寄与する 2i で抑制されることから、ES 細胞の分化の不均一性に syntaxin-4 が関与する可能性が考えられる

第 6 章 参考文献

- 1 Bianconi, E. *et al.* An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology* **40**, 463-471, doi:10.3109/03014460.2013.807878 (2013).
- 2 Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147, doi:10.1126/science.282.5391.1145 (1998).
- 3 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. ESTABLISHMENT IN CULTURE OF PLURIPOTENTIAL CELLS FROM MOUSE EMBRYOS. *Nature* **292**, 154-156, doi:10.1038/292154a0 (1981).
- 4 Marks, H. *et al.* The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* **149**, 590-604, doi:10.1016/j.cell.2012.03.026 (2012).
- 5 Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. & Terada, N. A heterogeneous expression pattern for nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 2534-2542, doi:10.1634/stemcells.2007-0126 (2007).
- 6 Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K. & Niwa, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**, 909-918, doi:10.1242/dev.017400 (2008).
- 7 Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-U1238, doi:10.1038/nature06403 (2007).
- 8 Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. & Smith, A. G. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *Plos Biology* **4**, 805-818, doi:10.1371/journal.pbio.0040121 (2006).
- 9 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, doi:10.1038/nature08113 (2009).
- 10 Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *Embo Journal* **32**, 2561-2574, doi:10.1038/emboj.2013.177 (2013).
- 11 Do, D. V. *et al.* A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development* **27**, 1378-1390, doi:10.1101/gad.221176.113 (2013).
- 12 Kobayashi, T. *et al.* The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes & Development* **23**, 1870-1875, doi:10.1101/gad.1823109 (2009).
- 13 Huang, F. *et al.* miR-1-Mediated Induction of Cardiogenesis in Mesenchymal Stem Cells via Downregulation of Hes-1 (vol 2013, 216286, 2013). *Biomed Research International*,

- doi:10.1155/2016/8510747 (2016).
- 14 Indulekha, C. L. *et al.* Hes-1 regulates the excitatory fate of neural progenitors through modulation of Tlx3 (HOX11L2) expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 611-627, doi:10.1007/s00018-011-0765-8 (2012).
 - 15 Kobayashi, T. & Kageyama, R. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of mouse embryonic stem (ES) cells by regulating Notch signaling activation. *Neuroscience Research* **68**, E134-E134, doi:10.1016/j.neures.2010.07.2164 (2010).
 - 16 Eastham, A. M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Research* **67**, 11254-11262, doi:10.1158/0008-5472.can-07-2253 (2007).
 - 17 Ji, L. J., LaPointe, V. L. S., Evans, N. D. & Stevens, M. M. CHANGES IN EMBRYONIC STEM CELL COLONY MORPHOLOGY AND EARLY DIFFERENTIATION MARKERS DRIVEN BY COLLOIDAL CRYSTAL TOPOGRAPHICAL CUES. *European Cells & Materials* **23**, 135-146 (2012).
 - 18 Li, X. A. *et al.* Calcineurin-NFAT Signaling Critically Regulates Early Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryos. *Cell Stem Cell* **8**, 46-58, doi:10.1016/j.stem.2010.11.027 (2011).
 - 19 Kim, Y. S., Yi, B. R., Kim, N. H. & Choi, K. C. Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Experimental and Molecular Medicine* **46**, doi:10.1038/emm.2014.44 (2014).
 - 20 Larue, L. *et al.* A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**, 3185-3194 (1996).
 - 21 Ho, J. C., Ueda, J. & Shimizu, T. The impact of mechanical stress on stem cell properties: The link between cell shape and pluripotency. *Histology and Histopathology* **31**, 41-50 (2016).
 - 22 Nobusue, H. *et al.* Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nature Communications* **5**, doi:10.1038/ncomms4368 (2014).
 - 23 Kanzaki, M. & Pessin, J. E. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42436-42444, doi:10.1074/jbc.M108297200 (2001).
 - 24 Ullmann, U. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular Human Reproduction* **13**, 21-32, doi:10.1093/molehr/gal091 (2007).
 - 25 Peinado, H. C., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 365-375, doi:10.1387/ijdb.041794hp (2004).

- 26 Medici, D., Hay, E. D. & Olsen, B. R. Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through beta-Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor-beta 3. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4875-4887, doi:10.1091/mbc.E08-05-0506 (2008).
- 27 Ten Berge, D. *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nature Cell Biology* **13**, 1070-U1088, doi:10.1038/ncb2314 (2011).
- 28 Bechard, M., Trost, R., Singh, A. M. & Dalton, S. Frat Is a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Regulated Determinant of Glycogen Synthase Kinase 3 beta Subcellular Localization in Pluripotent Cells. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 288-296, doi:10.1128/mcb.05372-11 (2012).
- 29 Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. R. Cadherin switching. *J. Cell Sci.* **121**, 727-735, doi:10.1242/jcs.000455 (2008).
- 30 Lade-Keller, J. *et al.* E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *British Journal of Dermatology* **169**, 618-628, doi:10.1111/bjd.12426 (2013).
- 31 Ribeiro, A. S. & Paredes, J. P-cadherin linking breast cancer stem cells and invasion: a promising marker to identify an "intermediate/metastable" EMT state. *Frontiers in Oncology* **4**, doi:10.3389/fonc.2014.00371 (2015).
- 32 Vieira, A. F. *et al.* P-cadherin signals through the laminin receptor alpha 6 beta 4 integrin to induce stem cell and invasive properties to basal-like breast cancer cells. *Oncotarget* **5**, 679-692 (2014).
- 33 Vieira, A. F. & Paredes, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Molecular Cancer* **14**, doi:10.1186/s12943-015-0448-4 (2015).
- 34 Paredes, J. *et al.* P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical Cancer Research* **11**, 5869-5877, doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-0059 (2005).
- 35 Ribeiro, A. S. *et al.* Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene* **29**, 392-402, doi:10.1038/onc.2009.338 (2010).
- 36 Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. & Ko, M. S. H. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental Cell* **6**, 117-131, doi:10.1016/s1534-5807(03)00373-3 (2004).
- 37 Falco, G. *et al.* Zscan4: A novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology* **307**, 539-550, doi:10.1016/j.ydbio.2007.05.003 (2007).
- 38 Zalzman, M. *et al.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells.

- Nature* **464**, 858-U866, doi:10.1038/nature08882 (2010).
- 39 Hirata, T. *et al.* Zscan4 transiently reactivates early embryonic genes during the generation of induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* **2**, doi:10.1038/srep00208 (2012).
- 40 Amano, T. *et al.* Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. *Nature Communications* **4**, doi:10.1038/ncomms2966 (2013).
- 41 Storm, M. P. *et al.* Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency. *Stem Cells* **27**, 764-775, doi:10.1002/stem.3 (2009).
- 42 Furusawa, C. & Kaneko, K. Theory of robustness of irreversible differentiation in a stem cell system: Chaos hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **209**, 395-416, doi:10.1006/jtbi.2001.2264 (2001).
- 43 Wray, J. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation (vol 13, pg 838, 2011). *Nature Cell Biology* **14**, 555-555, doi:10.1038/ncb0512-555a (2012).
- 44 Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-U515, doi:10.1038/nature06968 (2008).
- 45 Jewell, J. L., Oh, E. & Thurmond, D. C. Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R517-R531, doi:10.1152/ajpregu.00597.2009 (2010).
- 46 Latham, C. F. *et al.* Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: Implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic* **7**, 1408-1419, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00474.x (2006).
- 47 Bennett, M. K. *et al.* THE SYNTAXIN FAMILY OF VESICULAR TRANSPORT RECEPTORS. *Cell* **74**, 863-873, doi:10.1016/0092-8674(93)90466-4 (1993).
- 48 Chen, C. S. *et al.* Homology with Vesicle Fusion Mediator Syntaxin-1a Predicts Determinants of Epimorphin/Syntaxin-2 Function in Mammary Epithelial Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 6877-6884, doi:10.1074/jbc.M805908200 (2009).
- 49 Hagiwara, N., Kadono, N., Miyazaki, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties. *Cell and Tissue Research* **354**, 581-591, doi:10.1007/s00441-013-1680-0 (2013).
- 50 Hirai, Y. *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **140**, 159-169, doi:10.1083/jcb.140.1.159 (1998).
- 51 Hirai, Y. Epimorphin as a morphogen: Does a protein for intracellular vesicular targeting

- act as an extracellular signaling molecule? *Cell Biology International* **25**, 193-195, doi:10.1006/cbir.2000.0618 (2001).
- 52 Kadono, N., Hagiwara, N., Tagawa, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Is a Potent Cornification Regulator of Epidermal Keratinocytes. *Molecular Medicine* **21**, doi:10.2119/molmed.2014.00234 (2015).
 - 53 Radisky, D. C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y. & Bissell, M. J. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 228-U285, doi:10.1038/nrm2633 (2009).
 - 54 Hirai, Y. *et al.* Epimorphin mediates mammary luminal morphogenesis through control of C/EBP beta. *Journal of Cell Biology* **153**, 785-794, doi:10.1083/jcb.153.4.785 (2001).
 - 55 Hirai, Y. *et al.* Non-classical export of epimorphin and its adhesion to alpha v-integrin in regulation of epithelial morphogenesis. *J. Cell Sci.* **120**, 2032-2043, doi:10.1242/jcs.006247 (2007).
 - 56 Okugawa, Y. & Hirai, Y. Overexpression of extracellular epimorphin leads to impaired epidermal differentiation in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1884-1893, doi:10.1038/jid.2008.22 (2008).
 - 57 Kadono, N., Miyazaki, T., Okugawa, Y., Nakajima, K. & Hirai, Y. The impact of extracellular syntaxin4 on HaCaT keratinocyte behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**, 1200-1205, doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.107 (2012).
 - 58 Inoue, A., Obata, K. & Akagawa, K. CLONING AND SEQUENCE-ANALYSIS OF CDNA FOR A NEURONAL CELL-MEMBRANE ANTIGEN, HPC-1. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 10613-10619 (1992).
 - 59 Spring, J., Kato, M. & Bernfield, M. EPIMORPHIN IS RELATED TO A NEW CLASS OF NEURONAL AND YEAST VESICLE TARGETING PROTEINS. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 124-125 (1993).
 - 60 Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M. ISOLATION OF PLACENTAL CADHERIN CDNA - IDENTIFICATION OF A NOVEL GENE FAMILY OF CELL CELL-ADHESION MOLECULES. *Embo Journal* **6**, 3655-3661 (1987).
 - 61 Okashita, N. *et al.* PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development* **141**, 269-280, doi:10.1242/dev.099622 (2014).
 - 62 Wang, W. *et al.* Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9290-9295, doi:10.1073/pnas.0801017105 (2008).
 - 63 Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063-1069, doi:10.1242/dev.030957 (2009).

- 64 Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766-U106, doi:10.1038/nature07863 (2009).
- 65 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
- 66 Shirai K, H. N., Horigome T, Hirose Y, KAdono N, Hirai Y. Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Binds to Laminin and Syndecan-1 to Regulate Mammary Epithelial Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **9999**, 1-13, doi:10.1002/jcb.25661 (2016).
- 67 Park, J. H., Hong, S. W., Yun, S., Lee, D. K. & Shin, C. Effect of siRNA with an Asymmetric RNA/dTdT Overhang on RNA Interference Activity. *Nucleic Acid Therapeutics* **24**, 364-371, doi:10.1089/nat.2014.0494 (2014).
- 68 Maeda, M., Johnson, K. R. & Wheelock, M. J. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.* **118**, 873-887, doi:10.1242/jcs.01634 (2005).
- 69 Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 185-230, doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.185 (1999).
- 70 Hay, E. D. EXTRACELLULAR-MATRIX, CELL SKELETONS, AND EMBRYONIC-DEVELOPMENT. *American Journal of Medical Genetics* **34**, 14-29, doi:10.1002/ajmg.1320340107 (1989).
- 71 Mani, S. A. *et al.* Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10069-10074, doi:10.1073/pnas.0703900104 (2007).
- 72 Furusawa, C. & Kaneko, K. A Dynamical-Systems View of Stem Cell Biology. *Science* **338**, 215-217, doi:10.1126/science.1224311 (2012).
- 73 E Lehtonen, A. L. a. J. T. eratocarcinoma stem cells as a model for differentiation in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology* **33**, 105-115 (1989).
- 74 Linney, E., Neill, S. D. & Prestridge, D. S. RETROVIRAL VECTOR GENE-EXPRESSION IN F9 EMBRYONAL CARCINOMA-CELLS. *Journal of Virology* **61**, 3248-3253 (1987).
- 75 Jr., L. J. K. a. G. B. P. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research* **24** (1964).
- 76 Komiya, S. *et al.* Apical membrane and junctional complex formation during simple epithelial cell differentiation of F9 cells. *Genes to Cells* **10**, 1065-1080, doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00899.x (2005).

- 77 Mummery, C. L., Feijen, A., Moolenaar, W. H., Vandenbrink, C. E. & Delaat, S. W. ESTABLISHMENT OF A DIFFERENTIATED MESODERMAL LINE FROM P19 EC CELLS EXPRESSING FUNCTIONAL PDGF AND EGF RECEPTORS. *Experimental Cell Research* **165**, 229-242, doi:10.1016/0014-4827(86)90547-1 (1986).
- 78 Wen, J. Y. *et al.* Proteomic analysis of cardiomyocytes differentiation in mouse embryonic carcinoma P19CL6 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **102**, 149-160, doi:10.1002/jcb.21285 (2007).
- 79 Morgani, S. M. & Brickman, J. M. The molecular underpinnings of totipotency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **369**, doi:10.1098/rstb.2013.0549 (2014).
- 80 Sancho, M. *et al.* Competitive Interactions Eliminate Unfit Embryonic Stem Cells at the Onset of Differentiation. *Developmental Cell* **26**, 19-30, doi:10.1016/j.devcel.2013.06.012 (2013).
- 81 Kunath, T. *et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* **134**, 2895-2902, doi:10.1242/dev.02880 (2007).
- 82 Sieber, J. J., Willig, K. I., Heintzmann, R., Hell, S. W. & Lang, T. The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophysical Journal* **90**, 2843-2851, doi:10.1529/biophysj.105.079574 (2006).
- 83 Izmailyan, R. *et al.* Integrin beta 1 Mediates Vaccinia Virus Entry through Activation of PI3K/Akt Signaling. *Journal of Virology* **86**, 6677-6687, doi:10.1128/jvi.06860-11 (2012).
- 84 Cartwright, P. *et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-896, doi:10.1242/dev.01670 (2005).
- 85 Huang, T. S. *et al.* A Regulatory Network Involving beta-Catenin, E-Cadherin, PI3K/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Response to Wnt Signaling. *Stem Cells* **33**, 1419-1433, doi:10.1002/stem.1944 (2015).
- 86 Barber, A. G. *et al.* PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer. *Cancer Medicine* **4**, 1258-1271, doi:10.1002/cam4.463 (2015).
- 87 Paling, N. R. D., Wheadon, H., Bone, H. K. & Welham, M. J. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48063-48070, doi:10.1074/jbc.M406467200 (2004).
- 88 Watanabe, S. *et al.* Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**, 2697-2707, doi:10.1038/sj.onc.1209307 (2006).
- 89 Faraldo, M. M. *et al.* beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *Febs Letters* **581**, 831-836, doi:10.1016/j.febslet.2007.01.053 (2007).

- 90 Albergaria, A. *et al.* ICI 182,780 induces P-cadherin overexpression in breast cancer cells through chromatin remodelling at the promoter level: a role for C/EBP beta in CDH3 gene activation. *Human Molecular Genetics* **19**, 2554-2566, doi:10.1093/hmg/ddq134 (2010).
- 91 Shimomura, Y., Wajid, M., Shapiro, L. & Christiano, A. M. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* **135**, 743-753, doi:10.1242/dev.006718 (2008).
- 92 Priya, R. & Yap, A. S. Making a Choice: How Cadherin Switching Controls Cell Migration. *Developmental Cell* **34**, 383-384, doi:10.1016/j.devcel.2015.08.002 (2015).
- 93 Scarpa, E. *et al.* Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental Cell* **34**, 421-434, doi:10.1016/j.devcel.2015.06.012 (2015).
- 94 Takeichi, M. MORPHOGENETIC ROLES OF CLASSIC CADHERINS. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 619-627, doi:10.1016/0955-0674(95)80102-2 (1995).
- 95 Plutoni, C. *et al.* P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *Journal of Cell Biology* **212**, 199-217, doi:10.1083/jcb.201505105 (2016).
- 96 Mandeville, J. A. *et al.* P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *Bju International* **102**, 1707-1714, doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08115.x (2008).
- 97 Hishida, T. *et al.* Functional Compensation Between Myc and PI3K Signaling Supports Self- Renewal of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **33**, 713-725, doi:10.1002/stem.1893 (2015).
- 98 Haque, A., Yue, X. S., Motazedian, A., Tagawa, Y. & Akaike, T. Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-based substrata. *Biomaterials* **33**, 5094-5106, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.003 (2012).
- 99 Basilicata, M. F., Frank, M., Solter, D., Brabletz, T. & Stemmler, M. P. Inappropriate cadherin switching in the mouse epiblast compromises proper signaling between the epiblast and the extraembryonic ectoderm during gastrulation. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep26562 (2016).
- 100 Rogers, C. D., Saxena, A. & Bronner, M. E. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *Journal of Cell Biology* **203**, 835-847, doi:10.1083/jcb.201305050 (2013).
- 101 Yang, C. M. *et al.* Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 1311-1318, doi:10.1172/jci12274 (2001).

第 7 章 参考資料

第 4 章、第 3 節において記載した細胞外syntaxin-4 により発現量が有意に変動した遺伝子リスト(発現変動が 4 倍以上かつ有意水準q-valueが 0.01 以下のもの) を以下に記載する。

Up-regulated
(42 Genes)

P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
2.68E-25	2.71E-22	6.441901436	Pvalb	XLOC_007203
1.67E-08	0.00000148	6.378982017	Nebi	XLOC_011635
1.55E-07	0.00000991	5.757701258	Frrs1l	XLOC_014504
0.0000997	0.00234889	4.91686417	Wfdc1	XLOC_020241
0.00020709	0.00425449	4.784127639	Spink2	XLOC_015948
0.00036427	0.00651313	4.783773456	Rims1	XLOC_000682
0.00043172	0.00741562	4.637929669	4933422H20Rik	XLOC_003133
2.46E-08	0.00000207	4.356547654	Fut1	XLOC_018045
0.0000185	0.00057796	3.729680477	Edn3	XLOC_011535
0.00035223	0.00636155	3.727069834	Tsga10	XLOC_000722
8.85E-07	0.0000447	3.461856888	Duoxa1	XLOC_012226
4.09E-30	8.3E-27	3.454956441	T	XLOC_008204
0.00050787	0.0083368	3.271532311	5730405O15Rik	XLOC_022189
2.62E-09	2.73E-07	3.020340997	Col4a5	XLOC_022552
2.24E-08	0.00000192	2.819239058	Gad1	XLOC_010906
0.0000963	0.00227932	2.814505944	Gm3414	XLOC_015880
1.51E-47	1.75E-43	2.743397167	Stx4a	XLOC_018464
4.93E-35	1.64E-31	2.710025626	Shf	XLOC_012227
4.08E-17	1.5E-14	2.68816501	Frem2	XLOC_013206
0.00010698	0.00248674	2.651385185	Fer1l4	XLOC_012397
3.07E-07	0.0000178	2.633984759	Cxx1c	XLOC_022295
0.00000112	0.0000548	2.631951397	Cdx1	XLOC_009752
0.000017	0.00053887	2.577476868	Gm16023	XLOC_015025
0.00023762	0.00470864	2.576832407	Hmcn1	XLOC_001055
1.76E-08	0.00000155	2.571844654	Pcdh7	XLOC_015247
5.69E-10	6.99E-08	2.502587699	Thsd4	XLOC_021823
4.28E-22	2.93E-19	2.43136854	St3gal1	XLOC_007118
2.67E-17	1.02E-14	2.334411538	Madcam1	XLOC_001545
0.00000353	0.00014362	2.325212618	4930556M19Rik	XLOC_006631
2.17E-17	8.55E-15	2.325148438	Sp5	XLOC_010904
0.0000836	0.00201733	2.291380548	Fgf8	XLOC_010538
0.00000403	0.0001606	2.257592134	Col4a6	XLOC_023056
6.11E-11	9.36E-09	2.233708625	Cxcl12	XLOC_016819
0.0000002	0.0000123	2.200744747	Tnc	XLOC_014555
4.71E-21	2.96E-18	2.159019052	Chac1	XLOC_011169
0.00000169	0.000077	2.123771292	Plekhh3	XLOC_003878
0.0000283	0.00083244	2.077028614	Rcor1	XLOC_004479
5.71E-23	4.57E-20	2.070049006	Pck2	XLOC_005979
0.000026	0.00077332	2.066478069	Sat2	XLOC_002687
0.00040337	0.00701793	2.063773572	Arhgap5	XLOC_004192
4.08E-52	9.47E-48	2.049901227	Cdh3	XLOC_020182
0.00000134	0.0000641	2.041189264	Bpifb5	XLOC_011387

Down-
regulated
(96 Genes)

