

マウス胚性幹細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現

川村 紘子¹、網本 直記¹、田口 善智¹、安齋 政幸²、
加藤 博己²、入谷 明²、三谷 匡²

要 約

近年、幹細胞が蛍光色素である Hoechst33342 を強力に排出する性質を示すということを利用した、新たな幹細胞の識別方法が報告されている。この方法により分離される幹細胞は、フローサイトメトリーにおいて SP (Side-Population) 分画として検出される。このような、幹細胞の Hoechst33342 排出能力に關与する遺伝子として、ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターファミリーのひとつである *Bcrp1* (Breast cancer resistance protein 1) が報告された。さらに近年、*Bcrp1* Exon1 には、3つのアイソフォーム (A、B および C) が存在し、造血幹細胞においては分化段階に応じて *Bcrp1* mRNA アイソフォームの転写に選択性があることが示された。そこで本研究では、まずマウス組織ならびに培養細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの選択性について検討するとともに、未分化マウス ES 細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現量を Real-time PCR により定量的に解析した。その結果、アイソフォーム A が最も高く発現し、アイソフォーム C の発現はきわめて低いことが示された。さらに、分化誘導過程における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現について検討した結果、未分化 ES 細胞で高発現しているアイソフォーム A および B は、*Oct3/4* や *Nanog* の発現低下に先立ち、分化誘導初期に一度急激に減衰し、その後再び発現が回復することが示された。以上の結果より、*Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現と選択性は ES 細胞の分化状態に何らかの影響をもたらすことが示唆された。

緒 言

近年、幹細胞は医療分野においても有用性が高く、治療のツールとしての実用化に期待が寄せられており、幹細胞を用いた幅広い研究が盛んに行われている。しかしながら、幹細胞の生物学的理解を深めまたそれを利用していくためには、幹細胞の同定・単離が重要であるにもかかわらず、その技術的課題は解決されていない。そして近年、Hoechst33342 蛍光色素を強力に排出する細胞集団が、幹細胞として高い能力を有していることが報告された¹⁾。フローサイトメトリー解析において、この Hoechst33342 蛍光色素を排出した陰性分画は、主要な細胞集団からやや横にずれて突出した集団として示されることから、SP (Side Population) 細胞と呼ばれている (図 1)¹⁾。このような幹細胞における Hoechst33342 排出を担う遺伝子として ABC (ATP-Binding Cassette) トランスポーターファミリーの 1 つである *Bcrp1* (Breast Cancer Resistance Protein 1 : 別名 *ABCG2*、*MXR*) が報告された²⁾。*Bcrp1* は乳癌細胞に発現し、癌細胞の薬剤耐性の原因遺伝子として見出された³⁾。しかし、正常組織においても主に乳腺や胎盤などに発現しており、侵入した有害物を排出する機能を担っている。また、小腸にも発現しており、乳腺や胎盤同様、小腸から有害物を排出する役割を果たしている。一方で、SP 細胞に関しては、これまでに、神経、肺、乳腺、肝臓、骨髄、精巣、骨格筋、皮膚など多くの組織において体性 (組織) 幹細胞が多く含まれていることが報告されている^{4,5,6,7)}。さらにマウス胚性幹 (ES) 細胞においても SP 細胞が存在し、SP 細胞分画に属する ES 細胞は、非 SP 細胞分画の ES 細胞と比較してキメラマウスへの寄与率が高くなることも示されている⁸⁾。し

1. 近畿大学生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

たがって、Bcrp1 は幹細胞において生理学的機能、すなわち未分化性の維持や多分化能の獲得に何らかの役割を果たしているものと考えられる。そして最近、造血幹細胞において、*Bcrp1* mRNA には 3 種類のアイソフォーム (Exon1A、Exon1B、Exon1C) が存在し (図 2)、特に Exon1A を含む mRNA アイソフォームが、未分化状態の造血幹細胞において特徴的に発現していること、また造血細胞の分化段階や組織細胞の種類により各アイソフォームの転写に選択性があることが示された⁹⁾。

