

2023 年度年次報告書
生命現象と機能性物質
2023 年度採択研究代表者

大町 紘平

理化学研究所 生命機能科学研究センター
研究員

細胞外マトリックスが駆動する上皮組織の発生と恒常性

研究成果の概要

本研究では、生体内で細胞外マトリックス (ECM) と多細胞ダイナミクスを同時に計測する技術、および ECM を時空間的に操作する技術を開発し、ECM ダイナミクスと多細胞の振る舞いの関係を明らかにすることを目指している。これにより、ECM が駆動する上皮組織の発生と恒常性のメカニズムを理解することが目的である。

2023 年度の研究では、基底膜を構成する主要な ECM 分子であるラミニン分子の生体内可視化を目指した。皮膚の基底膜を構成するラミニン $\alpha 5\beta 1/2\gamma 1$ (*Lama5*, *Lamb1/2*, *Lamc1*) およびラミニン $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (*Lama3*, *Lamb3*, *Lamc2*) を生体内で蛍光標識できる *Lama5-EGFP* および *Lama3-EGFP* ノックインマウスの作製に向け、ヒト *LAMA5* および *LAMA3* の cDNA を用いて最適な EGFP 遺伝子挿入部位のスクリーニングを行った。具体的には、*LAMA5* および *LAMA3* の cDNA 中の候補部位にフレキシブルリンカーを両端につけた *EGFP* 遺伝子を挿入し、5 種類の *EGFP* 融合 cDNA コンストラクトを作製した。これらのラミニン α 鎖-EGFP をラミニン β 鎖および γ 鎖と共にヒト培養細胞に遺伝子導入し、培養上清中へのラミニン複合体の分泌を確認した。その結果、非還元ウエスタンブロットティングによって高分子量のラミニン複合体を分泌できるラミニン α 鎖-EGFP を同定した。この結果を基に、現在 CRISPR/Cas9 技術を用いて *Lama5-EGFP* および *Lama3-EGFP* ノックインマウスの作製を進めている。また、生体内で ECM を操作するための基盤構築を目指し、複数の CRISPR activation コンストラクトを作製し、培養細胞における標的遺伝子の活性化を評価した。これにより、生体内での ECM 操作技術の確立に向けた重要なステップを踏むことができた。CRISPR/Cas9 技術による遺伝子操作については引き続き検証実験を行い、2024 年度中に新規 Cas9 ノックインマウスの作製を行う予定である。