P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
0.0000162	0.00051574	-2.045192342	Ces2e	XLOC_020145
0.00046709	0.00783342	-2.060269848	Cox7b2	XLOC_015920
1.5E-11	2.74E-09	-2.06093586	Slc13a5	XLOC_003575
0.00063112	0.0099254	-2.069395521	Tmprss11d	XLOC_015960
3.16E-12	6.63E-10	-2.070620985	Spink3	XLOC_009712
6.99E-15	1.98E-12	-2.11919187	Gpnmb	XLOC_016567
4.15E-09	4.19E-07	-2.121817674	Tmem92	XLOC_003748
0.00042281	0.00729261	-2.132696181	Mst1	XLOC_021379
0.00000543	0.00020529	-2.189481543	Gm12794	XLOC_013928
0.00021672	0.0044077	-2.192903602	Grin2a	XLOC_007817
1.33E-09	0.00000015	-2.20954754	Vdr	XLOC_007348
1.96E-17	7.97E-15	-2.21703053	Cyp1a1	XLOC_021140
0.0000034	0.00013917	-2.232918512	Ccr4	XLOC_022068
5.27E-23	4.37E-20	-2.235700067	Gpa33	XLOC_000496
0.00000228	0.00010019	-2.245182553	Mapk10	XLOC_016033
8.65E-07	0.0000438	-2.254647813	Spesp1	XLOC_021833
3.16E-16	1.01E-13	-2.295469837	Fbp2	XLOC_005567
4.78E-08	0.00000355	-2.348389077	Gm2016	XLOC_004340
0.0000469	0.00125862	-2.36029789	Ctrl	XLOC_020697
0.0000693	0.00174267	-2.360350273	Hist3h2a	XLOC_002598
0.00019785	0.00412442	-2.366275168	Cml2	XLOC_017295
0.0000105	0.00036549	-2.391585229	Gm11544	XLOC_003749
0.0000063	0.00023315	-2.400233761	Zscan4e	XLOC_018693
6.78E-09	6.38E-07	-2.405978803	D030018L15Rik	XLOC_007336
0.000024	0.00072132	-2.412144203	Wdr20b	XLOC_004221
4.28E-30	8.3E-27	-2.415227709	Gm7102	XLOC_010593
0.00048738	0.00810348	-2.427818194	Krt5	XLOC_007415
0.00053241	0.00862386	-2.456332486	Nckap5	XLOC_000972
0.0005324	0.00862386	-2.456335165	Krt15	XLOC_003852
0.00053235	0.00862386	-2.456349832	AI847159	XLOC_012262
1.08E-13	2.68E-11	-2.495241359	Usp17le	XLOC_019383
0.00000854	0.00030421	-2.510470321	Ndnf	XLOC_016631
0.0000173	0.00054724	-2.511268196	Spink10	XLOC_009523
0.00029671	0.00558443	-2.532795091	Csf1r	XLOC_009515
0.0004492	0.00765491	-2.533664955	Dnajb13	XLOC_019296
1.07E-16	3.64E-14	-2.542263112	Gm8300	XLOC_004335
2.3E-32	5.93E-29	-2.566794203	Dusp27	XLOC_001128
8.02E-12	1.55E-09	-2.601310778	Usp17la	XLOC_018303
0.00050022	0.00825203	-2.605538775	Cyp11a1	XLOC_021144
0.0000909	0.00217432	-2.674528102	Tm4sf1	XLOC_013213
8.94E-27	1.09E-23	-2.720357356	Gm2022	XLOC_004341
0.0000391	0.00108262	-2.755101271	Gm5622	XLOC_005944
0.00000032	0.0000184	-2.770381603	Prmt8	XLOC_017485
7.05E-20	4E-17	-2.779433838	1700030L20Rik	XLOC_013600
6.19E-14	1.6E-11	-2.781311721	Gm5039	XLOC_004760
0.00061814	0.00976089	-2.795392758	Cd96	XLOC_008017
0.00008	0.00194813	-2.805727893	Tesc	XLOC_015487
0.0002569	0.0050042	-2.80923818	Xirp2	XLOC_010888

P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
8.75E-08	0.00000603	-2.847680419	Gm1995	XLOC_004339
0.0000229	0.00069536	-2.863481368	Ctxn3	XLOC_009496
2.12E-36	8.21E-33	-2.873074653	Dcdc2c	XLOC_004573
0.00021871	0.0044399	-2.88228013	BB287469	XLOC_004337
0.00032465	0.0060176	-2.912221171	AI662270	XLOC_002863
7.46E-14	1.88E-11	-2.920541889	Gm4971	XLOC_019176
1.24E-17	5.34E-15	-2.965025919	Zscan4a	XLOC_018690
0.00000442	0.00017278	-2.977802365	Gm13119	XLOC_014241
3.11E-23	2.78E-20	-2.984901882	D17Ert648e	XLOC_008774
6.06E-10	7.41E-08	-3.104147993	Gm2027	XLOC_004182
3.9E-46	3.02E-42	-3.122619226	Gm20767	XLOC_005282
0.00000552	0.00020807	-3.135977495	Gm13128	XLOC_014240
2.27E-08	0.00000193	-3.144462691	Fam159b	XLOC_005717
3.07E-26	3.57E-23	-3.176211149	Zscan4c	XLOC_017668
2.56E-07	0.0000152	-3.215734392	Tdp43	XLOC_012842
7.82E-28	1.3E-24	-3.228172572	AF067061	XLOC_005283
4.38E-19	2.19E-16	-3.230645622	Gm5662	XLOC_004758
3.09E-19	1.59E-16	-3.252258567	B020031M17Rik	XLOC_005755
0.00063188	0.00993056	-3.292229707	Trim43a	XLOC_021282
2.36E-19	1.25E-16	-3.342710106	Zscan4f	XLOC_017669
0.00023327	0.00464629	-3.396578899	Pramel6	XLOC_011007
1.85E-08	0.00000161	-3.401444404	Usp17lc	XLOC_018272
2.89E-34	8.39E-31	-3.412070659	Gm8994	XLOC_016945
0.00000136	0.0000649	-3.42872639	Cdhr2	XLOC_005090
2.94E-18	1.31E-15	-3.451114743	Zscan4d	XLOC_018692
0.00000802	0.00028902	-3.480606389	Cyp26b1	XLOC_017281
0.00011942	0.0027295	-3.493623914	Gm13109	XLOC_014944
0.0000611	0.00156284	-3.584555422	Usp17ld	XLOC_019337
0.0000312	0.0009057	-3.67007993	Ube2dn1	XLOC_022491
1.56E-14	4.2E-12	-3.680689609	Tcstv3	XLOC_005285
2.99E-12	6.32E-10	-3.75088191	Cyp2b23	XLOC_018879
1.44E-07	0.00000926	-3.782138646	BC147527	XLOC_005284
2.18E-09	2.32E-07	-3.908072628	Gm4858	XLOC_012832
9.1E-08	0.00000624	-4.030260041	9330159F19Rik	XLOC_001362
0.0000167	0.0005305	-4.030877571	AF067063	XLOC_005753
0.00000107	0.0000524	-4.034966212	Iqub	XLOC_017044
1.81E-08	0.00000159	-4.377729415	Edn2	XLOC_014042
4.43E-19	2.19E-16	-4.723561445	Usp17lb	XLOC_019384
0.00048896	0.00812396	-4.792300963	Dpep3	XLOC_020701
0.00018905	0.00397638	-4.796045477	BC080695	XLOC_014232
0.00018903	0.00397638	-4.796063808	A430089I19Rik	XLOC_016009
0.0000903	0.00216313	-4.928822088	Zscan4b	XLOC_018691
0.00041638	0.00720649	-4.937617042	Gm13078	XLOC_014234
0.00023877	0.00472746	-5.042242675	Trim75	XLOC_020503
0.0000347	0.00098271	-5.16086524	Tdp43	XLOC_012843
0.0000208	0.000639	-5.16254066	Gm6890	XLOC_022378
0.0000111	0.00037847	-5.361193588	AU015228	XLOC_011247
0.00000483	0.00018667	-5.36358869	Gm21319	XLOC_004755

第 8 章 付録

本研究の内容はCell & tissue researchおよびScientific Reportsに投稿し、査読を経て掲載された。次ページから「Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells」 および「Extracellularly syntaxin-4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties」を付録として添付する。

Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties

Natsumi Hagiwara · Nanako Kadono ·
Takafumi Miyazaki · Kenji Maekubo · Yohei Hirai

Received: 5 March 2013 / Accepted: 13 June 2013 / Published online: 25 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The proteins in the syntaxin family are known to mediate fusion of cytoplasmic vesicles to the target membrane, yet subpopulations of certain syntaxins, including syntaxin4, translocate across the cell membrane in response to external stimuli. Here, we show that extracellularly presented syntaxin4 impacts cell behavior and differentiation in teratocarcinoma F9 cells. While undifferentiated F9 cells extruded a small subpopulation of extracellular syntaxin4 at the lateral cell membrane, the induction of differentiation with all-trans retinoic acid (RA) abolished this localized expression pattern. We found that the cells that were stimulated in a non-directional fashion by extracellular syntaxin4 displayed a flattened shape and retained a substrate-bound morphology even under a long-term, serum-starved cultivation. Such a cellular response was also elicited by a circular peptide composed of the potential functional core of syntaxin4 (AIEPQK; amino acid residues 103–108) (ST4n1). While the proliferation and metabolism were not affected in these cells, cell–cell interaction became weakened and the expression of vinculin, a regulator of both intercellular and cell-substrate adhesion molecules, was altered. We also found that the expressions of several differentiation markers were up-regulated in cells stimulated with extracellular syntaxin4 and that syntaxin3, another family member, was most prominent. Intriguingly, forced expression of syntaxin3 induced the spread morphology in F9 cells, indicating that

syntaxin3 partly mediates the function of extracellular syntaxin4. These results demonstrate the involvement of a non-directional stimulation of extracellular syntaxin4 in the functional and morphological differentiation of F9 cells.

Keywords Extracellular localization · Syntaxin4 · F9 · Differentiation · Epimorphin

Introduction

Syntaxins are t-SNARE components expressed at the cytoplasmic surface of certain membrane domains that participate in the formation of the SNARE complex, which mediates the docking and/or fusion of intracellular vesicles to target membranes (Chen and Scheller 2001; Sharma et al. 2006). However, various stimuli have been shown to trigger the translocation of certain syntaxins across the plasma membrane via a non-classical route, leading to execution of their latent extracellular functions (Flaumenhaft et al. 2007; Hirai et al. 2007; Radisky et al. 2009). For example, when epimorphin/syntaxin2 is exposed extracellularly in response to calcium influx, it is cleaved at the proximal membrane domain and then released to target cells so as to impact the morphology and maturation of these cells, including mammary epithelial cells (Chen et al. 2009; Hirai et al. 1998; Radisky et al. 2003), liver parenchymal cells (Kinoshita et al. 2011; Miura et al. 2007), pancreatic epithelial cells (Lehnert et al. 2001) and skin epidermal keratinocytes (Hirai et al. 1992; Okugawa et al. 2010; Okugawa and Hirai 2008). We recently identified a cell surface subpopulation of syntaxin4 in skin keratinocytes that severely affected the cornification process and elicited survival activity from cells exposed to oxidative stress (Kadono et al. 2012). In terms of anaplastic cell

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00441-013-1680-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Hagiwara · N. Kadono · T. Miyazaki · K. Maekubo ·
Y. Hirai (✉)

Department of Bioscience, Graduate School of Science and
Technology, Kwansei Gakuin University, 2-1 Gakuen,
Sanda 669-1337, Japan
e-mail: y-hirai@kwansei.ac.jp

types, an ectopic expression of extracellular epimorphin accelerated the mobility of preimplanted blastocysts and cartilage progenitor cells, resulting in an over-outgrowth of implanted ova (Qin et al. 2005) and abnormal cartilage organogenesis (Oka et al. 2006), respectively. The epimorphin-triggered changes in these cellular behaviors may be dependent upon the alteration of their biological properties and the cellular changes elicited by other extracellular syntaxins in anaplastic or embryonal stem cells are as yet unknown.

Mouse embryonal teratocarcinoma (EC) cell lines have been widely used as simple models for the functional analyses of factors possessing differentiation induction activity, since their stemness is stably maintained in culture, whereas the simple addition of the differentiation stimuli activates their latent differentiation programs. For example, F9 cells, which are recognized as nullipotent EC cells, have been reported to elicit the differentiation response in all three germ layers under certain specific culture conditions (Koopman and Cotton 1986, 1987), with the karyotype remaining fairly stable (Alonso et al. 1991). For this cell type, the methods for the unidirectional differentiation into the endodermal lineages have been well established, using either all-trans retinoic acid (RA) or cAMP (Wang et al. 1985). In spite of the fact that the molecular mechanisms for the subsequent commitment to the parietal or visceral endoderm are as yet unknown (Hogan et al. 1981), the simple addition of RA rapidly and effectively leads to their differentiation into primitive endoderm derivatives. Most of the cells gradually change their morphology and exhibit an augmented expression of characteristic markers, including α -fetoprotein, laminin, ZO-1 α and villin (Komiya et al. 2005; Wang et al. 1985). Thus, a comparison with the RA-triggered phenotypic changes might provide important insights into the activity of proteins that are involved in the activation of the differentiation program.

In the present study, we noticed that the distribution pattern of an extracellularly presented syntaxin4 subpopulation on F9 cells was altered by the stimulation with RA, which was investigated for the effect exerted by extracellular syntaxin4 on this cell type. We found that non-directional stimulation with extracellular syntaxin4 induces a dramatic morphological change in the cells and in several endodermal markers, both of which effects are reminiscent of the cells treated with RA.

Materials and methods

Cells

The mouse teratocarcinoma cell line F9 (ATCC CRL-1720) and its derivatives were maintained in DMEM/HamF12 medium (Wako) supplemented with 10 % FCS along with penicillin and streptomycin. To test the effect of syntaxin4, cells were treated with a recombinant form of syntaxin4 (Kadono et al.

2012) or stably introduced with an expression plasmid for extracellular syntaxin4. As the control, recombinant green fluorescent protein (r-GFP) or an empty plasmid was used. To induce efficient differentiation, cells were treated with 1 μ M all-trans retinoic acid (RA) (Sigma) for 5 days. To investigate the cell–cell adhesion property, 3×10^5 cells suspended in 400 μ l medium were seeded onto 24-well dishes pre-coated with 1 % agarose gel and rotated at 100 rpm for 24 h. For the cell mobility assay, part of the sub-confluent cell monolayer was scraped and the cellular migratory distance from the scraped edge at the initial time-point was measured after 24 h. Phase contrast images of the cells were obtained under phase contrast microscopy (Olympus SP350). To completely block extracellular export of leaderless proteins, caspase inhibitor IV (Calbiochem) was added to the culture at a final concentration of 100 μ M. To block the effect of Sirt gene products, the cells were treated with 25 μ g/ml nicotinamine (Sigma) for 4 days.

Expression constructs and transfection

To generate F9 cells stably expressing cell surface syntaxin4 or cytoplasmic Sirt2, cells were transfected with the expression construct for syntaxin4 containing an N-terminal fusion of an exogenous signal peptide comprising mouse IL-2 and T7-peptide (Kadono et al. 2012), or the construct for T7-tagged Sirt2 by electroporation (125 mA; Nepagene, Japan), followed by selection with 500 μ g/ml G418. Among several clones, at least three independent clones were chosen that expressed a high level of the transgenes. These clones displayed essentially the same phenotypes. For the Sirt2 construct, cDNA encoding mouse *sirt 2* ORF (NCBI ID: 64383) linked to the T7 peptide was amplified by RT-PCR using the following primers: 5'-tgaattcatggctagcatgactgg-tggacagcaaatgggtatggacttcctgaggaatttattc-3' and 5'-ggg-ggaattctactgctgttctcttcttctt-3'. The amplified cDNA was then purified, treated with *EcoR* I and subcloned into the mammalian expression vector pQCXIN (Invitrogen). The mammalian expression construct of syntaxin3 tagged with T7 peptide was prepared as previously described (Shono et al. 2013).

Antibodies and immunological procedures

The primary antibodies used in this study included those against tetra-His (Qiagen), syntaxin3 (Millipore), β -actin (Sigma), α -catenin (Santa Cruz), β -catenin (Santa Cruz), T7-tag (Novagen), α -fetoprotein (Zymed) and vinculin (Sigma-Aldrich). Anti-E-cadherin monoclonal antibodies (ECCD-1 for the blocking of function and ECCD-2 for immunodetection) were generous gifts from Dr. Takeichi. Affinity-purified polyclonal antibodies against epimorphin and syntaxin4 were prepared as described in previous studies (Hirai et al. 1998; Kadono et al. 2012). Western blotting was carried out with HRP-labeled 2nd antibodies (GE healthcare)

and ECL reagent (GE Healthcare). To detect the cell surface expression of syntaxin4, non-permeabilized F9 cells were stained simultaneously for syntaxin4 and a negative control β -actin, as described previously (Kadono et al. 2012). In brief, living cells on chamber slides were incubated with a mixture of affinity-purified rabbit anti-syntaxin4 antibodies and a mouse anti- β -actin monoclonal antibody. After being washed twice with Tris-buffered saline (TBS) followed by fixation with -20°C methanol for 10 min, the cells were incubated with a mixture of Alexa488-labeled anti-rabbit IgG (Invitrogen) and Cy3-labeled anti-mouse IgG antibodies (GE healthcare). For the performance of conventional immunocytochemistry, cells were permeabilized with -20°C methanol for 15 min and stained for marker proteins with primary and FITC- or Cy3-labeled 2nd antibodies, as described above. In some samples, the cell permeabilization was carried out with 0.1 % triton X-100 and F-actin was directly stained with Alexa488-phalloidin (Invitrogen). The nuclei of the cells were counter-stained with DAPI (Sigma). These cells were analyzed using the A1 confocal microscope system (Nikon) or the AXIOSHOP fluorescence microscope (Zeiss) with the VB-7010 CCD camera (Keyence, Japan). For immunoprecipitation, cells were lysed in TBS containing 1 % Triton X-100, 1 % NP-40 and a protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Japan) in TBS. After removal of insoluble materials, the lysate was incubated with ECCD2 and the immunocomplex was retrieved with proteinG-Sepharose (GE Healthcare).

RT-PCR

The total RNA was extracted from F9 cells pretreated with or without differentiation stimuli using an RNeasy™ mini kit (Qiagen, Germany) and was reverse-transcribed with an RNA-PCR kit (Takara). For RT-PCR analyses, cDNA fragments of mouse *gata-4*, *α -fetoprotein*, *ZO-1a*+, *villin*, *syntaxin3* and *gapdh* were amplified by PCR for 25 cycles, using the following primer pairs. *gata-4*: 5'-ggactaggtctttagccgg-3' and 5'-cggagtgggcacgtagac-3'; *α -fetoprotein*: 5'-gacctcagcagagctgacga-3' and 5'-cctctggagatgtttaaagcc-3'; *ZO-1a*+: 5'-cctggacttaagccagc-3' and 5'-cctcctgtacaccttgc-3'; *villin*: 5'-catcactcctcggtctctcg-3' and 5'-gtcatgccaag-gccctagt-3'; *syntaxin3*: 5'-gctgaagagcatggagaag-3' and 5'-atggcgacgtccataaa-3' and *gapdh*: 5'-ggatttgccgtattgg-3' and 5'-tcattgtagaccttggc-3'. To selectively amplify cDNAs from exogenously introduced T7-tagged *sirt2*, 5'-atggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgatc-3' was used as the forward primer.

Assays for cell metabolism and survival

The number of viable cells were evaluated using Alamar blue reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol.

In brief, Alamar blue reagent was added to the culture (1/20) and an absorbance ratio of 570 and 600 nm in the medium was measured to determine the number of surviving cells. To ascertain the sustained cellular metabolic property after treatment with syntaxin4, the evaluated number of the cells cultured for 2 days was divided by the amount of DNA that was extracted from the same cells and determined using a DNA Quantity kit (Primary Cell). To determine the number of cells that were attached to the dish after a longer cultivation in the serum-starved condition, cells were incubated in DH medium supplemented with 2 % FCS for 4 days without any medium change, then washed once with PBS and incubated in phenol red-free medium mixed with 1/20 Alamar blue for 4 h. In some wells, RA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), recombinant protein (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and/or a circulated peptide from syntaxin4's functional core ST4n1 (Kadono et al. 2012) or the non-functional control peptide (Okugawa et al. 2010), were added to the medium.

Statistical analyses

Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Data were analyzed using the *t* test and *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Expression of syntaxin4 in F9 cells

F9 cells grew as well-packed clusters and exhibited a flattened and spread morphology in response to the RA treatment (Fig. 1) (Komiya et al. 2005). These cells expressed several plasmalemmal syntaxins, which are potentially exposed to the cell surface, including epimorphin/syntaxin2, syntaxin3 and syntaxin4. The amount of syntaxin4, which has been reportedly detected mostly on the basolateral membrane in various polarized epithelial cells (ter Beest et al. 2005), was constantly expressed before and after the stimulation with RA (Fig. 1c). While the immunocytochemical analyses revealed that this protein was abundantly localized throughout the cell membrane, a selective extracellular exposure of the subpopulation was apparent at cell–cell contact sites (Fig. 1f). Intriguingly, the lateral localization of extracellular syntaxin4 was perturbed and took on an apical expression pattern upon treatment with RA (Fig. 1g), indicating the possible involvement of extracellular syntaxin4 in the fate of F9 cells.