そこで本研究では、未分化マウス ES 細胞における *Bcrp1* mRNA 各アイソフォームの発現について、Real-time PCR により解析した。さらに、未分化 ES 細胞、分化過程の ES 細胞およびマウス成体組織において、*Bcrp1* mRNA アイソフォームの転写パターンについて検討した。

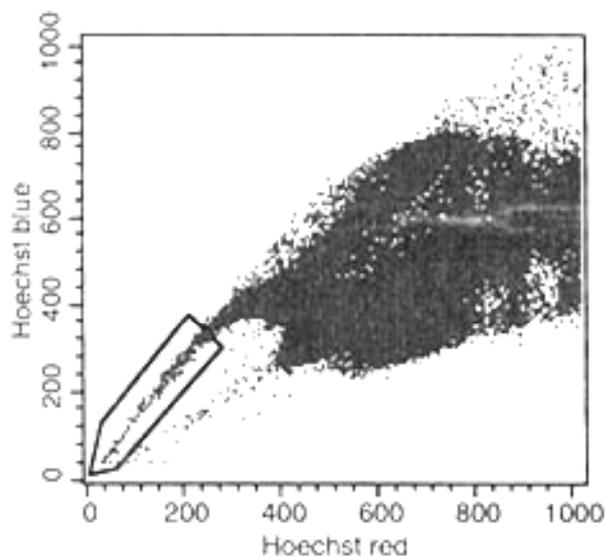
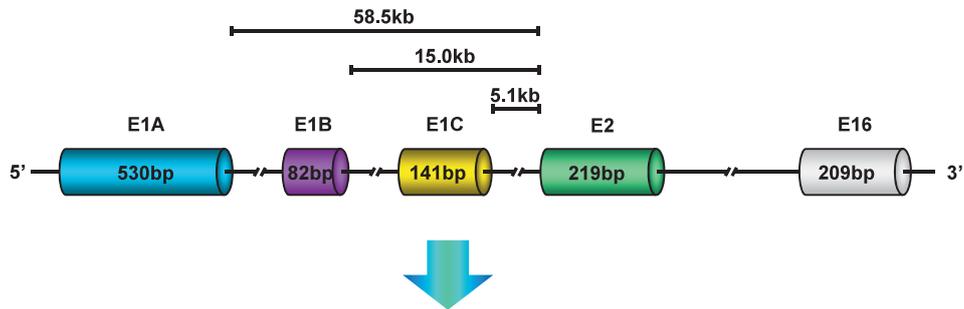


図 1. マウス骨髄細胞における SP 細胞分画

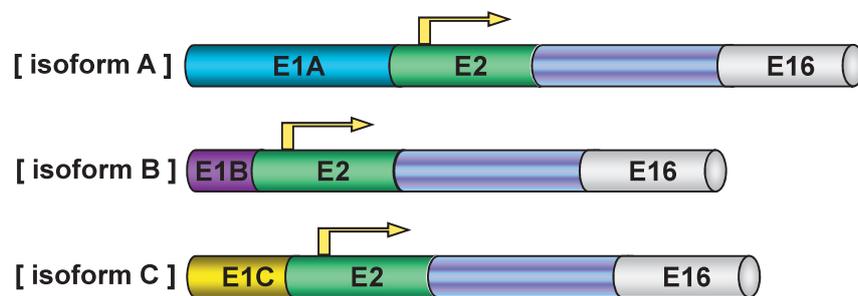
マウス骨髄細胞の Hoechst33342 による染色後のフローサイトメトリー解析。図中の左下の主要な細胞集団からやや横に突き出た部分が SP 細胞分画である。(Johan *et al.* (2005)¹⁾ から引用)

Bcrp1 遺伝子および*Bcrp1* Exon1 isoform

< Mouse *Bcrp1* gene >



< Mouse *Bcrp1* mRNA isoforms >



造血系細胞における各isoformの選択性

- ・造血幹細胞
isoform A および isoform B
- ・MEL細胞(赤白血病細胞)
isoform B
- ・骨髄中の赤芽球細胞
isoform B および isoform C

