

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	未分化細胞マーカーである Rex1 遺伝子のマウス胚および成体組織における発現局在
応募事業区分	女性研究者研究支援事業
申請代表者氏名	豊岡 やよい

○ 研究状況報告

ES 細胞、iPS 細胞のような未分化（多能性）細胞特異的に発現し未分化マーカーとして汎用される Rex1 遺伝子のマウス胚発生過程および成体における発現を明らかにする目的で、

1. 免疫細胞化学に使用できる抗 Rex1 抗体の作製 2. Rex1 の発現を EGFP などのレポーター分子により可視化するレポーターマウス系統の作製 を試みた。1. については MBL 社に依頼しウサギ 2 羽に Rex1 のアミノ酸配列をもとに合成した 3 種のペプチドカクテルを免疫し、免疫 5 回目以降の抗血清で ES 細胞の免疫染色をおこなったところ、ES 細胞の核が染色されて見え一見特異抗体が作製されたかのように見えた。しかしながら以前に作製した Rex1 の両アリルを欠損したノックアウト ES 細胞株 (Rex1^{-/-}細胞株) を用いて染色を行ったところ、Rex1 タンパク質を持たない Rex1^{-/-}ES 細胞の核も WT の ES 細胞と変わらず染色され、残念ながら Rex1 分子に対する特異抗体として免疫細胞化学に供するには耐えないことが分かった。2. の研究計画については、レポーターマウスを作製するための蛍光タンパク質の遺伝子を組み込んだ BAC コンストラクトを作製し、現在トランスジェニックマウス系統を作製中である。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

抗 Rex1 抗体作製の試みは本研究以前にもすでに行っており、以前のように GST 融合タンパク質を抗原に使用した場合も、本研究のようにペプチドカクテルを使用した場合も、いずれも特異抗体の作製には至らないことが分かった。今後再び作製を試みる機会があれば、ウサギではなくニワトリやハムスターなど、免疫する動物種を変えて行いたいと考えている。レポーターマウスの作製は抗体作製が上手く行かなかった場合の保険として行っていたが、当研究室ではこれまで他の幾つかの遺伝子についてほぼ確実にレポーターマウスを樹立してきた実績があるので、来年度中にはレポーターマウスを樹立し、マウス胚および成体内における Rex1 遺伝子の発現を観察することができ、目標の一部を達成出来るのではないかと考えている。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト（論文があれば添付）

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	マウス着床前胚における原始内胚葉細胞の cell sorting に関わる分子機構
応募事業区分	女性研究者研究支援事業
申請代表者氏名	豊岡 やよい

○ 研究状況報告

本研究は、着床期胚において出現し胚体外組織の原基となる原始内胚葉 (primitive endoderm; PrE) の細胞の分化およびその後の上皮化の機構を明らかにすることを目的としている。私たちは平成 23 年度に、BAC modification の系を利用し PrE 細胞の代表的な遺伝子マーカーである Gata6 遺伝子の発現を EGFP の蛍光により reporting するマウス系統を作成した。今年度は更に、それらのマウス系統からレポーターES 細胞を樹立した。ES 細胞を用いて初期胚様の細胞塊 (胚様体) を形成し分化誘導用の培地で浮遊培養すると、その最外層に PrE 層の分化出現が見られることが分かっている。この分化誘導系を利用して樹立した Gata6 レポーターES 細胞の胚様体を形成し、その形成過程を蛍光イメージング装置を用いて連続的に観察すると、EGFP の蛍光を発する Gata6 発現細胞 (= PrE 細胞) が細胞塊の内側にランダムに分化出現し、その後細胞塊の最外層へと非常に素早く移動する様子 (cell sorting) が観察された。この系を利用して、胚体内では観察することが難しい PrE 細胞の分化過程および cell sorting の現象を in vitro において詳細に観察することが可能になった。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

上記の PrE 分化誘導培養系を利用して、PrE 細胞の分化過程および cell sorting に関わる分子の探索を行った。具体的には分化誘導 4 日目の cell sorting 過程にある Gata6 陽性細胞を FACS により分集し、RNA を採取しマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、分化過程にある PrE 前駆細胞においては、細胞運動や細胞の形態変化に必要な遺伝子 (Rho-GTPase 関連分子、MMP、actin 結合タンパク質、cell migration に関係する膜タンパク質、など) の発現が顕著に上昇していることが明らかとなり、また Gata6 や Sox7 などのすでに発現が知られているもの以外に PrE における機能が未知の転写因子 6 個の発現上昇が見られた。加えて Flrt3、Efnb1 など、cell sorting や cell-cell repulsion に関わることを示唆されている分子の発現が上昇することを新たに見いだした。今後、これらの分化過程にある PrE において発現が顕著に上昇する分子の PrE 分化過程における機能の解析を、cell sorting に関わる因子および新規の転写因子を中心に ES 細胞を用いた PrE 分化誘導系を利用して行い、重要な機能を持つと判断されたものについては実際の胚体内における PrE 分化過程における機能も追々解析していきたいと考えている。25 年度秋に申請者の任期が終了する可能性があるため、学融合推進センターからの支援を継続して頂くことは断念したが、平成 25 年度も継続して本研究テーマを行い、成果はマイクロアレイ解析の結果を中心に平成 25 年度中に論文発表する予定である。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)