Extracellular syntaxin4 induces morphological changes in F9 cells

The fact that the polar localization of cell surface syntaxin4 in F9 cells is disrupted upon differentiation motivated us to

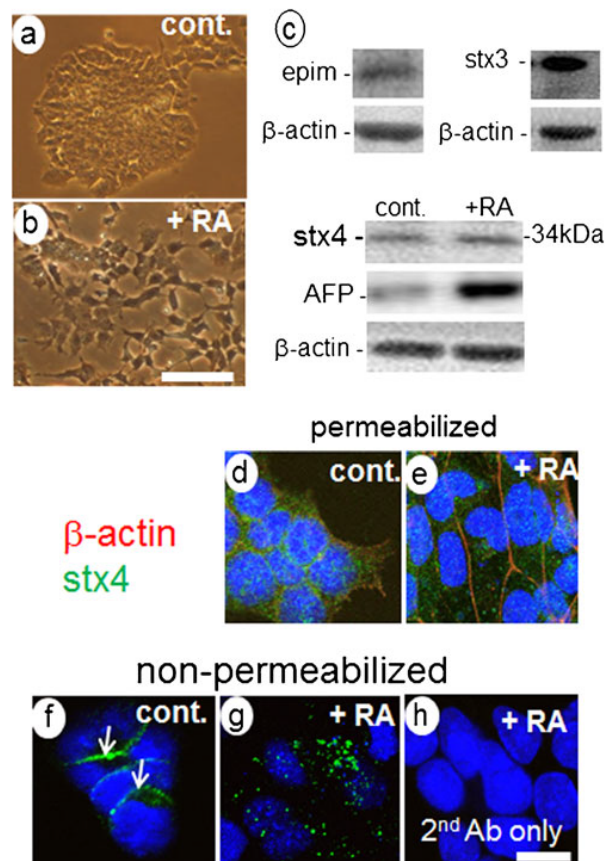


Fig. 1 The morphology and cell surface expression of syntaxin4 in F9 cells with or without RA treatment. F9 cells growing in well-packed colonies (control, *cont.*) (a) changed their morphology to a substrate-adherent flattened pattern as the result of RA-treatment (+ RA) for 5 days (b). Bar 120 μm . c F9 cells possess endogenous epimorphin (*epim*), syntaxin3 (*stx3*) and 4 (*stx4*). β -actin was used for the loading control (*lower*) The signal intensity of the syntaxin4-protein band was unchanged in cells by RA treatment. The differentiation marker α -fetoprotein (*AFP*) was used as a positive control. d–h Syntaxin4 and β -actin were detected in total fraction (*permeabilized*) (d, e) or on the surface (*non-permeabilized*) (f, g) of F9 cells. F9 cells abundantly expressing β -actin and syntaxin4 projected a small subpopulation of syntaxin4 extracellularly, which was localized at the lateral cell membrane (f, arrows). The exclusively lateral distribution of the extracellular syntaxin4 was abolished in response to RA-treatment (+ RA) (e, g). h The cells were stained only with FITC- and Cy3-labeled 2nd antibodies. The nuclei of all the samples were counterstained with DAPI. Bar 30 μm

investigate the impact of non-directional stimulation of extracellular syntaxin4 on the behavior of nascent F9 cells. To this end, cells were artificially treated with recombinant syntaxin4 or the forcibly expressed exogenous syntaxin4, which has been connected with the signal peptide for non-directional cell surface delivery through the classical ER-Golgi secretion channel (Fig. 2). The cells exhibited a flattened and spread morphology in response to either the recombinant syntaxin4 or the forced expression of extracellular syntaxin4 (Fig. 2e, g). The syntaxin4-triggered substrate-

adherent property of F9 cells was more clearly manifested when the cultivation was either carried out under a serum-starved condition (FCS; 2 %) (Fig. 2h j) or seeded onto non-treated petri-dishes (Fig. 3c e). Such a morphological change was also observed in the cells treated with RA (Figs. 1, 2j, 3b) and these cell behaviors were more pronounced with the forced expression of the signal peptide-connected syntaxin4 than the addition of recombinant syntaxin4, implying that the non-directional stimulation with cell surface-syntaxin4 elicited more effective cellular morphological differentiation (Figs. 2, 3). While the cell-substrate adhesion was dramatically enhanced by syntaxin4, this might not be due to an effect on cell viability (Supplementary Fig. 1). Our previous study identified a functional core in syntaxin4 (amino acid residues 103–108) and generated a circular form (ST4n1) that acted as a functional antagonist of epidermal cornification (Komiya et al. 2005). Based on this finding, we investigated whether ST4n1 antagonized syntaxin4-dependent long-term substrate-adherence of F9 cells. Unexpectedly, ST4n1 did not block but rather facilitated the syntaxin4-triggered substrate adhesion and this augmentative effect was statistically significant ($p < 0.05$) (Fig. 3a). The treatment with ST4n1 exhibited a dose-dependent additive impact on syntaxin4-expressing cells, an effect that reached a maximum when its concentration was less than 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 3b). These results demonstrate that the previously identified syntaxin4-core domain also acts as the functional core for this effect, even though the propagation of the signaling mechanism appeared to be more complicated than previously suggested. To confirm the involvement of extracellularly presented syntaxin4 in these changes in cellular behavior, we then tested the effect of caspase inhibitors, which have been shown to completely inactivate the non-classical secretion route for leaderless proteins, including syntaxin4 (Komiya et al. 2005; Keller et al. 2008). We found that the RA-triggered effect was abrogated by this non-classical secretion blocker (Fig. 3i), suggesting that extracellular presentation of leaderless proteins mediate RA signaling in F9 cells and that syntaxin4 but not epimorphin or syntaxin3, is one of the strong candidates for this activity, considering the effects of non-directional stimulation of their recombinant proteins (Fig. 2c, d).

Syntaxin4-triggered cell behavior changes

Accompanying the changes in the cell-shape and the substrate adherence, F9 cells with extracellular syntaxin4 exhibited dramatically enhanced cellular locomotion (Fig. 4a d). Furthermore, when the cell-substrate interaction was completely blocked by agarose gel coated on the substrate, these cells formed many rough surfaced smaller aggregates as compared to the control cells, indicating that extracellular syntaxin4, in contrast, weakened cell cell adhesion (Fig. 4e h).

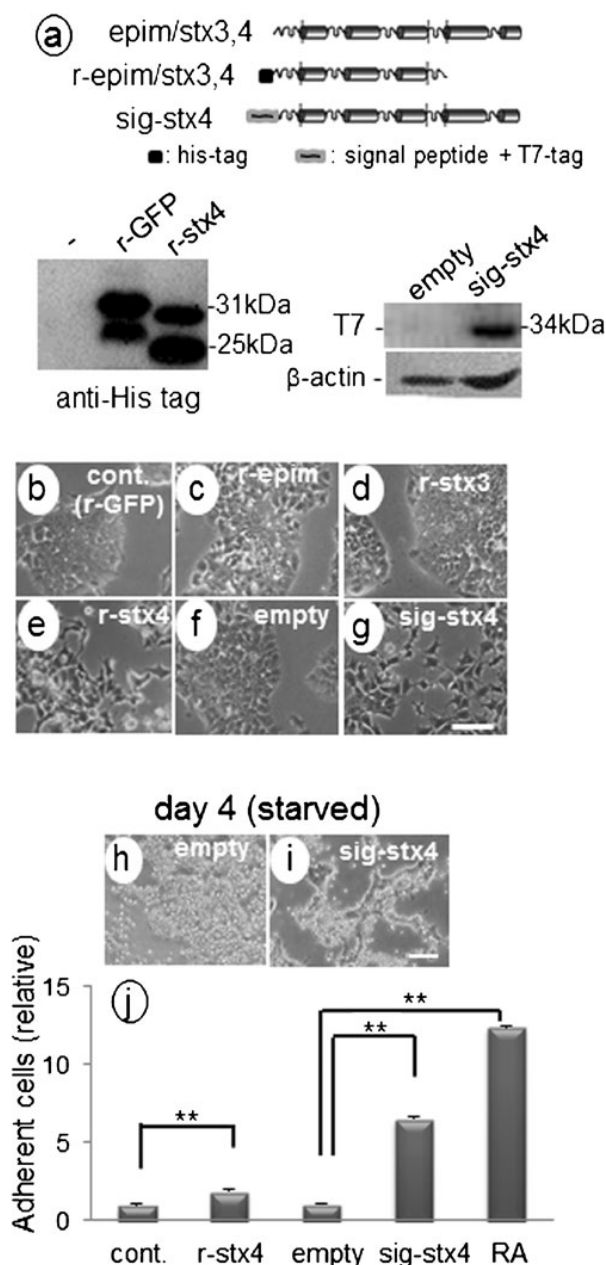


Fig. 2 Effect of non-directional stimulation with extracellular syntaxin4 on F9 cell behaviors. **a** (upper) Schematic diagrams of epimorphin/syntaxin3/syntaxin4, His-tagged their recombinant forms and the signal peptide- and T7-tagged syntaxin4 used for the non-directional extracellular expression (*sig-stx4*). **a** (lower left) Purified recombinant GFP (*r-GFP*) and *r-stx4* were analyzed with anti His-tag antibody. Note that both GFP and syntaxin4 were detected as doublet bands, the lower ones of which are partially degraded products with the N-terminal His-tag intact. **a** (lower right) The expression of exogenous syntaxin4 in the stable transfectants (F9 *sig-stx4*) was analyzed with an anti-T7 antibody. **b–g** Phenotypic appearances of F9 cells in response to exogenous syntaxins. Cell shape changes were induced by either the addition of *r-stx4* for 5 days (*r-stx4*) (**e**) or the cell surface expression of exogenous syntaxin4 (*sig-stx4*) (**g**). These changes were not observed in the same cells treated with recombinant forms of epimorphin (*r-epim*) (**c**), syntaxin3 (*r-stx3*) (**d**), GFP control (*r-GFP*) (**b**) or transfected with the empty vector (**f**). Bar 100 μ m. **h–j** Cell images (**h**, **i**) and relative number of substrate-adherent F9 cells (**j**) treated with (*r-stx4*, *sig-stx4*) or without (*r-GFP*, *cont.*) exogenous syntaxin4 on day 4 under the serum-starved condition. Bar 100 μ m. Stimulation with *r-stx4* or forced expression of extracellular syntaxin4 (*sig-stx4*) resulted in an increase of substrate-adherent cells (**j**), $n=6$; $^{**}p<0.01$

weakened by syntaxin4, we next investigated the molecular assembly of E-cadherin and the catenins (Ozono et al. 2011). Although E-cadherin-mediated cell adhesion system plays a central role in intercellular interactions for this cell type (Yoshida-Noro et al. 1984), the expression level of E-cadherin and its association with α - and β -catenins appeared not to be affected (Fig. 5c e). We further tested the possible involvement of the NAD-dependent deacetylase *sirt* gene family members, especially Sirt1 or 2, which have been reported to play roles in cellular binding to the substrate (Potente et al. 2007). While the overexpression of *sirt2* gene products increased substrate-adherent cells in the serum-starved environment, as shown in the case of the cells stimulated with syntaxin4 (Supplementary Fig. 2), the addition of nicotinamide, an inhibitor of Sirt 1 and 2 (Giammona et al. 2009) that reportedly blocks the effect of exogenous Sirt2, attenuated only part of the syntaxin4-triggered cell-substrate adhesion. Thus, we concluded that *sirt* genes are not primarily responsible for the appearances of the syntaxin4-triggered cellular phenotype.

A possible component participating in the syntaxin4-triggered cell adhesion

Among several molecular candidates responsible for the syntaxin4-triggered phenotypic changes, we found that vinculin, which regulates both cell-substrate and cell-cell adherence junctions as a linker to the actin cytoskeleton (Coll et al. 1995; Tozeren et al. 1998), was down-regulated by the forced expression of extracellular syntaxin4 (Fig. 6a). While this protein was abundant in the tips of the filopodia that sprouted from the periphery of the tightly-packed colonies in control cells, its expression was mostly absent in syntaxin4-expressing cells (Fig. 6b g). As the disruption of the *vinculin*

Cell growth, metabolism and the expression of the E-cadherin complex were not affected by syntaxin4-treatment

In spite of the dramatic impact on the cell-cell and cell-substrate associations, the stimulation with syntaxin4 neither significantly affected cellular proliferation nor the metabolic profile (Fig. 5a, b). In addition, while control F9 cells grew in a more tightly-packed colony, assays with BrdU-labeling and Ki67-staining failed to detect any difference in cell proliferation with and without syntaxin4-treatment (data not shown). Given that cell-cell adhesion might be

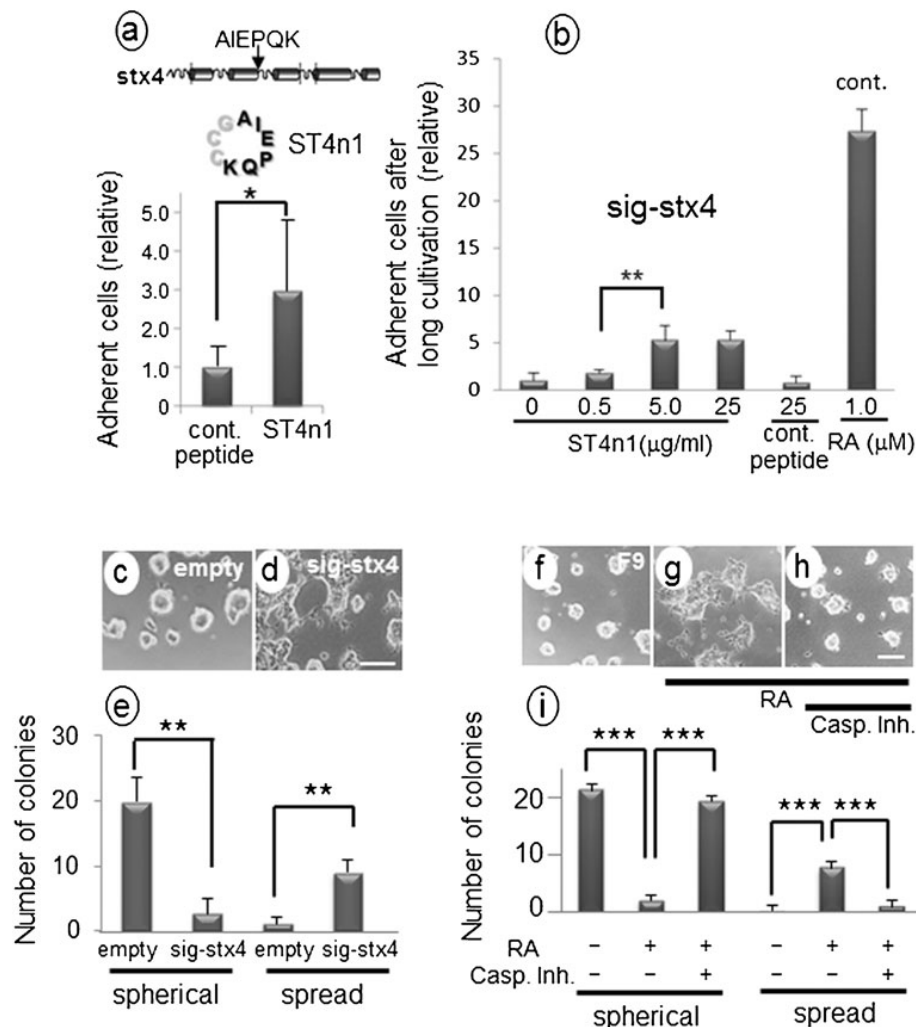


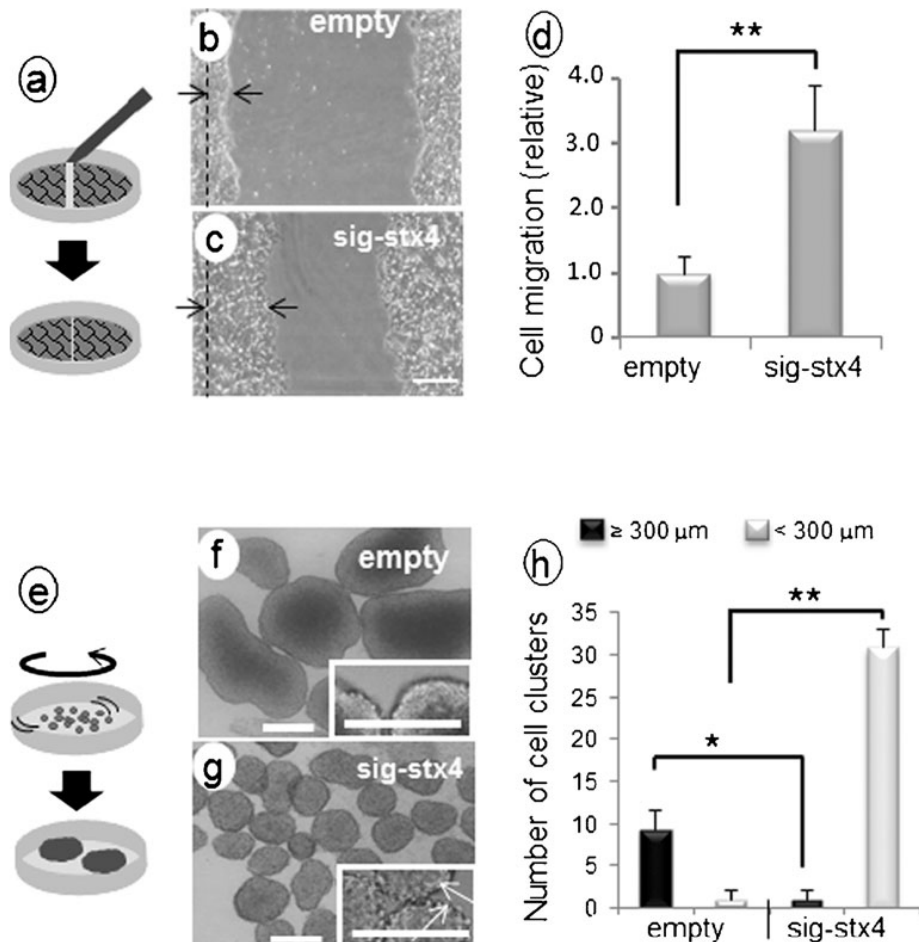
Fig. 3 Effect of the syntaxin4-derived peptide ST4n1 and the inhibition of the non-classical secretion pathway on F9 cell behavior. **a** The addition of ST4n1 (1 $\mu\text{g/ml}$), a circularized form of the functional core of syntaxin4 (amino acids 103–108 AIEPQK), also elicited a similar response to that of stx4. ST4n1 added an increased concentration for a longer cultivation period (day 10), in which the viable syntaxin4-expressing cells had almost detached from the dish. Some cells were still attached to the substrate when ST4n1 was also present and this effect reached a maximum when the ST4n1 added was less than 5 $\mu\text{g/ml}$ (**b**). Non-functional control peptide (cont.peptide) was used as a control. $n=6$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$. **c–e** Extracellular syntaxin4 enhanced cell-

substrate interaction. F9 cells with sig-stx4 were able to attach and even spread onto non-treated petri dishes (spread) (**d**), while most of the cells with an empty vector became spherical aggregates that were unattached to the well (spherical) (**c**). **f–i** The number of spread cells increased in response to the treatment with RA (1 μM) (**g**), which returned to the level of the non-treated cells when simultaneously treated with a caspase inhibitor (Casp. Inh., 100 μM), a strong blocker of non-classical extracellular transport of leaderless proteins including syntaxin4 (**h**). **e** and **i** Quantification of the spherical and spread aggregates on petri dishes. $n=4$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

gene has been shown to weaken cell cell adhesion and enhance cellular migration in this cell type (Coll et al. 1995; Tozeren et al. 1998), this down-regulation may account for part of the syntaxin4 effect. On the other hand, vinculin disruption is known to also weaken the cell substrate interaction in F9 cells, which is inconsistent with our findings (Fig. 2), leading to the hypothesis that the cellular phenotypic changes may also be attributed to molecular elements induced by the onset of cyto-differentiation, given

that such cellular responses are reminiscent of those stimulated by RA. We found that syntaxin4-expressing cells up-regulated GATA-4, an RA-inducible transcription factor that acts as the differentiation cue in this cell type (Futaki et al. 2004) (Fig. 7a). Thus, we investigated the mRNA of several endodermal differentiation markers in anaplastic F9 cells treated with recombinant syntaxin4 or RA, which included α -fetoprotein, a splicing isoform of the tight junction scaffold protein ZO-1 α + and the actin-regulatory protein villin

Fig. 4 Expression of extracellular syntaxin4 enhanced cellular migratory capacity and weakened cell–cell adhesion in F9 cells. **a** Schematic diagram of the cell mobility assay. **b–d** Phase contrast pictures of cells after 24 h (**b**, **c**) and the quantification of the cell migratory distance (between arrows in **b** and **c**) of the F9 cells with (*sig-stx4*) or without (*empty*) extracellular syntaxin4 (**d**). The expression of syntaxin4 accelerated the cell mobility (**d**). $n=4$, $**p<0.01$. Bar 150 μm . **e** Schematic diagram of the suspension culture for making cell aggregates. *sig-stx4* cells formed smaller aggregates (**g**) with a rough surface (arrows) as compared to control cells (**f**). Bar 250 μm . **h** Number of cell aggregates larger (black square) or smaller (white square) than 300 μm in diameter. $n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$

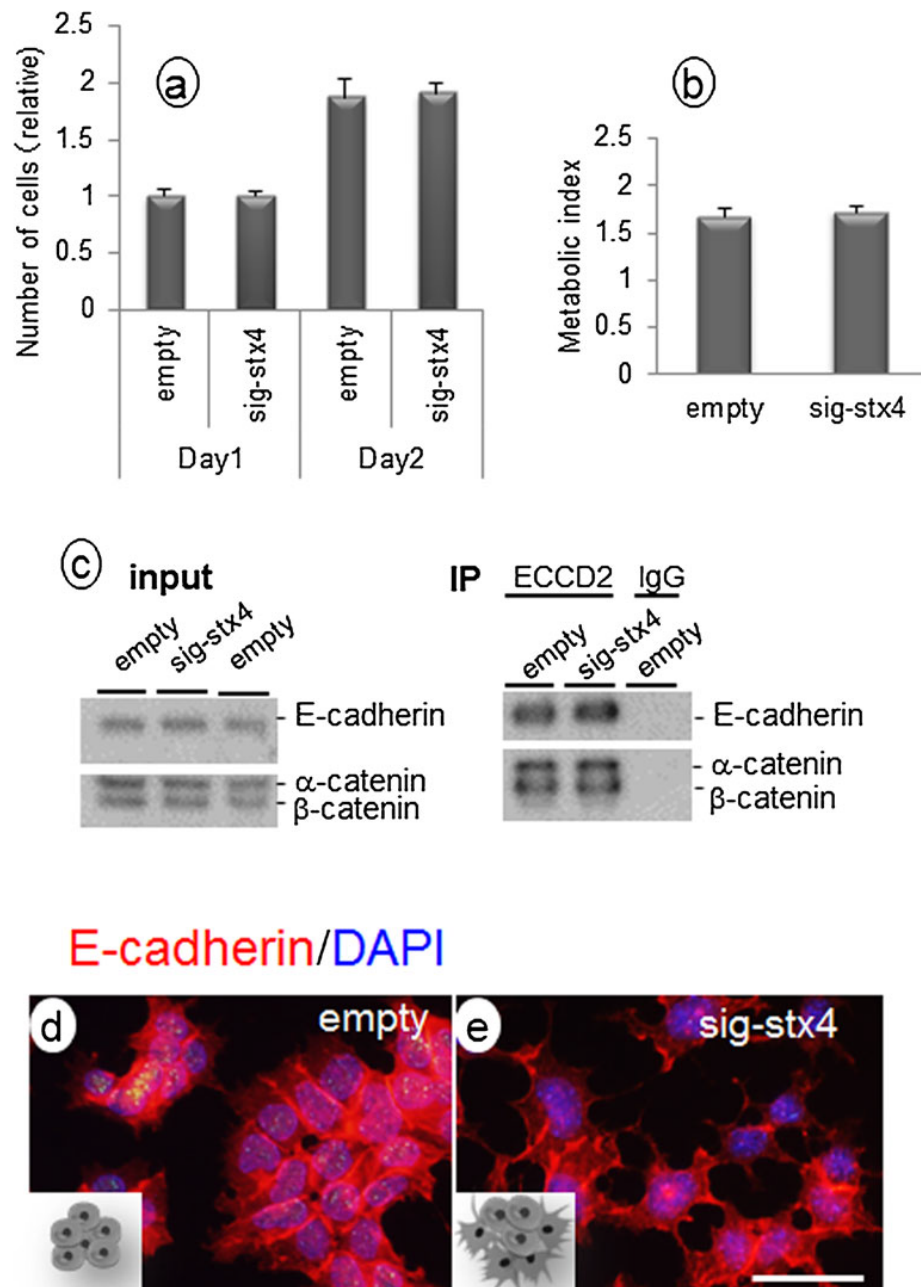


as well as syntaxin3 (Komiya et al. 2005; Wang et al. 1985). The augmented mRNA expression of all of these differentiation markers was evident after treatment with recombinant syntaxin4 or RA (Fig. 7b). Intriguingly, the up-regulation of the t-SNARE protein syntaxin3 in response to extracellular syntaxin4 was even more obvious than the response to RA. We recently reported a novel function of syntaxin3 in B16 melanoma cells, which is an effect on actin dynamics that enhances substrate adhesion (Shono et al. 2013). Based on these findings, we investigated whether the syntaxin4-triggered cellular response was attributable to the augmented expression of syntaxin3. We found that the forced expression of syntaxin3 induced the active formation of pseudopodia with longitudinal stress fibers along the cell body but vinculin was rarely present at the tips of newly formed pseudopodia (Fig. 7c f), indicating that syntaxin3 partly mediates the morphological differentiation induced by extracellular syntaxin4. Taking these results together, it is suggested that differentiation stimuli perturb the polar lateral localization of extracellular syntaxin4, which activates latent differentiation programs in F9 cells, leading to an alteration in cellular adhesion.

Discussion

In the present study, the t-SNARE protein syntaxin4 was found to be endowed with extracellular functions that were exerted when the protein was expressed on the entire cell surface or added to F9 cells non-directionally. F9 cells also endogenously possess certain other plasmalemmal syntaxins, i.e., epimorphin/syntaxin2 (Hirai et al. 1992) and syntaxin3 (Bennett et al. 1993), in specific membrane domains but neither had dramatic effects on the incidental changes in cell shape when added in the extracellular medium. The distinct and specific domain-localization at the plasma membrane has been postulated to have physiological importance (Li et al. 2002; Sharma et al. 2006; ter Beest et al. 2005; Torres et al. 2011). For example, syntaxin3 is known to accumulate at the apical membrane domain of F9 cells at the time of the initiation of differentiation (Komiya et al. 2005). This study detected a small subpopulation of extracellular syntaxin4 at the cell–cell contact site of undifferentiated F9 cells, the distribution of which was changed to the apical cell membrane upon the progression of differentiation as the result of RA treatment.

Fig. 5 Expression of extracellular syntaxin4 did not affect cellular proliferation, metabolism or the expression of E-cadherin-contained cell–cell junctional components. Both the cellular proliferation (a) and metabolism (b) were not significantly different between the cells with (*sig-stx4*) and without (*empty*) exogenous extracellular syntaxin4. $n=8$, $p>0.5$. c (upper), Immunoprecipitation analysis of E-cadherin, α -catenin and β -catenin. The expression and intermolecular association of these proteins were not affected by non-directional stimulation with extracellular syntaxin4 (*sig-stx4*). The total cell lysate (*input*) and the immunocomplex retrieved with anti-E-cadherin or control IgG (*IP*) were analyzed. d, e Immunolocalization of E-cadherin (red) in cells with (*sig-stx4*) (e) or without (*empty*) (d) exogenous extracellular syntaxin4. Although the localization of E-cadherin appears to be different between the two cell types, this may be due to the difference in the cell shape. Bar 25 μ m



The nascent F9 cells were very stable in terms of spontaneous transformation (Atsumi et al. 1982; Rousset et al. 1983) and the artificial non-directional stimulation with syntaxin4 induced changes in cell behavior reminiscent of RA, which suggests that RA-triggered differentiation is mediated, at least in part, by the change in the localization of extracellular syntaxin4 at the plasma membrane. If this is the case, then the putative receptors for extracellular syntaxin4 may be exclusively expressed at the apical cell membrane and the differentiation cue may destroy the diffusion barrier between apical and basolateral

membranes. The localization analyses of binding partners or receptors of extracellular syntaxin4 should be necessary to elucidate this scenario. For example, those with the labeled form of recombinant syntaxin4 could give information, as has been shown for epimorphin's binding partner at the cell membrane (Hirai et al. 2007). Alternatively, a series of ongoing studies on the molecular mechanism underlying the directed cytoplasmic delivery (ter Beest et al. 2005; Torres et al. 2011) may ultimately uncover the precise role of their restricted membrane localization and the extracellular extrusion.

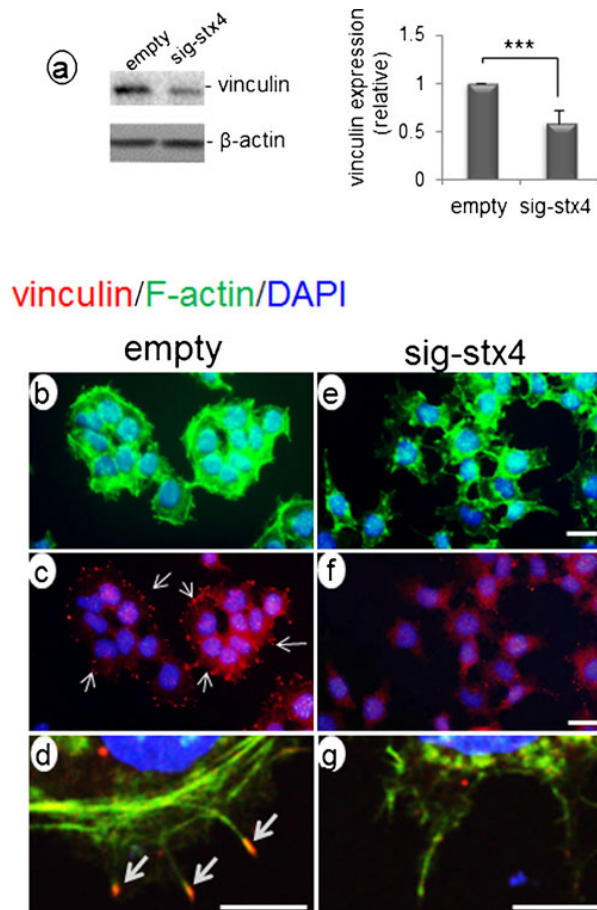


Fig. 6 A possible downstream element of non-directional stimulation with extracellular syntaxin4. **a** (left) Western blot analysis of vinculin, a possible regulator of cell–cell and cell–substrate adhesion. β -actin was used for the loading control. **a** (right) The quantitative analyses revealed that vinculin expression was down-regulated in cells with extracellular syntaxin4 (*sig-stx4*). $n=4$, *** $p<0.001$. **b–g** Immunolocalization of vinculin (red) and F-actin (green) in cells with (*sig-stx4*) (**e–g**) or without (*empty*) (**b–d**) extracellular syntaxin4. The accumulation of vinculin was clearly detectable at the tips of filopodia sprouted from the tightly-packed colonies of the control cells (*empty*) (**c** and **d**, arrows). Bar 25 μ m

The important points that have emerged thus concern the relationship between morphological change and functional differentiation in F9 cells. The change in the phenotypic appearance from a rounded cell shape to one that is substrate-spread is believed to be closely related to differentiation in pluripotent/anaplastic stem cells (Huang and Ingber 2000; Lukashev and Werb 1998; Unemori and Werb 1986). Indeed, the initiation of differentiation in F9 cells was accompanied by the appearance of a population of flattened cells but their anaplastic state was reported to be stably maintained on the E-cadherin-immobilized substrate, where cells were properly expanded (Nagaoka et al. 2006, 2008). On the other hand, RA treatment accelerated the progression

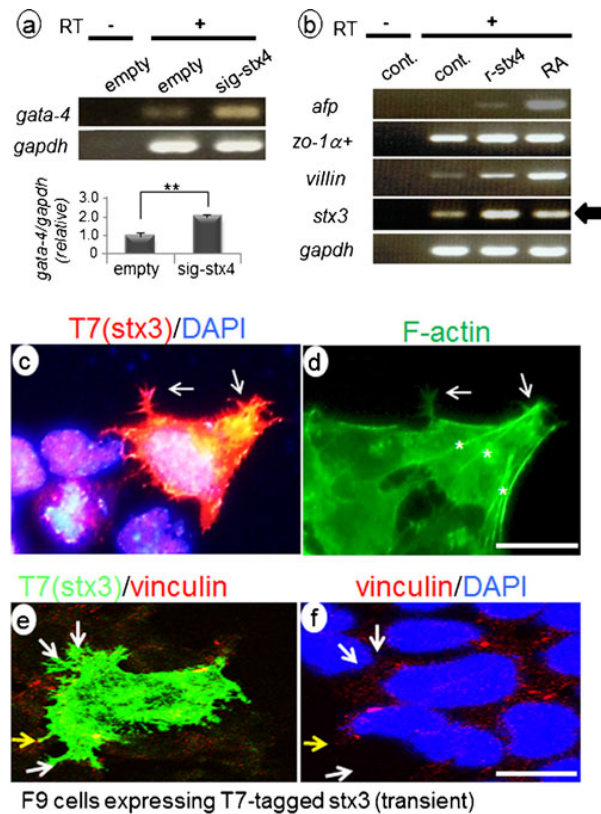


Fig. 7 Differentiation induction in F9 cells by extracellular syntaxin4. **a** The relative amount of *gata-4*/*gapdh* signaling in *sig-stx4* cells compared to the empty cells. RT (-) without reverse-transcription reaction. $n=3$, ** $p<0.01$. **b** The amount of mRNA of several differentiation markers was analyzed in intact F9 cells treated with recombinant syntaxin4 (*r-stx4*) or RA for 5 days. *afp*, α -fetoprotein; *Stx3*, syntaxin3. Most of the endodermal markers, including syntaxin3 (arrow), were up-regulated by the treatment with syntaxin4, this result was also confirmed in *sig-stx4* cells (data not shown). **c, d** Transient expression of T7-tagged syntaxin3 resulted in the active formation of pseudopodia (arrows) and stress fibers (*) across the cell body without any treatment with extracellular syntaxin4. Cells were stained for F-actin (green) and exogenous cytoplasmic syntaxin3 (red) with phalloidine and anti-T7 tag antibody. **e, f** Localization of vinculin (red) in cells with exogenous cytoplasmic syntaxin3 (green). While the accumulation of vinculin was remaining at the tips of some filopodia (yellow arrow), this molecule was rarely present at the tips of newly formed pseudopodia (white arrows). Cytoplasmic syntaxin3 may partly mediate signals by extracellular syntaxin4 so as to confer the substrate-adhesive property upon F9 cells. Bar 30 μ m

of differentiation only in the flattened peripheral cells in the suspended F9 cell aggregates, the central portion of which is composed of well-rounded cells (Hogan et al. 1981), indicating that the cell shape change and functional differentiation are not independent phenomena. Given that the maintenance of the substrate-adhesive property may be a critical component in the functional differentiation of F9 cells (Grover et al. 1987), we identified *Sirt 2* gene products as an element that which might support the long-term substrate-

adhesive property, like syntaxin4. However, F9 cells expressing *Sirt2* gene products did not undergo differentiation in the absence of differentiation induced by stimulation with RA or syntaxin4. Thus, functional differentiation may always lead to changes in cell shape but not vice versa.

Concomitant with the syntaxin4 enhancement of cell–substrate interaction, F9 cells apparently had a weakened cell–cell adhesion potential. Although the intercellular adhesion in this cell type primarily relies on E-cadherin (Nagafuchi et al. 1987; Takeichi 1986; Yoshida-Noro et al. 1984), the expression level, as well as the intermolecular association with its cytoplasmic regulators α - and β -catenin, were unchanged. Instead, we found that vinculin, a mediator for the interaction of cadherin or integrins with the actin cytoskeleton, was eliminated at the tips of filopodia of syntaxin4-producing cells. While vinculin elimination in F9 cells has been reported to result in the reduction of cell–cell adhesion and the enhancement of cell mobility (Coll et al. 1995), this treatment is also known to weaken the cell–substrate interaction, which is distinctly different than the properties of syntaxin4-producing cells. We reasoned that certain molecular elements specific to the cell lineage induced by the syntaxin4 signaling pathway to be the cause of this syntaxin4 effect. The analyses of several differentiation markers suggested that the syntaxin4-triggered substrate adhesion might be the result of the augmentation of another family member syntaxin3, which was more evident in cells treated with syntaxin4 than that with RA. In fact, F9 cells with exogenous syntaxin3 appeared to actively sprout pseudopodia while exhibiting the spread morphology without any need of extracellular syntaxin4. A similar role of cytoplasmic syntaxin3 was recently found in melanoma B16 cells: the ectopic over-expression of syntaxin3 regulated actin dynamics, leading to the enhancement of cell–substrate interaction (Shono et al. 2013). Thus, it may be that syntaxin3 partly mediates the function of extracellular syntaxin4.

With regard to this issue, the ratio of the substrate-adherent F9 cells by syntaxin4 was clearly elevated not only by full length syntaxin4 but also the syntaxin4-derived peptide ST4n1. An additive/complementary effect of syntaxin4 and ST4n1 on the cell–substrate attachment was observed up to certain concentrations, which suggests that the previously identified functional core may also be utilized for this effect. On the other hand, we have shown that ST4n1 clearly behaves as an antagonist of syntaxin4 in terms of keratinocyte cornification (Kadono et al. 2012), which complicates the effort to understand the activation of the putative cell surface receptor of syntaxin4. However, we recently noticed that the survival and substrate association of keratinocytes exposed to oxidative stress were significantly enhanced, not only by full length syntaxin4 but also by this ST4n1 peptide (Kadono, unpublished result). Presumably, activation of the signaling pathways by the receptor-binding of syntaxin4 via its functional core may be propagated in a distinct manner for

the different cellular responses. Detailed analyses are obviously going to be necessary to elucidate the evidently contradictory activities of syntaxin4. An investigation of the putative receptor and downstream elements in the signaling pathway of extracellular syntaxin4 is now underway.

Acknowledgments We thank Drs. Nagafuchi and Takeichi for F9 cells and anti-mouse E-cadherin antibodies. We are grateful to all members of Hirai laboratory for helpful discussions. Part of this work was supported by the Hyogo COE Program Promotion Project and Grant-in Aid for Scientific Research (KAKENHI 24590365).

References

- Alonso A, Breuer B, Steuer B, Fischer J (1991) The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int J Dev Biol* 35:389–397
- Atsumi T, Shirayoshi Y, Takeichi M, Okada TS (1982) Nullipotent teratocarcinoma cells acquire the pluripotency for differentiation by fusion with somatic cells. *Differentiation* 23:83–86
- Bennett MK, Garcia-Ararras JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD, Scheller RH (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74:863–873
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98–106
- Chen CS, Nelson CM, Khauv D, Bennett S, Radisky ES, Hirai Y, Bissell MJ, Radisky DC (2009) Homology with vesicle fusion mediator syntaxin-1a predicts determinants of epimorphin/syntaxin-2 function in mammary epithelial morphogenesis. *J Biol Chem* 284:6877–6884
- Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodriguez Fernandez JL, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED (1995) Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9161–9165
- Flaumenhaft R, Rozenvayn N, Feng D, Dvorak AM (2007) SNAP-23 and syntaxin-2 localize to the extracellular surface of the platelet plasma membrane. *Blood* 110:1492–1501
- Futaki S, Hayashi Y, Emoto T, Weber CN, Sekiguchi K (2004) Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol Cell Biol* 24:10492–10503
- Giammona LM, Panuganti S, Kemper JM, Apostolidis PA, Lindsey S, Papoutsakis ET, Miller WM (2009) Mechanistic studies on the effects of nicotinamide on megakaryocytic polyploidization and the roles of NAD⁺ levels and SIRT inhibition. *Exp Hematol* 37(1340–1352):e1343
- Grover A, Rosentraus MJ, Stermann B, Snook ME, Adamson ED (1987) An adhesion-defective variant of F9 embryonal carcinoma cells fails to differentiate into visceral endoderm. *Dev Biol* 120:1–11
- Hirai Y, Takebe K, Takashina M, Kobayashi S, Takeichi M (1992) Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 69:471–481
- Hirai Y, Lochter A, Galosy S, Koshida S, Niwa S, Bissell MJ (1998) Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 140:159–169
- Hirai Y, Nelson CM, Yamazaki K, Takebe K, Przybylo J, Madden B, Radisky DC (2007) Non-classical export of epimorphin and its adhesion to $\{\alpha\}$ v-integrin in regulation of epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 120:2032–2043
- Hogan BL, Taylor A, Adamson E (1981) Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. *Nature* 291:235–237

- Huang S, Ingber DE (2000) Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 261:91–103
- Kadono N, Miyazaki T, Okugawa Y, Nakajima K, Hirai Y (2012) The impact of extracellular syntaxin4 on HaCaT keratinocyte behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 417:1200–1205
- Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818–831
- Kinoshita N, Horie Y, Ohshima S, Hirai Y, Dohmen T, Jin M, Matsuhashi T, Sasaki J, Sasaki T, Iizuka M, Ohnishi H (2011) Epimorphin protects hepatocytes from oxidative stress by inhibiting mitochondrial injury. *J Gastroenterol Hepatol* 26:201–206
- Komiya S, Shimizu M, Ikenouchi J, Yonemura S, Matsui T, Fukunaga Y, Liu H, Endo F, Tsukita S, Nagafuchi A (2005) Apical membrane and junctional complex formation during simple epithelial cell differentiation of F9 cells. *Genes Cells* 10:1065–1080
- Koopman P, Cotton RG (1986) The response of embryonal carcinoma cells to retinoic acid depends on colony size. *Differentiation* 31:55–60
- Koopman P, Cotton RG (1987) Pluripotent differentiation of single F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 168:567–571
- Lehnert L, Lerch MM, Hirai Y, Kruse ML, Schmiegel W, Kalthoff H (2001) Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J Cell Biol* 152:911–922
- Li X, Low SH, Miura M, Weimbs T (2002) SNARE expression and localization in renal epithelial cells suggest mechanism for variability of trafficking phenotypes. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1111–F1122
- Lukashev ME, Werb Z (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8:437–441
- Miura K, Yoshino R, Hirai Y, Goto T, Ohshima S, Mikami K, Yoneyama K, Watanabe D, Sato M, Senoo H, Kodama Y, Osawa Y, Brenner DA, Watanabe S (2007) Epimorphin, a morphogenic protein, induces proteases in rodent hepatocytes through NF-kappaB. *J Hepatol* 47:834–843
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M (1987) Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329:341–343
- Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, Hattori F, Chen H, Tanaka T, Okabe M, Fukuda K, Akaike T (2006) E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS ONE* 1:e15
- Nagaoka M, Ise H, Harada I, Koshimizu U, Maruyama A, Akaike T (2008) Embryonic undifferentiated cells show scattering activity on a surface coated with immobilized E-cadherin. *J Cell Biochem* 103:296–310
- Oka Y, Sato Y, Tsuda H, Hanaoka K, Hirai Y, Takahashi Y (2006) Epimorphin acts extracellularly to promote cell sorting and aggregation during the condensation of vertebral cartilage. *Dev Biol* 291:25–37
- Okugawa Y, Hirai Y (2008) Overexpression of extracellular epimorphin leads to impaired epidermal differentiation in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128:1884–1893
- Okugawa Y, Bascom JJ, Hirai Y (2010) Epimorphin-derived peptide antagonists remedy epidermal parakeratosis triggered by unsaturated fatty acid. *J Dermatol Sci* 59:176–183
- Ozono K, Komiya S, Shimamura K, Ito T, Nagafuchi A (2011) Defining the roles of alpha-catenin in cell adhesion and cytoskeleton organization: isolation of F9 cells completely lacking cadherin-catenin complex. *Cell Struct Funct* 36:131–143
- Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejana E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S (2007) SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 21:2644–2658
- Qin J, Takahashi Y, Isuzugawa K, Imai M, Yamamoto S, Hirai Y, Imakawa K (2005) Regulation of embryo outgrowth by a morphogenic factor, epimorphin, in the mouse. *Mol Reprod Dev* 70:455–463
- Radisky DC, Hirai Y, Bissell MJ (2003) Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol* 13:426–434
- Radisky DC, Stallings-Mann M, Hirai Y, Bissell MJ (2009) Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:228–234
- Rousset JP, Bucchini D, Jami J (1983) Hybrids between F9 nullipotent teratocarcinoma and thymus cells produce multidifferentiated tumors in mice. *Dev Biol* 96:331–336
- Sharma N, Low SH, Misra S, Pallavi B, Weimbs T (2006) Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 173:937–948
- Shono M, Yoshioka R, Chatani Y, Hirai Y (2013) Ectopic expression of syntaxin3 affects behaviors of B16 melanoma by controlling actin dynamics. *Cell Struct Funct* 38:97–107
- Takeichi M (1986) Molecular basis for teratocarcinoma cell–cell adhesion. *Dev Biol* 2:373–388
- ter Beest MB, Chapin SJ, Avrahami D, Mostov KE (2005) The role of syntaxins in the specificity of vesicle targeting in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 16:5784–5792
- Torres J, Funk HM, Zegers MM, ter Beest MB (2011) The syntaxin 4 N terminus regulates its basolateral targeting by munc18c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 286:10834–10846
- Tozeren A, Wu S, Hoxter B, Xu W, Adamson ED, Byers SW (1998) Vinculin and cell–cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 5:49–59
- Unemori EN, Werb Z (1986) Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell Biol* 103:1021–1031
- Wang SY, LaRosa GJ, Gudas LJ (1985) Molecular cloning of gene sequences transcriptionally regulated by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP in cultured mouse teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 107:75–86
- Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M (1984) Molecular nature of the calcium-dependent cell–cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101:19–27

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells

Natsumi Hagiwara-Chatani¹, Kota Shirai¹, Takumi Kido¹, Tomoatsu Horigome¹, Akihiro Yasue², Naoki Adachi¹ & Yohei Hirai¹

Received: 25 July 2016

Accepted: 28 November 2016

Published: 06 January 2017

Embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells are attractive tools for regenerative medicine therapies. However, aberrant cell populations that display flattened morphology and lose ground-state pluripotency often appear spontaneously, unless glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1/2) are inactivated. Here, we show that membrane translocation of the t-SNARE protein syntaxin-4 possibly is involved in this phenomenon. We found that mouse ES cells cultured without GSK3 β /MEK1/2 inhibitors (2i) spontaneously extrude syntaxin-4 at the cell surface and that artificial expression of cell surface syntaxin-4 induces appreciable morphological changes and mesodermal differentiation through dephosphorylation of Akt. Transcriptome analyses revealed several candidate elements responsible for this, specifically, an E- to P-cadherin switch and a marked downregulation of Zscan4 proteins, which are DNA-binding proteins essential for ES cell pluripotency. Embryonic carcinoma cell lines F9 and P19CL6, which maintain undifferentiated states independently of Zscan4 proteins, exhibited similar cellular behaviors upon stimulation with cell surface syntaxin-4. The functional ablation of E-cadherin and overexpression of P-cadherin reproduced syntaxin-4-induced cell morphology, demonstrating that the E- to P-cadherin switch executes morphological signals from cell surface syntaxin-4. Thus, spontaneous membrane translocation of syntaxin-4 emerged as a critical element for maintenance of the stem-cell niche.

Embryonic stem (ES) cells cultured without inhibitors of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1/2) (2i) are prone to exhibit heterogeneity in morphology and in the ground state of pluripotency¹. Spontaneous generation of such aberrant cells cannot be completely prevented even in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF), which supports the expression of the stemness factor Oct3/4 by activating either Jak-Stat3 or phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathways². Previous studies have demonstrated that Nanog and Rex1, other transcription factors involved in pluripotency, asynchronously fluctuate over time in clonal ES cells; this might affect the differentiation potential of each ES cell in the same colony^{3–5}. For example, *nanog*-negative ES cells tend to differentiate into primitive endoderm-like cells⁶ and *Rex1*-negative cell populations behave like epiblasts or primitive ectoderm cells, and more readily differentiate into somatic lineages⁷. In addition, the cyclic gene *Hes1* is reportedly asynchronously expressed in clonal ES cells, and contributes to heterogeneous responses to differentiation stimuli; low or high expression levels result in differentiation into neural or mesodermal cells, respectively^{8,9}. The up- and downregulation of these cellular context determinants are always accompanied by dramatic morphological alternations, and conversely, forced cell shape changes could act as differentiation cues¹⁰. This suggests a close connection between morphology and differentiation potential in stem cells.

¹Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University, Sanda, Japan. ²Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.H. (email: y-hirai@kwansei.ac.jp)

The decrease in ES cell clonogenic capacity is considered a consequence of temporal epithelial to mesenchymal-transition (EMT)^{11,12}. EMT is characterized by downregulation of E-cadherin, a target of transcriptional repression by snail family proteins, and upregulation of N-cadherin^{13,14}. E-cadherin downregulation is closely linked to inactivation of PI3K/Akt signals that regulates GSK3 β , a key element of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in ES cells¹⁵. Thus, the functional modulation of these key elements is crucial for ES cell stabilization^{16,17}. In addition, considerable attention has been given to P-cadherin, an alternative cadherin that is upregulated during EMT. Increased expression of P-cadherin has been detected in many cancer cells¹⁸, and P-cadherin appears to promote aggressive/invasive properties in several tumor cells¹⁹. Zscan4 family members have recently emerged as key factors that maintain ground-state pluripotency. These factors appear to play critical roles in the stability/integrity of the ES cell genome, and functional knockdown of cognate Zscan4 members resulted in decreased self-renewal potential in ES cells^{20,21}. The Zscan4 family comprises six paralogs (Zscan4a-f) and three pseudogenes, the expression of which has been specifically detected in 2-cell embryos *in vivo* and in ES cells *in vitro*^{22,23}. The expression of these proteins is also regulated by PI3K/Akt, suggesting the importance of this pathway for maintaining the ground state of pluripotency in ES cells²³. Given the spontaneous appearance of aberrant cell populations, with altered morphology and differentiation potential, in clonal stem cell colonies, one might predict the existence of unidentified non-diffusible extracellular signals that can focally and temporally regulate the PI3K/Akt pathway to maintain stem cell plasticity.

Syntaxin family proteins are membrane-tethered proteins that mediate intracellular vesicle fusions as t-SNARE components^{24,25}. However, subpopulations of certain plasmalemmal proteins, including syntaxin2 (epimorphin) and syntaxin-4, reportedly translocate across the cell membrane to locally act as non-diffusible signaling molecules^{26–31}. For example, certain cells of the embryonic carcinoma (EC) cell line F9 extrude syntaxin-4 as membrane-tethered proteins to locally affect the morphology, motility, and cellular context of adjacent cells²⁷.

In the present study, we detected local extrusion of syntaxin-4 in ES cell colonies even in the absence of differentiation stimuli. Using an inducible expression system, we found that extracellular expression of syntaxin-4 leads to dephosphorylation of Akt, morphological changes, an E- to P-cadherin switch, and the early onset of differentiation, with downregulation of Zscan4 genes, in ES cells. Thus, local membrane translocation of syntaxin-4 has emerged as a key element for stem-cell plasticity.

Results

Expression of syntaxin-4 in mouse ES cells. In certain cell types, a subpopulation reportedly extruded extracellular syntaxin-4 to locally propagate signals for morphogenesis and differentiation^{27,30}. To determine whether this is also the case in ES cells, extracellular exposure to endogenous syntaxin-4 was investigated in cells grown in LIF-containing medium. GSK3 β /MEK1/2, key elements of Wnt/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, have been proposed to play regulatory roles in ES cell stemness, and the simultaneous inhibition of these signaling pathways resulted in the maintenance of ES cells in the ground state of pluripotency¹. We found that all cells expressed cytoplasmic syntaxin-4; however, certain cell populations extruded syntaxin-4 at lateral and apical cell surfaces when cultured without GSK3 β /MEK1/2 inhibitors (2i) (Fig. 1a). The effect of 2i on the membrane translocation of syntaxin-4 was confirmed in lysate of ES cells transfected with a T7 tagged-syntaxin-4 transgene (T7stx4) (Fig. 1b and Supplementary Fig. S1). The ratio of cells presenting extracellular syntaxin-4 was approximately 20%, which was confirmed in the transfected ES cells (Fig. 1c). These results demonstrated that clonal stem cells extrude syntaxin-4 in the absence of potent pluripotency sustaining reagents.

Extracellular syntaxin-4 results in morphological changes and mesodermal differentiation in ES cells.

To know the possible role of extruded syntaxin-4, we tested an antagonistic effect of the recombinant syntaxin-4 fragment prepared in the previous study³². As was the case in mammary epithelial cells, the recombinant protein of the SNARE domain (F3), but not of the helix c (F2) gave effect on ES cell morphology; ES cells formed more densely packed colonies, indicative of restoration of the stemness (Fig. 2a). Intriguingly, a fragment of the N-terminal domain of syntaxin-4 (F1) also showed the effect similar to F3 (Fig. 2a), and this fragment clearly reduced the expression of a downstream element of cell surface syntaxin-4 in ES cells (see below, and Supplementary Fig. S2), indicating a critical role of the membrane translocation of syntaxin-4 in ES cell behaviors. To define the role of membrane-tethered extracellular syntaxin-4, we generated ES cells with inducible expression of cell surface syntaxin-4 (STstx4) using a PiggyBac transposon inducible expression system^{33,34}. The transposon carried a cDNA encoding syntaxin-4 connected to cDNAs for a IL-2 signal peptide and T7-tag for extracellular localization and effective detection, respectively²⁷. Cells expressed T7-tagged syntaxin-4 at the cell surface upon treatment with doxycycline (Dox) (Fig. 2b). In response to inducible expression of cell surface syntaxin-4, these cells lost their cell–cell adhesive property and showed an altered morphology, exhibiting active filopodial protrusions, after a few days, even in the presence of LIF (Fig. 2c). Such cell behaviors are indicative of EMT, which reportedly precedes cyto-differentiation in ES cells^{11,12}. Parental ES cells without the syntaxin-4 transgene did not show similar morphological changes upon treatment with Dox (Fig. 2c). We found that ES cells with extracellular syntaxin-4 downregulated E-cadherin, a major mediator of epithelial cell–cell adhesion; however, its mRNA level was unchanged (Fig. 2d). Instead, these cells expressed P-cadherin, which has been shown to temporally increase in several invasive tumors to promote cellular mobility¹⁹ (Fig. 2d), implying that an E- to P-cadherin switch might execute signals propagated by syntaxin-4. It is noteworthy that the expression of *Snail* and *Slug*, canonical transcription factors involved in tumorigenic transformation, was not increased, while the fibroblastic marker vimentin was apparently downregulated (Fig. 2e). However, these cells upregulated mesodermal markers including *brachyury*, a critical T-box transcription factor involved in gastrulation/mesodermal differentiation, α -smooth muscle actin, and *myosin heavy chain* (Fig. 2f). The stemness marker *nanog* was downregulated, whereas the *oct3/4* level remained unchanged (Fig. 2f). We could exclude the possibility that the EMT-like cell behaviors were instructed as a consequence of the artificial gene manipulation; the phenotypical

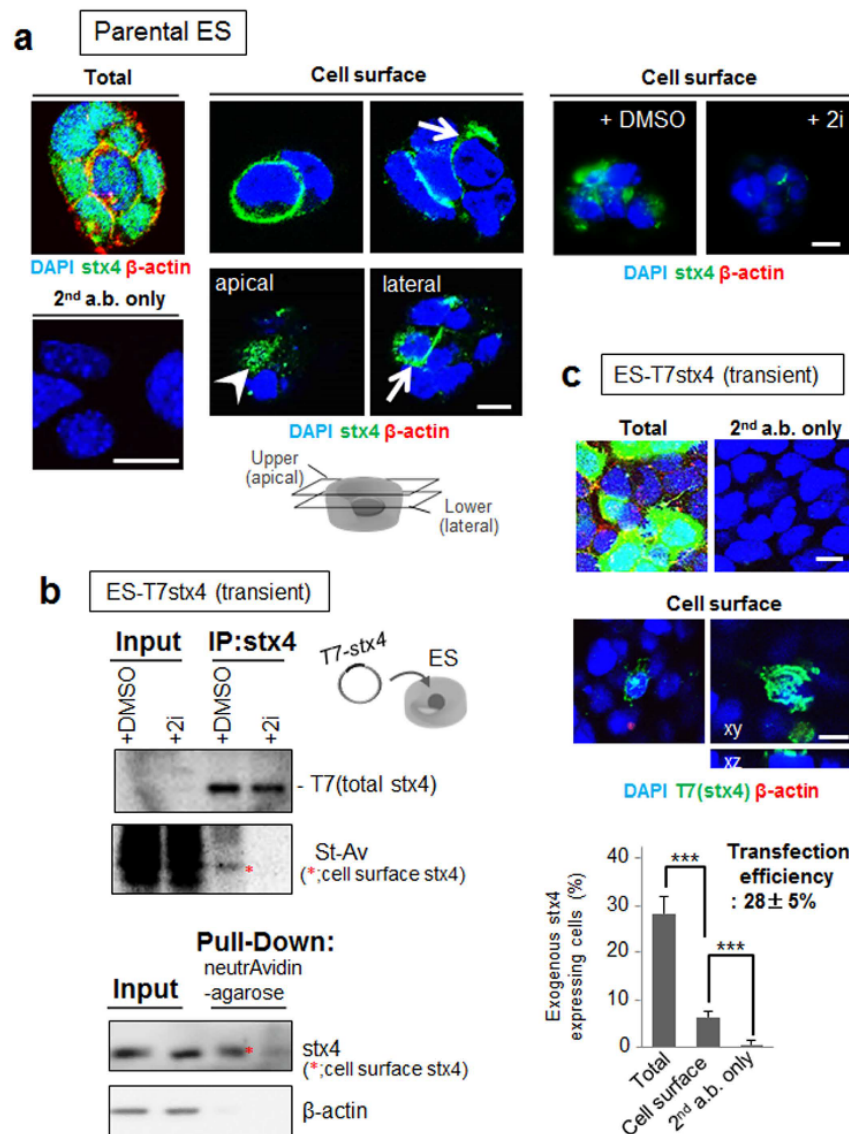


Figure 1. Spontaneous expression of syntaxin-4 at the surface of ES cells. (a), Endogenous syntaxin-4 (stx4; green) was detected with anti-syntaxin-4 antibodies in ES cells before (Cell surface) and after membrane permeabilization (Total). The cells were precultured in the presence (+ 2i) or absence (− 2i) of GSK3β/MEK1/2 inhibitors for two days. As an internal control, cytoplasmic β-actin was simultaneously detected (red). Left lower column, cells were stained only with secondary antibodies (2nd a.b.). All cells abundantly express β-actin and syntaxin-4 (left). Whereas a small population of the cells cultured in the absence of 2i display cell surface syntaxin-4 at the lateral (arrows) and apical (arrowhead) membrane, cells treated with 2i apparently decrease the extrusion of syntaxin-4 at the cell surface (right images). DMSO alone was used as a control (right images). Cell nuclei were counterstained with DAPI. Bars, 10 μm. (b), ES cells were transfected with syntaxin-4 tagged only with T7 peptide (T7stx4) and surface expression of exogenous syntaxin-4 in cells cultured with (− 2i) or without (+DMSO) 2i for two days was analyzed. Upper panel, cell surface proteins were labeled with NHS-sulfo-biotin, and the cell lysate (Input) or immunoprecipitates with anti-syntaxin-4 antibodies (IP:stx4) was analyzed with HRP-labeled anti-T7 antibody (T7) or HRP-labeled streptavidin (St-Av). Lower panel, biotinylated cell surface proteins in the cell lysate (Input) or those retrieved with neutrAvidin-beads (Pull-Down) were analyzed with antibodies against syntaxin-4 or cytoplasmic β-actin. Cropped areas from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. Treatment with 2i clearly decreases the cell surface expression of T7 tagged-syntaxin-4 (*). (c), ES cells were transfected with T7 tagged syntaxin-4 (T7stx4), and exogenous syntaxin-4 was labeled with anti-T7 tag antibodies (green) after 24 h. As an internal control, cytoplasmic β-actin was simultaneously stained (red). Upper images, anti-T7 tag antibody clearly detects the syntaxin-4 transgene product, but not β-actin, at the cell surface. Bars, 10 μm. Lower panel, the ratio of cells exhibiting syntaxin-4 at the cell surface in transfected cells. Approximately 20% of T7stx4-expressing cells (transfection efficiency, 28 ± 5%) extrudes T7stx4 at the cell surface. N = 18, ****p* < 0.001.

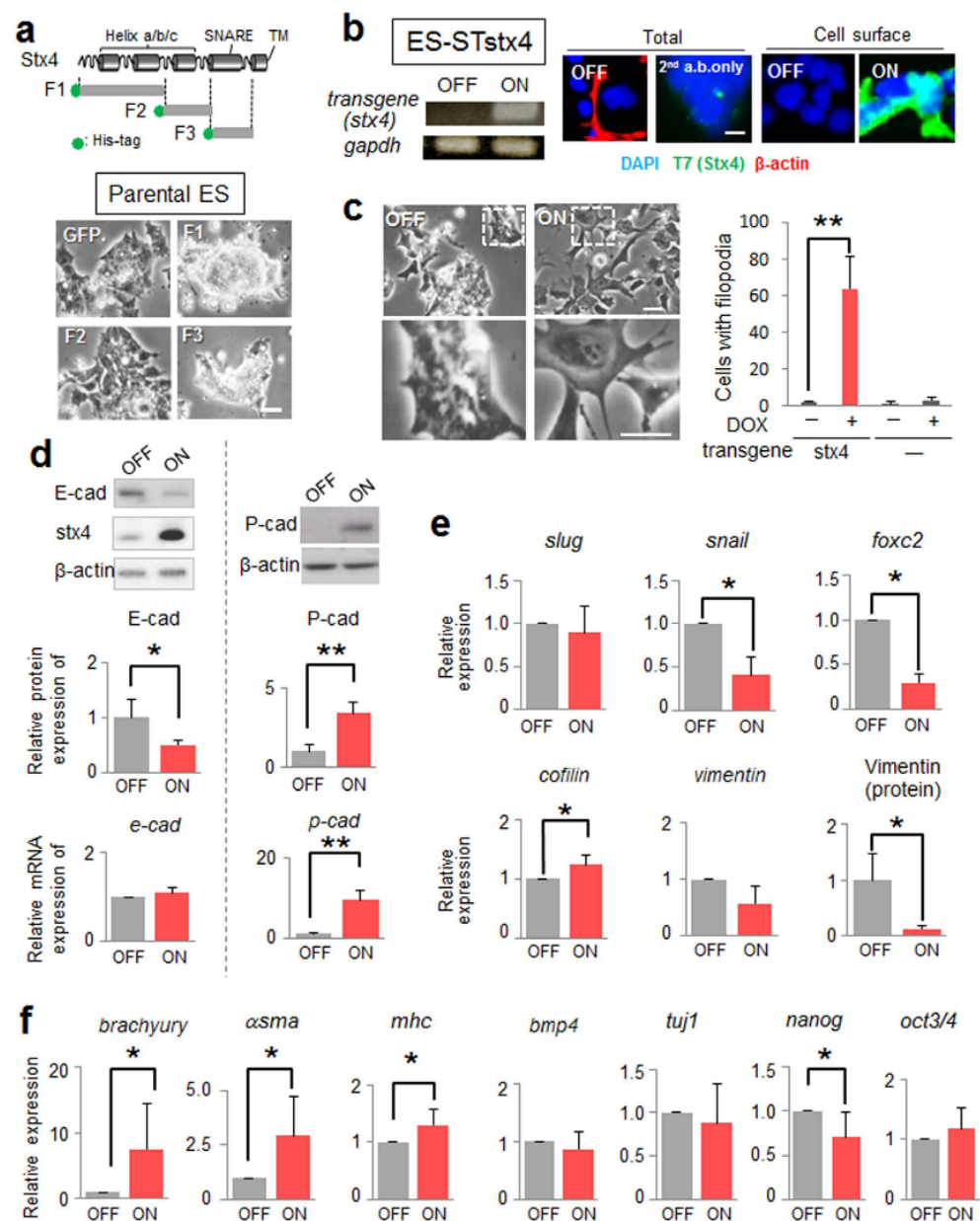


Figure 2. Effect of cell surface expression of syntaxin-4 on ES cell behavior. (a), Upper, schematic diagram of syntaxin-4 and 6X histidine-tagged recombinant fragments F1 (Met1–Glu110), F2 (Ala111–Arg197), and F3 (Gln198–Lys272). F1 contains N-terminal helices a and b, F2 contains helix c and F3 contains the SNARE domain. Lower, phase-contrast images of ES cells incubated with recombinant F1, F2, F3 or GFP control for three days. Bar, 20 μ m. (b), The inducible expression of exogenous syntaxin-4 in ES-STstx4 was analyzed by RT-PCR (left) and immunocytochemistry using antibodies against β -actin and the T7 tag (right). Bar, 10 μ m. (c), Left panels, appreciable phenotypic changes are induced by the cell surface expression of syntaxin-4 (ON) for 48 h. Lower, large images of upper insets. Bars, 20 μ m. Right, Quantification of cells with active pseudopodial protrusions. N = 4, ** $p < 0.01$. (d), Cells were analyzed for the expression of E-cadherin (E-cad) or P-cadherin (P-cad) at the protein and mRNA level. The representative blots (upper panels) and the quantification of the expression relative to that of β -actin (middle and lower panels) are shown. For E-cadherin, N = 4, * $p < 0.05$. For P-cadherin, N = 3, ** $p < 0.01$. For upper panels, cropped areas from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. (e), The canonical EMT marker *slug* is unchanged while the other markers *snail* and *foxc2* are downregulated. The cytoskeletal component vimentin is decreased, whereas the regulator of actin dynamics *cofilin* is significantly increased, albeit to a lesser extent. N = 4, * $p < 0.05$. (f), Cell surface expression of syntaxin-4 leads to a clear upregulation of *brachyury*, α -smooth muscle actin (α sma), and myosin heavy chain (*mhc*), while the expression of *bmp4* and *tuj1* is unchanged. N = 3, * $p < 0.05$. The stem cell marker *nanog* is downregulated, whereas the marker *oct3/4* remains unchanged. N = 4, * $p < 0.05$.

features induced by cell surface expression of syntaxin-4 were clearly receded when the antagonistic fragment of syntaxin-4 (F1) was present in the medium (Supplementary Fig. S2).

Identification of other downstream mediators of cell surface syntaxin-4. Next, we comprehensively analyzed factors downstream of cell surface syntaxin-4 that could mediate morphogenic and/or differentiation signals. Among the genes whose transcripts were up- or downregulated in ES-STtx4 cells, we selected 157 genes with LogFC absolute values ≥ 2 , and q-values < 0.01 (Fig. 3a, highlighted in red); this subset contained 19 genes whose expression was also changed in parental ES cells upon Dox treatment. Among thus selected 138 genes, 119 genes could be classified into several categories, using the PANTHER-GO-Slim system (Fig. 3b and Supplementary Table S1). In addition to the dramatic upregulation of *p-cadherin*, we detected marked downregulation of all members of the *zscan4* family (Fig. 3a,c), transient expression of which reportedly plays key roles in genomic stability, which is important for restoring ES cell pluripotency²¹. Upon siRNA-mediated silencing of the *Zscan4* genes, *p-cadherin* expression was decreased in parental ES cells, albeit to a lesser extent than upon overexpression of syntaxin-4 (Fig. 2d), suggesting that these genes partly mediate the syntaxin-4 signals (Fig. 3d). These *Zscan4* genes are known to be regulated by the PI3K/Akt pathway²³; we found a significant reduction in Akt phosphorylation upon stimulation with syntaxin-4 (Fig. 3e). Notably, LY294002, an inhibitor of the PI3K/Akt pathway, suppressed the expression of *zscan4* transcription and promoted that of *p-cadherin* in parental ES cells (Fig. 3f). However, this reagent showed significant toxicity and had little effect on the expression of *brachyury* (Fig. 3f). These results suggested that syntaxin-4 extruded at the cell surface affects the PI3K/Akt signaling cascade to elicit cell responses, in which *Zscan4* genes play an important role, even in the presence of LIF.

Inhibition of GSK3 β /MEK1/2 signals cannot completely abrogate functions of forcibly expressed cell surface syntaxin-4. Similar to the antagonistic peptide of syntaxin-4, we found that 21 apparently blocked the morphological changes induced by forcible expression of cell surface syntaxin-4 (Fig. 4a). However, syntaxin-4-induced changes in *p-cadherin*, *zscan4*, and *brachyury* expression were not inhibited (Fig. 4b). These results suggested that whereas inhibitors of GSK3 β /MEK1/2 blocked extracellular extrusion of endogenous syntaxin-4 (Fig. 1b), they were not able to abrogate differentiation initiation triggered by forcibly expressed cell surface syntaxin-4.

Extracellular syntaxin-4 leads to an E- to P-cadherin switch and morphological changes in F9 cells. To define the role of extruded syntaxin-4 in ES cell behavior, we used the simpler, stable embryonic carcinoma (EC) F9 stem cell system, in which ES cell-specific regulators of differentiation, including a set of *Zscan4* proteins, are undetectable (Supplementary Fig. S3). The F9 cell line expresses E-cadherin and forms compact colonies similar to ES cells, though these cells have lost their potential to differentiate into mesodermal cell lineages. F9 cells possessing the syntaxin-4 transgene (F9-STtx4) showed morphological responses similar to those of ES cells upon expression of cell surface syntaxin-4. Specifically, they lost cell-cell adhesiveness and showed a dramatically changed cell morphology, with active filopodial protrusions after a few days (Fig. 5a,b). However, significant changes in the expression of various differentiation markers, including those for canonical EMT (*snail*, *slug*, and *zeb1*), endodermal differentiation (*gata4* and *afp*), and fibroblastic cell types (*vimentin*, *cofilin*, α -smooth muscle actin and *myosin heavy chain*) were not evident in this short period (Fig. 5c). We found that the E- to P-cadherin switch, accompanied by inactivation of Akt signaling, was induced by cell surface expression of syntaxin-4 in F9 cells, as was the case in ES cells (Fig. 5d,e).

E- to P-cadherin switch as a key element to mediate signals from syntaxin-4. To examine the association between the E- to P-cadherin switch and morphological changes, parental F9 cells were transfected with a P-cadherin transgene and/or treated with an anti-E-cadherin blocking antibody ECCD1. We found that cells over-expressing P-cadherin exhibited active pseudopodium formation, similar to that observed in cells stimulated with extracellular syntaxin-4, which was substantially blocked by anti-P-cadherin antibody PCD1, confirming the causal role of P-cadherin in the morphological alternation (Fig. 6a). On the other hand, cell-cell adhesion remained almost intact in cells with and without forcible expression of P-cadherin (Fig. 6a). In contrast, treatment with ECCD1 led to cellular dissociation without morphological changes (Fig. 6b), as reported previously³⁵. We found that simultaneous over-expression of P-cadherin and functional inhibition of E-cadherin resulted in a phenotype quite similar to that observed with cell surface syntaxin-4 expression, revealing that the E- to P-cadherin switch mediates morphological changes associated with extracellular syntaxin-4 (Fig. 6c). However, we could not exclude the possibility that the decline in E-cadherin expression was merely due to syntaxin-4-induced changes to the cellular context since the expression of E-cadherin was apparently altered solely by modification of the substrate adhesive property of F9 cells; cells adherent to the substrate (using poly-L-lysine coat) showed dramatically decreased *E-cadherin* expression as compared to floating cells on petri-dishes (Fig. 6d). We could not assess the impact on differentiation in F9 cells as they do not readily differentiate into mesodermal lineages³⁶. In addition, these cells succumb to apoptosis after long-term treatment with Dox. However, with sustained expression of cell surface syntaxin-4 using another expression construct²⁷, F9 cells upregulated *gata4*, which is a transcription factor that acts as an endodermal differentiation cue in this cell type (Fig. 6e). In these cells, the levels of *cofilin*, a molecular regulator for actin dynamics³⁷, and *vimentin*, encoding an intermediate filament in fibroblasts³⁸, were also increased (Fig. 6e), suggesting that long-term signals propagated by extracellular syntaxin-4 affect differentiation even in non-mesodermal lineages.

Extracellular syntaxin-4 induces mesodermal differentiation in P19CL6 cells. Finally, we tested the effects of cell surface expression of syntaxin-4 in another EC cell line, P19CL6, which retains the intrinsic potential to differentiate into mesodermal lineages³⁹ (Fig. 7a). Upon induction of syntaxin-4, P19CL6 cells elicited similar morphogenetic responses and displayed a flattened fibroblastic morphology (Fig. 7b). Although they

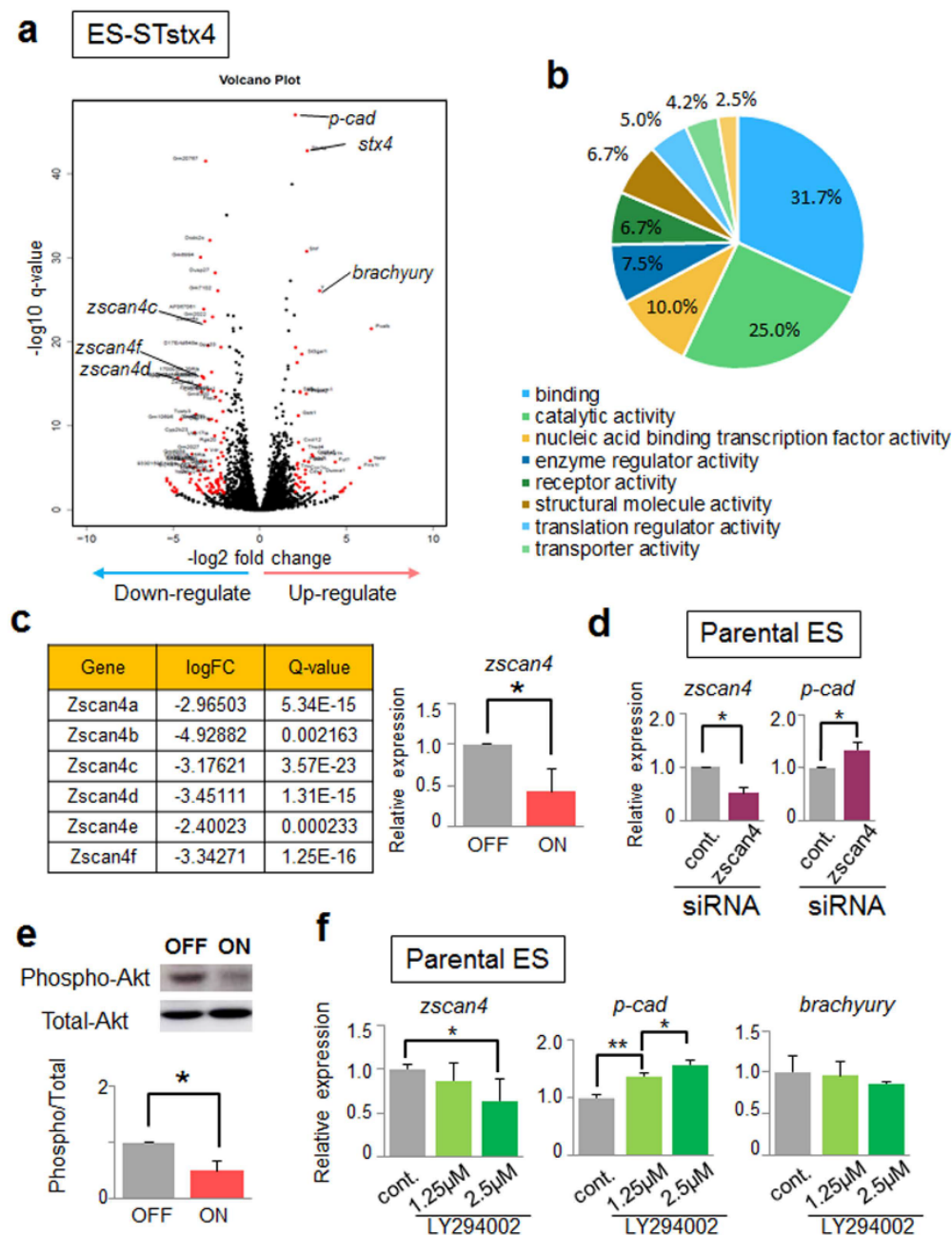


Figure 3. Comprehensive analysis of elements downstream of cell surface syntaxin-4. (a), Volcano plot showing DE genes in ES-STstx4 cells. DE genes that were markedly up- and downregulated in syntaxin-4-ON samples with an absolute LogFC value ≥ 2 and a q-value < 0.01 are highlighted in red (157 genes). (b), Pie chart of molecular functions of up/downregulated genes. (c), A striking reduction in *zscan4* by extracellular syntaxin-4 is observed. Left, list of LogFC and Q-values for all Zscan4 members. Right, qRT-PCR analysis of expression of cognate *zscan4* in cells with (ON) and without (OFF) cell surface syntaxin-4. The primer pair (Supplementary Table S2) can recognize *zscan4a*, *b*, *c*, *d*, and *f*. $N = 3$, $*p < 0.05$. (d), *p-cadherin* expression is significantly suppressed by siRNA-mediated knockdown of Zscan4 genes in parental ES cells. $N = 4$, $*p < 0.05$. (e) Phosphorylation of Akt in ES-STstx4 cells is reduced in cells with syntaxin-4 signaling (ON). $N = 3$, $*p < 0.05$. For upper panels, cropped areas from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. (f), LY294002, an inhibitor of the PI3K/Akt signaling pathway, appears to upregulate *p-cadherin* and downregulate *zscan4s* in parental ES cells as observed in syntaxin-4-expressing ES cells. By contrast, the expression of *brachyury* is not affected. $N = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

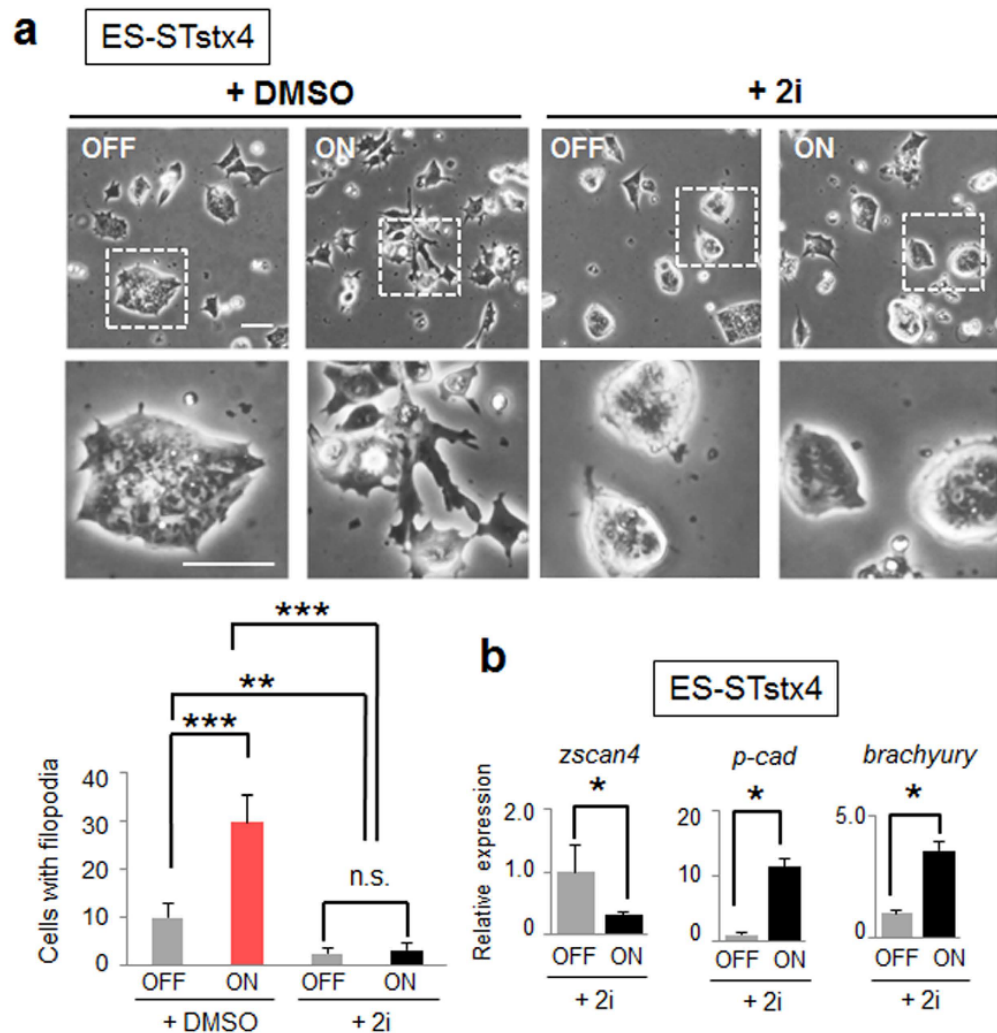


Figure 4. Inactivation of GSK3 β /MEK1/2 signaling is not sufficient to block the effects of forcibly expressed cell surface syntaxin-4. **(a)**, Morphological changes by cell surface syntaxin-4 (ON) are apparently inhibited by PD0325901 and CHIR99021 (2i), inhibitors of GSK3 β and MEK1/2, respectively. Bars, 50 μ m. The lower photographs represent enlarged images of the insets of the upper images. Lower graph, quantification of cells with filopodia. N = 3, ** p < 0.01, *** p < 0.001, n.s., not significant. **(b)**, Syntaxin-4-triggered changes in the expression of *p-cadherin*, *zscan4*, and *brachyury* are not affected by 2i. N = 3, * p < 0.05.

do not express detectable E-cadherin, cell surface syntaxin-4 led to the marked upregulation of P-cadherin also in this cell type (Fig. 7c). Whereas the mesodermal markers α -smooth muscle actin and *brachyury* were upregulated, the neuronal marker *tuj1* and cardiac marker *gata4* were unchanged (Fig. 7d,e). When P-cadherin was forcibly expressed, parental P19CL6 cells exhibited a morphology similar to that seen with cell surface syntaxin-4, whereas differentiation markers remained unchanged (Fig. 7f). It is noteworthy that exogenous P-cadherin did not accumulate at the cell–cell contact sites in both F9 and P19CL6 cells (Figs 6a and 7f).

Taken together, syntaxin-4, which is spontaneously extruded at the cell surface in response to the removal of stemness reagents 2i might play a critical role in the abrogation of ground-state pluripotency in ES cells, through inactivation of the PI3K/Akt signaling, induction of an E- to P-cadherin switch, and downregulation of several stemness factors including the *Zscan4* family (Fig. 8).

Discussion

Here, we provide evidence that syntaxin-4 spontaneously translocates across the cell membrane to execute its latent extracellular functions, including morphological changes and the onset of differentiation in ES cells; this leads to instability in ES cell stemness. As this effect does not require additional differentiation stimuli and is achieved even in the presence of LIF, the molecular mechanisms of syntaxin-4 membrane translocation are unclear at present. However, given that 2i inhibited cell surface expression of syntaxin-4, upstream extracellular elements of GSK3 β or MEK1/2 might be involved in the extracellular extrusion of syntaxin-4. Alternatively,

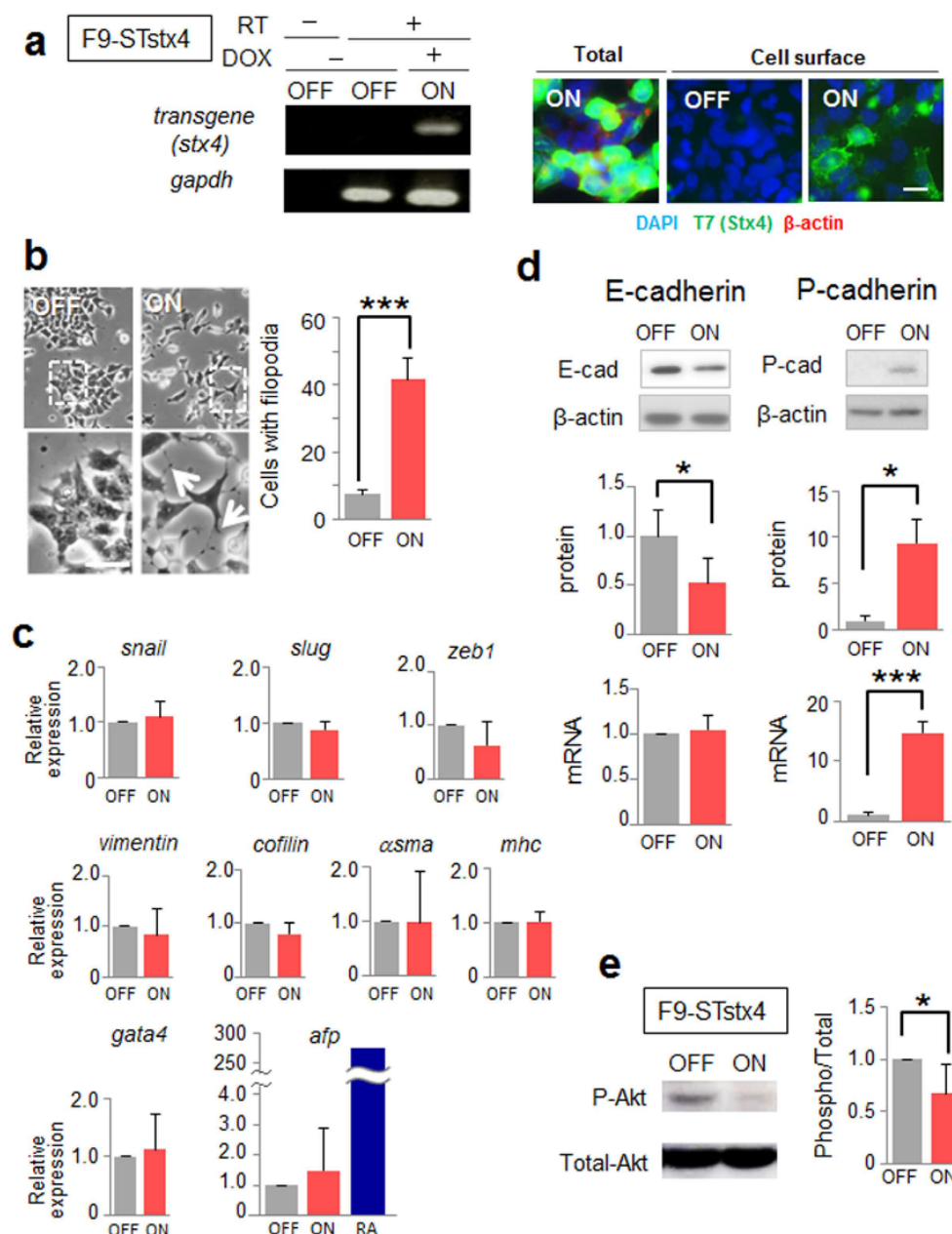


Figure 5. The effect of extracellular syntaxin-4 on F9 cell behaviors. (a), Analyses of inducible expression of exogenous syntaxin-4 in F9-STstx4 with qRT-PCR (left) and immunocytochemistry (right) after 72-h induction (ON). RT⁻, performed without reverse transcription. Bar, 10 μ m. (b), Left images, appreciable phenotypic changes are induced by the cell surface expression of syntaxin-4 (ON) for 48 h. Lower images represent enlarged images of the upper insets. Bar, 20 μ m. Right, quantification of cells with pseudopodial protrusions. N = 4, *** $p < 0.001$. Upon cell surface expression of syntaxin-4 (ON), the cells dissociate and display active filopodia. (c), The expression of all of canonical EMT markers *snail*, *slug*, and *zeb1*, cytoskeletal components *vimentin* and *cofilin*, mesodermal markers α -smooth muscle actin (*α sma*) and myosin heavy chain (*mhc*), and endodermal markers *gata4* and α -fetoprotein (*afp*) is unaffected by 48-h stimulation with extracellular syntaxin-4. The expression of all of the differentiation markers is not significantly different between “ON” and “OFF” samples. N = 4, * $p < 0.05$. For *afp*, upregulation by retinoic acid (RA; a positive control) is included. (d), Cells were analyzed for the expression of E-cadherin (E-cad) or P-cadherin (P-cad) at the protein and mRNA level. The representative blots (upper panels) and the quantitation of the amounts relative to that of β -actin (middle and lower panels) are shown. E-cadherin protein is significantly downregulated upon the induction of cell surface syntaxin-4, whereas mRNA is unaffected. N = 4, * $p < 0.05$. For upper panels, cropped areas from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. (e), Phosphorylation of Akt is reduced in F9 cells upon stimulation with syntaxin-4. N = 3, * $p < 0.05$.

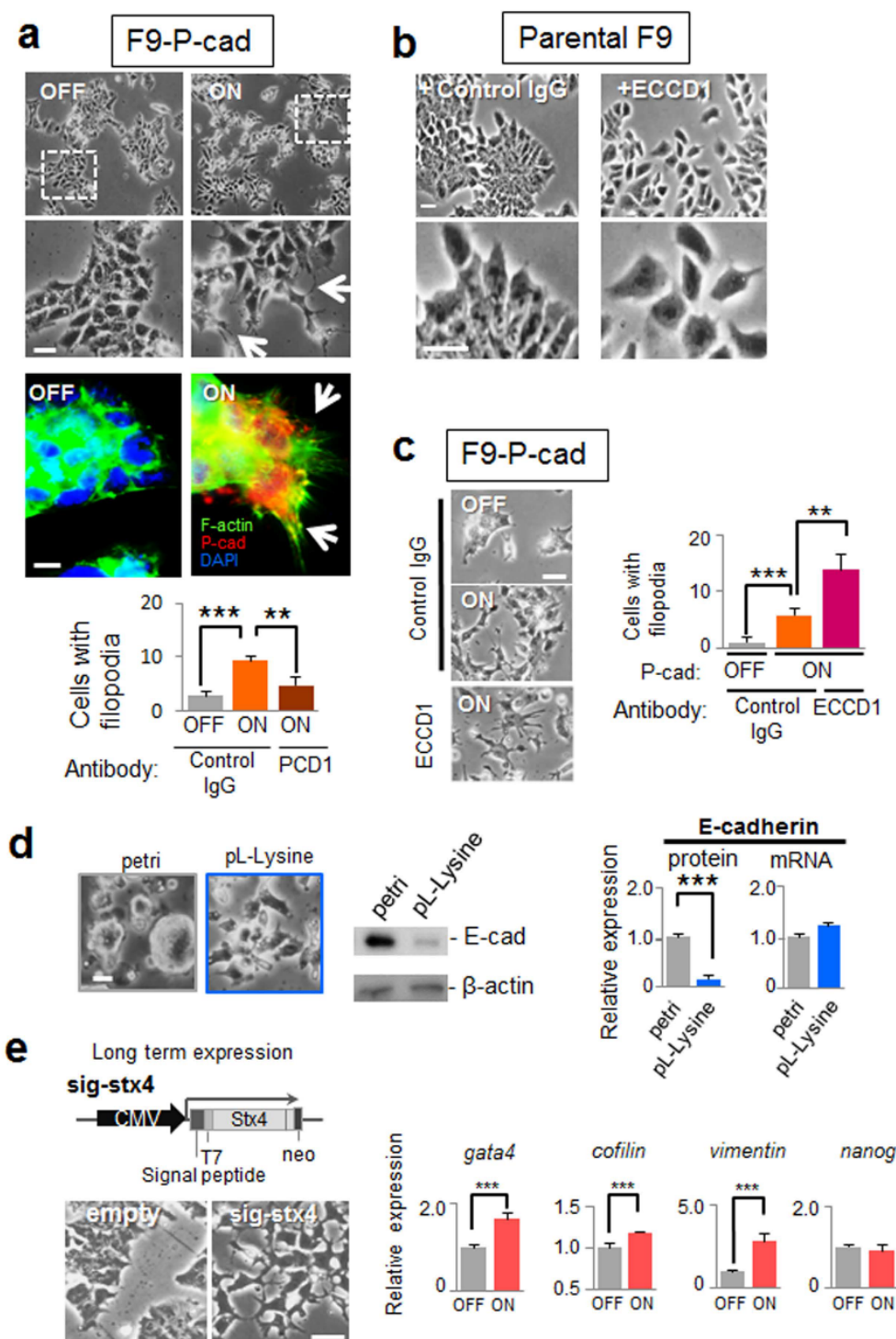


Figure 6. Effect of E- to P-cadherin switch on F9 cell morphology. (a), Upper panels, phase-contrast images of F9-P-cad cells with (ON) or without (OFF) expression of exogenous P-cadherin. Middle panels, P-cadherin (red) and F-actin (green) are visualized. Arrows, pseudopodial protrusions in cells with P-cadherin. Bars, 20 μ m. Lower panels, quantification of cells with filopodia. Expression of exogenous P-cadherin leads to the formation of active filopodia, which is substantially blocked by the addition of an anti-P-cadherin antibody PCD1 (50 μ g/ml). The number of active pseudopodia increases in P-cadherin-expressing cells. N = 4, ** p < 0.01, *** p < 0.001. (b), Effect of E-cadherin blocking antibody (ECCD1) on parental F9 cell behavior. Treatment with

ECDD1 causes the dissociation of cells without active pseudopodial protrusions. Bars, 20 μ m. (c), F9-P-cad cells at the periphery of the colony extend filopodia in response to P-cadherin expression (ON), and the number of cells with filopodia increases when cells are simultaneously dissociated by ECDD1. Left panels, phase-contrast images. Bar, 20 μ m. Right panel, quantification of cells with filopodia. $N = 4$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. (d), Substrate-adhesion affects E-cadherin expression at the protein level. Parental F9 cells adhering to and spreading on poly-L-lysine (PL-Lysine) show significantly decreased expression of E-cadherin (E-cad) protein, but not mRNA, compared to that of similar cells found in clusters on the Petri dish (petri). $N = 3$, $***p < 0.001$. For middle panels, cropped areas from the original blots (Supplementary Fig. S) are shown. (e), Phenotypic appearance and expression profile of several markers in F9 cells with sustained expression of cell surface syntaxin-4. Left upper panel, schematic diagram of the construct used for sustained expression of cell surface syntaxin-4²⁷. Lower panels, phase-contrast images of the cells with (sin-stx4) and without (empty) long-term stimulation with the transgene. Bar, 20 μ m. Right, the expression of *gata4*, *cofilin*, and *vimentin* is increased, whereas that of the stemness marker *nanog* is unchanged. $N = 4$, $***p < 0.001$.

recent studies have revealed that epimorphin (syntaxin-2), another plasmalemmal syntaxin, is extruded as a component of synaptotagmin and annexin II protein complexes in response to apoptotic signals⁴⁰. Thus, one could assume that the extracellular presentation of syntaxin-4 is a result of the cell competition in ES cell colonies, which spontaneously induces local apoptosis to eliminate unfit cells⁴¹. As 2i could prevent spontaneous differentiation in ES cells but not that by forcible expression of cell surface syntaxin-4, it is conceivable that one of the key roles of 2i might be to prevent membrane translocation of syntaxin-4.

Whereas ES cells treated with 2i succumbed to syntaxin-4-triggered differentiation, morphological changes induced by the syntaxin-4 signal were blocked. Considering that syntaxin-4 led to inactivation of Akt, which negatively regulates GSK3 β , a potent regulator of E-cadherin expression^{42,43}, GSK3 β might mediate syntaxin-4 signaling to induce the morphogenic effect but not differentiation. GSK3 β has been reported to play key roles in the perturbation of clonogenic activity in ES cells⁴⁴; however, activation of downstream elements equivalently depend on the phosphorylation and subcellular localization of this protein¹⁶. Thus, it is not surprising that the syntaxin-4 signaling pathway inactivates PI3K/Akt signaling, leading to the activation of GSK3 β for morphological changes, but not differentiation initiation.

An E- to P-cadherin switch was identified as a key element to mediate the morphologic function of syntaxin-4. Given that the expression of E-cadherin is strictly regulated by PI3K/Akt in ES cells⁴³, the downregulation of E-cadherin could be attributed to the syntaxin-4-induced dephosphorylation of PI3K/Akt. It is noteworthy that the inactivation of PI3K/Akt signaling by cell surface syntaxin-4 occurred even in the presence of LIF, suggesting that the effect of syntaxin-4 might be dominant over LIF-triggered PI3K/Akt activation. Moreover, as GSK3 β is a component of Wnt signaling, its subsequent activation may also affect the fate of β -catenin⁴⁵. Thus, the elimination of E-cadherin might be accompanied by changes in subcellular localization or stability of β -catenin, a potent transcriptional activator for P-cadherin⁴⁶. Transcriptome analyses did not detect the upregulation of other transcription factors that regulate P-cadherin such as p63 and C/EBP β ^{47,48}. All of the classical cadherins, including E-, P-, and N-cadherin, play central roles in intercellular adhesion systems^{49,50}; however, they exert different functions such as contact inhibition of locomotion via affecting the spatial distribution and activation of small GTPases^{51,52}. A recent report demonstrated the regulation of cell migration by Cdc42, which is highly dependent on P-cadherin, but not E-cadherin⁵³. In addition, P-cadherin fails to localize to the cell–cell contact sites and causes invasive cell behaviors in several aggressive cell types⁵⁴. This study detected P-cadherin localization to the cell membrane rather than to cell–cell contact sites, suggesting that the P-cadherin-dependent morphological changes involved a function other than that in intercellular adhesion. Alternatively, certain cell surface molecules that can associate with P-cadherin but not E-cadherin—for example, integrin $\alpha 6 \beta 4$ ¹⁸—could propagate signals for morphological changes.

In addition to morphological changes, the syntaxin-4-triggered inactivation of PI3K/Akt signaling is a plausible differentiation cue, as this signaling pathway reportedly mediates the upregulation of genes involved in self-renewal⁴³, retention of transcription factors for maintenance of stemness²³, and inhibition of Wnt/MAPK-induced differentiation signals in ES cells^{1,55}. However, ES cells failed to upregulate the differentiation marker *brachyury* in response to an Akt inhibitor, despite a significant downregulation of the stemness factor *zscan4*. Thus, whereas the activation of PI3K/Akt might be sufficient for maintenance of ES cell pluripotency⁵⁶, its specific inactivation might be necessary but insufficient for activation of the differentiation program. Presumably, additional signaling pathways that could cooperate with PI3K/Akt signals to mediate differentiation in ES cells are propagated by cell surface syntaxin-4.

An important and contentious point is the causal link between morphological changes and differentiation in pluripotent ES cells. Although morphological changes and onset of differentiation are usually induced concurrently, an engineered substrate using recombinant E-cadherin caused a flattened morphology without differentiation⁵⁷, and inhibition of GSK3 β /MEK1/2 (2i-treatment) with forcible cell surface expression of syntaxin-4 resulted in the onset of differentiation without morphological changes. On the other hand, syntaxin-4-triggered inactivation of PI3K/Akt signaling subsequently downregulated *zscan4* during differentiation and severely affected cadherin-mediated cell adhesion systems involved in cell morphology. Accordingly, one might assume that these phenomena could be studied independently if signals downstream of PI3K/Akt are of interest. However, cell surface syntaxin-4 rapidly elicited mesodermal differentiation in ES and P19CL6 cells, whereas its sustained stimulation ultimately led to endodermal differentiation in F9 cells that are unable to differentiate into mesodermal lineages. This indicates that syntaxin-4-triggered changes in cell shape could activate a differentiation

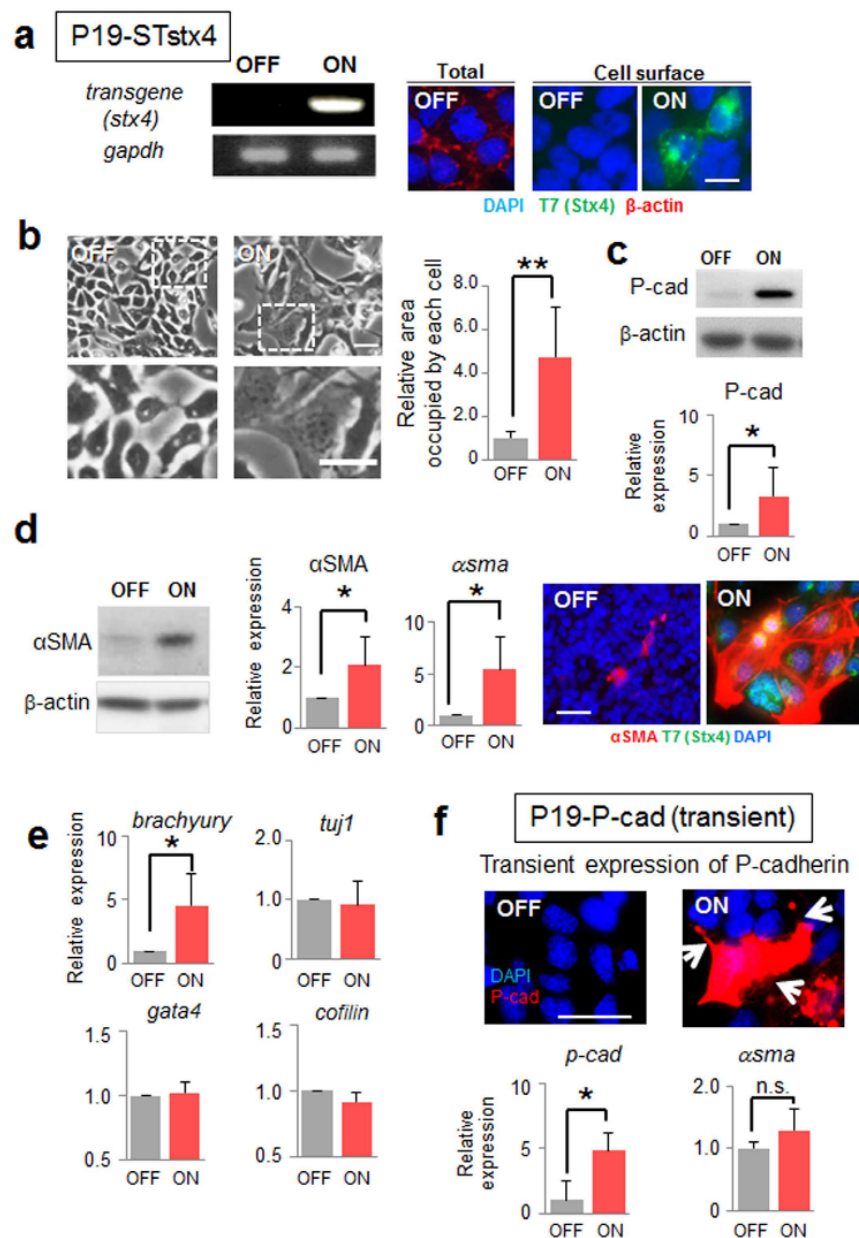


Figure 7. Effect of cell surface expression of syntaxin-4 on P19CL6 cell behavior. (a), The cell surface expression of syntaxin-4 transgene in P19-STstx4 was investigated with RT-PCR (left) and immunocytochemistry (right) after 72-h transgene induction. Bar, 10 μ m. (b), Left, cells displaying flattened morphology upon cell surface expression of syntaxin-4 (ON). Lower panels, enlarged images of insets in upper images. Bars, 20 μ m. Right panel, quantification of the relative area occupied by each cell. N = 10, $**p < 0.01$. (c), The expression of P-cadherin is increased also in this cell type in response to the expression of syntaxin-4 (upper). The representative blots cropped from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. Lower panel, the amount of P-cadherin relative to that of β -actin. N = 3, $*p < 0.05$. (d), The mesodermal marker α SMA is upregulated by cell surface syntaxin-4 (ON). Left, representative blots cropped from the original blots (Supplementary Fig. S1) are shown. Middle, quantification of the expression of α SMA protein and mRNA relative to those of β -actin. N = 4, $*p < 0.05$. Right, expression of α SMA (red) and T7-syntaxin-4 (green) in cells with (ON) and without (OFF) cell surface syntaxin-4. Bar, 20 μ m. (e), Expression of several differentiation markers, including the mesodermal marker *brachyury*, the ectodermal marker *tuj1*, the endodermal marker *gata4*, and the actin dynamics regulator *cofilin*. N = 4 (for *cofilin*, N = 3), $*p < 0.05$. P19CL6 cells with a flattened morphology resulting from cell surface syntaxin-4 differentiate into mesodermal lineages. (f), Transient expression of exogenous P-cadherin (red in upper images) in P19CL6 cells leads to flattened cell morphology with active filopodia (arrows), whereas the differentiation marker *alpha*sma is unchanged (lower). Bar, 20 μ m. N = 3, $*p < 0.05$.

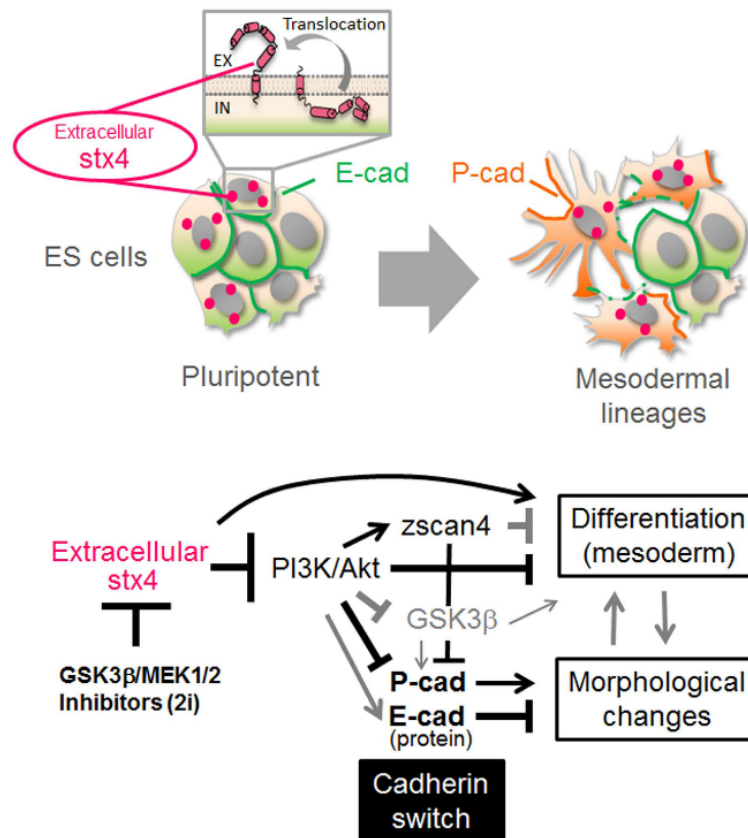


Figure 8. A plausible mechanism of the spontaneous loss of stemness in ES cells. Upper panel, a subpopulation of ES cells growing in a tightly packed colony that spontaneously extrude syntaxin-4, a membrane-tethered t-SNARE protein, which locally executes its latent extracellular functions. Lower panel, cell surface syntaxin-4 expressed in response to removal of 2i inactivates PI3K/Akt signaling, leading to an E- to P-cadherin switch for morphological changes and downregulation of stemness factors, such as cognate Zscan4 proteins, for the onset of differentiation. GSK3 β , a negatively regulated target of PI3K/Akt, might be involved in the morphological changes. Bold lines, revealed by this study. Gray lines, suggested by previous studies.

program for non-mesodermal lineages, albeit to a lesser extent. Thus, it is important to account for the fact that morphological changes and differentiation might have cause-effect relationships.

Although this study underlined the pernicious effect of syntaxin-4 signaling on the maintenance of ES cell stemness, the biological relevance to embryogenesis *in vivo* remains unknown. Disruption of *syntaxin-4* reportedly resulted in early embryonic lethality; however, this could be due to the functional ablation of cytoplasmic syntaxin-4 given its important role as a t-SNARE protein in intravesicular fusion⁵⁸. We surmise that signals from cell surface syntaxin-4 might exert their functions at early developmental stages in embryogenesis, since EMT-like cell behavior accompanied by a cadherin switch has been proposed to be essential for gastrulation or neural crest delamination^{52,59,60}. Although in preliminary experiments we detected extracellular syntaxin-4 in early-stage mouse embryos, its localization was not restricted to cells of the primitive streak or other specific regions. Moreover, attempts were made to generate transgenic mice expressing signal peptide- and T7-tagged syntaxin-4; however, no pups expressing the transgene product have been obtained to date. Whereas one pup from 62 manipulated-fertilized eggs was found to possess the transgene, T7-tagged syntaxin4 was not expressed, implying that extracellular syntaxin-4 severely disturbed normal embryogenesis. Careful analyses of successive developmental processes in fertilized eggs are necessary to clarify this issue.

Methods

Cell lines. The mouse ES cell line E14-Tg2a and that expressing the syntaxin-4 transgene (ES-STstx4) were cultured in GMEM (Wako) containing 10% FCS (Invitrogen), 1 mM glutamine (Wako), non-essential amino acid (Wako), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Wako), 1 mM pyruvate (Sigma) and LIF (Wako). To maintain stemness, inhibitors of GSK3 β /MEK1/2 (2i) (CHIR99021/PD0325901; Invitrogen) dissolved in DMSO were added to the medium at a concentration of 2 μ M. The mouse EC cell line F9 (ATCC CRL-1720) and its derivatives (F9-STstx4 and F9-Pcadherin) were maintained in DMEM/HamF12 medium (Wako) supplemented with 10% FCS. The P19CL6 cell line (RIKEN BRL RCB2318) and its derivative (P19-STstx4) were cultured in Alpha modified MEM

(α MEM; Wako) with 5% FCS. To induce transgene expression, ES-STstx4, F9-STstx4, F9-Pcadherin, or P19-STstx4 was treated with 5 μ g/ml Dox (Sigma-Aldrich) for two or three days. In some cultures, an inhibitor of PI3K (LY294002; Wako) was dissolved in DMSO and added at a concentration of 1.25 or 2.5 μ M.

Expression constructs and transfection. To construct the plasmid for tetracycline (Tet)/Dox-inducible expression of syntaxin-4 or P-cadherin, cDNA encoding syntaxin-4 with an N-terminal fusion of the IL2 signal peptide and T7 peptide tag⁶¹ or cDNA encoding P-cadherin (a generous gift from Dr. Takeichi) was subcloned into the PiggyBac-TET transposon plasmid^{34,62,63}. The plasmid harbored cDNA of the transgene and the neomycin-resistance gene connected by the IRES sequence. To generate cells with Dox/Tet-dependent expression of the transgene, one of these plasmids was transfected into cells, together with PB-CARtTA Adv and pCAG-Phase³³, using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). To avoid a possible clonal artifact, a mixture of the clones that express the transgene product in response to Dox treatment (5 μ g/ml) was used for experiments. These transfected cells included ES-STstx4 (ES cells with signal peptide/T7 tag-connected syntaxin-4), F9-STstx4 (F9 cells with signal peptide/T7 tag-connected syntaxin-4), F9-P-cad (F9 cells with P-cadherin), and P19-STstx4 (P19CL6 cells with signal peptide/T7 tag-connected syntaxin-4). To assess the ratio of cells that extrude syntaxin-4 at the cell surface, ES cells were transfected with an expression plasmid for T7-tagged syntaxin-4 (without a signal peptide, T7stx4)⁶¹ and stained with anti-T7 antibody before and after cell permeabilization.

Antibodies and immunocytochemistry. Primary antibodies against T7-tag (Novagen), α SMA (Sigma-Aldrich), β -actin (Sigma-Aldrich), Akt, and Akt phosphorylated at (Ser473) (CST Japan) were used in this study. Anti-E-cadherin monoclonal antibodies (ECCD1 for functional blocking and ECCD2 for immunodetection) and anti-P-cadherin monoclonal antibody PCD1 were generous gifts from Dr. Takeichi. Affinity-purified polyclonal antibodies against syntaxin-4 were prepared in a previous study⁶¹. HRP-, Alexa 488-, and Cy3-labeled secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich, Invitrogen and GE healthcare. To detect cell surface expression of endogenous syntaxin-4, non-permeabilized cells were stained simultaneously for syntaxin-4 and the negative control β -actin, as described previously⁶¹. In brief, living cells on chamber slides were incubated with a mixture of affinity-purified rabbit anti-syntaxin-4 antibody and mouse anti- β -actin monoclonal antibody. After washing twice with Tris-buffered saline (TBS) followed by fixation with methanol (having an initial temperature of -20°C) for 10 min, the cells were incubated with a mixture of Alexa488-labeled anti-rabbit IgG and Cy3-labeled anti-mouse IgG antibodies. For conventional immunocytochemistry, the cells were permeabilized with -20°C methanol for 15 min, and stained with primary and Alexa488- or Cy3-labeled secondary antibodies, as described above. For some samples, cells were permeabilized with 0.1% triton X-100 instead of methanol, and F-actin was stained directly with Alexa 488-phalloidin (Invitrogen). Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma). Stained cells were photographed with a confocal microscope system A1 (Nikon) or a fluorescence microscope AXIOSHOP (Zeiss) with a CCD camera VB-7010 (Keyence, Japan). To detect cell surface expression of transiently introduced T7-tagged syntaxin-4 (T7stx4) on a blot, cell surface proteins were labeled with NHS-biotin and lysed in buffer containing 1% Triton X-100 and 1% NP-40. The cell lysate was immunoprecipitated with anti-syntaxin-4 antibodies, and analyzed with HRP-labeled anti-T7 antibody (Novagen) or streptavidin (Sigma-Aldrich), as described previously⁴⁰. Concurrently, biotin-labeled extracellular proteins in the cell lysate were retrieved with neutrAvidin-beads (Thermo Scientific) and analyzed with antibodies against syntaxin-4 or cytoplasmic β -actin.

Reverse transcription quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Total RNA was extracted from ES-STstx4, F9-STstx4, F9-P-cad, and P19-STstx4 cells cultured with or without doxycycline was extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen) and reverse-transcribed with an RNA-PCR kit (Takara). To assess transgene expression, cDNA was amplified using Quick tag (Toyobo) and primer pairs for *T7-syntaxin-4* (5'-GGG GCG GCC GCA TGG CTA GCA TGA CTG GTG GAC-3' and 5'-TTT TAG CTG CGC CCG GAC C-3') and *gapdh* (5'-GGATTGGCCGTATTGG-3' and 5'-TCATGGATGACCTTGGC-3'). qRT-PCR was then carried out using FastStart Essential DNA Green Master on a LightCycler Nano system (Roche) according to the manufacturer's protocol (PCR; 45 cycles). The primer pairs used in this study are listed in Supplementary Table S2. As the expression of both *gapdh* and β -actin was not changed in cells with and without exogenous syntaxin-4 (Supplementary Fig. S4), the mRNA expression of differentiation markers was normalized to that of β -actin. qRT-PCR was conducted in triplicate.

Recombinant proteins. Recombinant forms of syntaxin-4 fragment F1 (Met1~Glu110), F2 (Ala111~Arg197), and GFP were generated as 6 X histidine-tagged forms and purified as described previously³². These proteins were dialyzed against PBS, filtrated, and added to cultures at a concentration of 50 μ g/ml for three days.

Analysis of cell behaviors upon cell surface expression of syntaxin-4. The morphology of cells cultured in the presence and absence of Dox for two (F9-STstx4 and F9-P-cad) or three (ES-STstx4 and P19-STstx4) days was analyzed. The number of cells extending more than three pseudopodia (10 μ m or longer) was counted in ES-STstx4, F9-STstx4 or F9-P-cad cells. The area occupied by a cell was calculated in P19-STstx4 cells using the ImageJ software⁶⁴.

RNA-seq analysis. To identify differentially expressed (DE) genes in ES cells upon stimulation with extracellular syntaxin-4, comparative transcriptome analyses were performed at the Phylinformatics Unit of RIKEN CLST. To exclude genes affected by Dox itself, cDNAs from ES-STstx4 and parent ES cells, with and without doxycycline for three days, were analyzed. The transcriptome analysis identified 138 DE genes with an absolute LogFC value ≥ 2 and a q-value < 0.01 . RNA-seq data sets are available at the Gene Expression Omnibus under accession number PRJDB4923.

RNA interference of Zscan4 genes. To suppress the expression of Zscan4 genes in ES cells, oligonucleotide siRNAs for which clear knockdown effects have been demonstrated²² were obtained from Nippon Gene (Tokyo, Japan) (Supplementary Fig. S5). The mixture of the siRNAs (20 nM in total) was transfected into parental ES cells in 12-well plate well using Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen). The expression of *zscan4* and *p-cadherin* was analyzed on day 3 by qRT-PCR. As a control, universal negative control NEGd/NEGAS labeled with Hilyte 488 (20 nM) (Nippon Gene) was used; the transfection efficiency was more than 70% as judged by the fluorescence.

Statistical analyses. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Data were analyzed by a Student's t-test or Mann–Whitney U-test, and a p-value of <0.05 was considered statistically significant.

References

- Marks, H. *et al.* The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* **149**, 590–604, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.026 (2012).
- 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, doi: 10.1038/nature08113 (2009).
- Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–1234, doi: 10.1038/nature06403 (2007).
- Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. & Terada, N. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 2534–2542, doi: 10.1634/stemcells.2007-0126 (2007).
- Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K. & Niwa, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development (Cambridge, England)* **135**, 909–918, doi: 10.1242/dev.017400 (2008).
- Canham, M. A., Sharov, A. A., Ko, M. S. & Brickman, J. M. Functional heterogeneity of embryonic stem cells revealed through translational amplification of an early endodermal transcript. *PLoS biology* **8**, e1000379, doi: 10.1371/journal.pbio.1000379 (2010).
- Masui, S. *et al.* Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC developmental biology* **8**, 45, doi: 10.1186/1471-213x-8-45 (2008).
- Huang, F. *et al.* miR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation of Hes-1. *BioMed research international* **2013**, 216286, doi: 10.1155/2013/216286 (2013).
- Indulekha, C. L. *et al.* Hes-1 regulates the excitatory fate of neural progenitors through modulation of Tlx3 (HOX11L2) expression. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **69**, 611–627, doi: 10.1007/s00018-011-0765-8 (2012).
- Ho, J. C., Ueda, J. & Shimizu, T. The impact of mechanical stress on stem cell properties: The link between cell shape and pluripotency. *Histology and histopathology* **31**, 41–50, doi: 10.14670/hh-11-665 (2016).
- Eastham, A. M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* **67**, 11254–11262, doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2253 (2007).
- Ullmann, U. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular human reproduction* **13**, 21–32, doi: 10.1093/molehr/gal091 (2007).
- Maeda, M., Johnson, K. R. & Wheelock, M. J. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* **118**, 873–887, doi: 10.1242/jcs.01634 (2005).
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. R. Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**, 727–735, doi: 10.1242/jcs.000455 (2008).
- ten Berge, D. *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nature cell biology* **13**, 1070–1075, doi: 10.1038/ncb2314 (2011).
- Bechard, M. & Dalton, S. Subcellular localization of glycogen synthase kinase 3 β controls embryonic stem cell self-renewal. *Molecular and cellular biology* **29**, 2092–2104, doi: 10.1128/mcb.01405-08 (2009).
- Bechard, M., Trost, R., Singh, A. M. & Dalton, S. Frat is a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-regulated determinant of glycogen synthase kinase 3 β subcellular localization in pluripotent cells. *Molecular and cellular biology* **32**, 288–296, doi: 10.1128/mcb.05372-11 (2012).
- Vieira, A. F. *et al.* P-cadherin signals through the laminin receptor $\alpha 6 \beta 4$ integrin to induce stem cell and invasive properties in basal-like breast cancer cells. *Oncotarget* **5**, 679–692, doi: 10.18632/oncotarget.1459 (2014).
- Vieira, A. F. & Paredes, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Molecular cancer* **14**, 178, doi: 10.1186/s12943-015-0448-4 (2015).
- Amano, T. *et al.* Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. *Nature communications* **4**, 1966, doi: 10.1038/ncomms2966 (2013).
- Zalzman, M. *et al.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* **464**, 858–863, doi: 10.1038/nature08882 (2010).
- Falco, G. *et al.* Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* **307**, 539–550, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.003 (2007).
- Storm, M. P. *et al.* Characterization of the phosphoinositide 3-kinase-dependent transcriptome in murine embryonic stem cells: identification of novel regulators of pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 764–775, doi: 10.1002/stem.3 (2009).
- Bennett, M. K. *et al.* The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* **74**, 863–873 (1993).
- Chen, Y. A. & Scheller, R. H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 98–106 (2001).
- Chen, C. S. *et al.* Homology with vesicle fusion mediator syntaxin-1a predicts determinants of epimorphin/syntaxin-2 function in mammary epithelial morphogenesis. *J Biol Chem* **284**, 6877–6884 (2009).
- Hagiwara, N., Kadono, N., Miyazaki, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties. *Cell Tissue Res* **354**, 581–591, doi: 10.1007/s00441-013-1680-0 (2013).
- Hirai, Y. *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **140**, 159–169, doi: 10.1083/jcb.140.1.159 (1998).
- Hirai, Y. *et al.* Epimorphin mediates mammary luminal morphogenesis through control of C/EBP β . *J Cell Biol* **153**, 785–794 (2001).
- Kadono, N., Hagiwara, N., Tagawa, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Is a Potent Cornification Regulator of Epidermal Keratinocytes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **21**, 77–86, doi: 10.2119/molmed.2014.00234 (2015).
- Radisky, D. C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y. & Bissell, M. J. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 228–234 (2009).
- Hirai, K. *et al.* Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Binds to Laminin and Syndecan-1 to Regulate Mammary Epithelial Morphogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. doi: 10.1002/jcb.25661 (2016).
- Okashita, N. *et al.* PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* **141**, 269–280, doi: 10.1242/dev.099622 (2014).

34. Wang, W. *et al.* Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9290–9295, doi: 10.1073/pnas.0801017105 (2008).
35. Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. & Takeichi, M. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* **101**, 19–27 (1984).
36. Lehtonen, E., Laasonen, A. & Tienari, J. Teratocarcinoma stem cells as a model for differentiation in the mouse embryo. *The International journal of developmental biology* **33**, 105–115 (1989).
37. Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 185–230, doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.185 (1999).
38. Hay, E. D. Extracellular matrix, cell skeletons, and embryonic development. *American journal of medical genetics* **34**, 14–29, doi: 10.1002/ajmg.1320340107 (1989).
39. Wen, J. *et al.* Proteomic analysis of cardiomyocytes differentiation in mouse embryonic carcinoma P19CL6 cells. *Journal of cellular biochemistry* **102**, 149–160, doi: 10.1002/jcb.21285 (2007).
40. Hirai, Y. *et al.* Non-classical export of epimorphin and its adhesion to α v-integrin in regulation of epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* **120**, 2032–2043 (2007).
41. Morgani, S. M. & Brickman, J. M. The molecular underpinnings of totipotency. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **369**, doi: 10.1098/rstb.2013.0549 (2014).
42. Cartwright, P. *et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development (Cambridge, England)* **132**, 885–896, doi: 10.1242/dev.01670 (2005).
43. Huang, T. S. *et al.* A Regulatory Network Involving beta-Catenin, e-Cadherin, PI3K/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **33**, 1419–1433, doi: 10.1002/stem.1944 (2015).
44. Paling, N. R., Wheadon, H., Bone, H. K. & Welham, M. J. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem* **279**, 48063–48070, doi: 10.1074/jbc.M406467200 (2004).
45. Sineva, G. S. & Pospelov, V. A. beta-Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? *International review of cell and molecular biology* **312**, 53–78, doi: 10.1016/b978-0-12-800178-3.00002-6 (2014).
46. Faraldo, M. M. *et al.* beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *FEBS letters* **581**, 831–836, doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.053 (2007).
47. Albergaria, A. *et al.* ICI 182,780 induces P-cadherin overexpression in breast cancer cells through chromatin remodelling at the promoter level: a role for C/EBPbeta in CDH3 gene activation. *Human molecular genetics* **19**, 2554–2566, doi: 10.1093/hmg/ddq134 (2010).
48. Shimomura, Y., Wajid, M., Shapiro, L. & Christiano, A. M. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development (Cambridge, England)* **135**, 743–753, doi: 10.1242/dev.006718 (2008).
49. Takeichi, M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Progress in clinical and biological research* **390**, 145–153 (1994).
50. Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* **7**, 619–627 (1995).
51. Priya, R. & Yap, A. S. Making a Choice: How Cadherin Switching Controls Cell Migration. *Developmental cell* **34**, 383–384, doi: 10.1016/j.devcel.2015.08.002 (2015).
52. Scarpa, E. *et al.* Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental cell* **34**, 421–434, doi: 10.1016/j.devcel.2015.06.012 (2015).
53. Plutoni, C. *et al.* P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *J Cell Biol* **212**, 199–217, doi: 10.1083/jcb.201505105 (2016).
54. Mandeville, J. A. *et al.* P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *BJU international* **102**, 1707–1714, doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.08115.x (2008).
55. Hishida, T. *et al.* Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **33**, 713–725, doi: 10.1002/stem.1893 (2015).
56. Watanabe, S. *et al.* Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**, 2697–2707, doi: 10.1038/sj.onc.1209307 (2006).
57. Haque, A., Yue, X. S., Motazedian, A., Tagawa, Y. & Akaike, T. Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-based substrata. *Biomaterials* **33**, 5094–5106, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.003 (2012).
58. Yang, C. *et al.* Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J Clin Invest* **107**, 1311–1318, doi: 10.1172/jci12274 (2001).
59. Basilicata, M. F., Frank, M., Solter, D., Brabletz, T. & Stemmler, M. P. Inappropriate cadherin switching in the mouse epiblast compromises proper signaling between the epiblast and the extraembryonic ectoderm during gastrulation. *Scientific reports* **6**, 26562, doi: 10.1038/srep26562 (2016).
60. Rogers, C. D., Saxena, A. & Bronner, M. E. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J Cell Biol* **203**, 835–847, doi: 10.1083/jcb.201305050 (2013).
61. Kadono, N., Miyazaki, T., Okugawa, Y., Nakajima, K. & Hirai, Y. The impact of extracellular syntaxin4 on HaCaT keratinocyte behavior. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 1200–1205, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.107 (2012).
62. Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development (Cambridge, England)* **136**, 1063–1069, doi: 10.1242/dev.030957 (2009).
63. Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766–770, doi: 10.1038/nature07863 (2009).
64. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671–675 (2012).

Author Contributions

N.H. mainly performed experiments and K.S. prepared the materials. T.K., T.H., A.Y., N.A. and Y.H. supported the experiments. N.H. and Y.H. designed experiments and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Hagiwara-Chatani, N. *et al.* Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **7**, 39868; doi: 10.1038/srep39868 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

第 9 章 研究業績

論文 (査読付)

OHagiwara N, Shirai K, Kido T, Horigome T, Yasue A, Adachi N, Hirai Y 「Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells」 Scientific Reports 2017 Jan 6;7:39868.

doi: 10.1038/srep39868

OHagiwara N, Kadono N, Miyazaki T, Maekubo K, Hirai Yohei「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」 Cell and Tissue Research 2013 Nov;354(2) :pp581-91

Shirai K, OHagiwara N, Horigome T, Hirose Y, Kadono N, Hirai Y. 「Extracellularly extruded syntaxin-4 binds to laminin and syndecan-1 to regulate mammary epithelial morphogenesis.」 J.Cell. Biochem 2016.10.1002/jcb.25661

Miyazaki T, Kadono N, Konishi Y, OHagiwara N, Maekubo K, Hirai Yohei 「Effluent syntaxin3 from dying cells affords protection against apoptosis in epidermal keratinocytes.」Exp. Dermatology 2013 Dec;22(12) :pp845-7

Miura M, OHagiwara N, Derek C Radisky, Hirai Y 「CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) isoform balance as a regulator of epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells」 Experimental Cell Research 2014 Sep 10;327(1)

Kadono N, OHagiwara N, Tagawa T, Maekubo K, Hirai Y. 「Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Is a Potent Cornification Regulator of Epidermal Keratinocytes.」 Mol Med. 2015 Jan 14;21:77-86.

査読なし

○萩原 奈津美、葛野 奈々子、平井 洋平

「表皮形成におけるEGF受容体とエピモルフィン」『生体の化学』公益財団法人金原一郎記念医学医療 振興財団 2013 年 64 巻 5 号P.456-457

学会発表 (査読なし)

・国際会議における発表 (ポスター発表)

○ Hagiwara N, Hirai Y「Plasmalemmal syntaxins as potential regulators of the EC cell differentiation」CDB 国際シンポジウム (神戸) 2014 年 3 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Plasmalemmal syntaxins regulate cell adhesion properties EC cells, leading to their cytodifferentiation.」第 12 回国際幹細胞学会 (カナダ) 2014 年 6 月

○ Hagiwara N, Hirai Y「Functional expression of plasmalemmal syntaxins on germ-layer differentiation executed by their extracellular localization」国際合同発生生物学会 (スペイン) 2014 年 10 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Spontaneous expression of extracellular Syntaxins perturbs stemness in embryonic stem cells」 アメリカ細胞生物学会 (アメリカ) 2015 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Spontaneously extruded syntaxin4 disturb stemness of embryonic stem cells via regulation of zscan4 family.」

第 14 回国際幹細胞学会 (アメリカ) 2016 年 6 月

・国内会議における発表

口頭発表

○ Hagiwara N, Hirai Y

「Extracellular syntaxin4 induces differentiation and survival in teratocarcinoma F9 cells.」

第 35 回日本分子生物学会大会(福岡) Flash talk 2012 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」

第 46 回日本発生生物学会 サテライトワークショップ 2013 年 5 月

○ Hagiwara N 「万能細胞における不均一性のメカニズム解明」 第 2 回超異分野学会
2015 年 3 月

ポスター発表

○Hagiwara N, Hirai Y

「The effect of extracellularly presented syntaxin 4 on the differentiation and survival of F9 teratocarcinoma cells 」 第 45 回日本発生生物学会大会 (神戸) 2012 年 5 月

○Hagiwara N, Hirai Y

「Extracellular syntaxin4 induces differentiation and survival in teratocarcinoma F9 cells.」

第 35 回日本分子生物学会大会（福岡） 2012 年 12 月

○Hagiwara N, Hirai Y「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」

第 46 回日本発生生物学会大会（島根） 2013 年 5 月

○Hagiwara N, Hirai Y「EC細胞における細胞外syntaxin4 による細胞接着と分化への影響」第 36 回日本分子生物学会（神戸） 2013 年 12 月

○Hagiwara N, Hirai Y「細胞外で機能発揮するsyntaxinsの三胚葉分化への影響」

第 37 回日本分子生物学会（横浜） 2014 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「 The t-SNARE Syntaxins exert morphological and differentiation-inducing functions upon their extracellular localization.」 第 67 回日本細胞生物学会大会（船堀） 2015 年 7 月

○ Hagiwara N, Hirai Y「細胞表面に局所的に提示されたSyntaxinは胚性幹細胞の未分化性を破綻させる」第 68 回日本分子生物学会大会（神戸） 2016 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y「Spontaneously extruded syntaxin4 disturbs stemness of embryonic stem cells via regulation of PI3K/Akt signaling.」第 39 回日本分子生物学会（横浜） 2016 年 12 月

第 10 章 謝辞

本研究を行うにあたり、抗E-、P- cadherin抗体およびP-cadherinのcDNAをご提供くださった理研の竹市先生、また、ES細胞および発現コンストラクトをご提供いただきました関先生に心より感謝申し上げます。。

ご多忙の中、主査・副査としてご助言・ご助力いただきました大谷 清先生、鈴木 信太郎先生、また、学生実習や、卒業研究発表などの数々の発表会で厳しくも温かく、ご指導を賜りました生命科学専攻の先生方、並びに学生の皆様に深く感謝致します。

仮配生の時から 5 年間、どんなときでも親身になってご指導くださいました平井 洋平先生、本当にありがとうございました。研究者としてのはじめの一步を平井先生の下で踏み出せたことが私にとって一番の幸運です。

また、悔いなく充実した研究生生活を過ごすことができたのは個性溢れる平井研究室のメンバーと安達直樹先生のおかげです。本当にありがとうございました。

最後に、これまで自由奔放な私を温かく見守り、全面的に応援してくれる家族がいることを心から幸せに思います。

今まで本当にありがとうございました。これからもよろしくお願いします。