図2. *Bcrp1* mRNA アイソフォームの模式図

Bcrp1 における3種類の mRNA アイソフォームを模式的に示した。上段：*Bcrp1* 遺伝子における各アイソフォームとなる Exon1A(E1A)、Exon1B(E1B)、Exon1C(E1C)の位置関係。下段：各アイソフォームを含む転写産物の模式図。(Zong *et al.* (2006)⁹⁾ を参考に改変)

材料および方法

動物

本実験に関する実験動物の取り扱いについては、近畿大学先端技術総合研究所動物実験指針に準じて実施した。マウス ES 細胞の培養に用いるマウス Feeder 細胞は、MCH (ICR) (日本クレア(株)) 系胎齢 12.5 日胎仔由来線維芽細胞を用いて作製した。

Real-time PCR

未分化マウス ES 細胞からの total RNA の抽出は、Micro Scale RNA Isolation Kit (Ambion:Code #1931) を用いて行った。抽出後、DNase I 処理を行い、逆転写反応 (SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green: Invitrogen,11735-032) により cDNA 合成を行った。各アイソフォームの発現有無を確認するため、未分化マウス ES 細胞の total RNA から合成した cDNA を用い RT-PCR を行った。プライマーは既報⁹⁾ で記載されているものを使用した。Real-time PCR に用いる検量線プラスミドは、RT-PCR 反応液および、pGEM T-Easy Vector System I (promega Code:A1360) を用いて TA クローニングを行い作製した。Real-time PCR は、SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green (Invitrogen: Code 11735-032) を用いて Real-time PCR system 7300 (ABI) により行った。統計解析は、スチューデント t 検定により行った。

マウス ES 細胞の体外分化誘導

本実験では、129Sv 系マウス由来 ES 細胞 CMTI-1A 株 (大日本住友製薬) を用いた。ES 細胞の培養は、マイトマイシン C 処理したマウス胎仔繊維芽細胞のフィーダー細胞上で、MEM Non-essential amino acids (Invitrogen)、L-Glutamine (Invitrogen)、Nucleosides (Invitrogen)、Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)、 β -Mercaptoethanol (Sigma) 添加 Knockout DMEM (Invitrogen) に Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone) を 15% の濃度で加えた培地 (以下、ESM15%FBS) に、最終濃度 10^3 unit/ml LIF (ESGRO, CHEMICON) を添加した培地 (以下、ESM15%FBS+LIF) にて培養した。ES 細胞の分化誘導には、ハンギングドロップ法を用い、さらに外胚葉系譜への分化を誘導する条件下¹⁰⁾ で以下の手順にしたがい行った。分化誘導に供する ES 細胞は、0.1% ゼラチンコートディッシュ上で、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 45 分間培養後、フィーダー細胞を除去することにより調製した。胚様体の形成は、LIF 非添加レチノイン酸 (RA) 添加 ESM15%FBS で培養することにより行った。回収した ES 細胞を $1.0 \times 10^3 / 15 \mu\text{l}$ になるように ESM15% FBS + RA (10^{-7} M) で懸濁し、ハンギングドロップ内で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 3 日間培養した。3 日後、胚様体の形成を確認し、回収した胚様体をペトリディッシュ (FALCON : 351007) に播種し、ESM15%FBS + RA (10^{-7} M) 培地にて 10 日間、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で培養した。

PCR 解析

マウス組織および培養細胞からの total RNA の抽出は、Trizol (Invitrogen, 15596-026) を用いて定法にしたがい行った。調製した total RNA は、DNase I (TAKARA, 2215A) 処理を行い、oligo (dT) Primer (Invitrogen, 18418-020) を用いて、M-MLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen, 28025-013) により、 42°C で 50 分間、 75°C で 15 分間逆転写反応を行うことにより cDNA を調製した。PCR は、Taq PCR Core Kit (Invitrogen, 201225) を用い、 94°C で 3 分間反応させた後、反応サイクル (94°C で 30 秒間 \rightarrow $53 \sim 62^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間 \rightarrow 70°C で 1 分間) を 35 回繰り返す、最後に 70°C で 10 分間反応させて行った。本研究に用いた Primer 配列、 T_m 値、アニーリング温度、PCR 産物のサイズは表 1 に示した。

表1. 本実験に用いたPrimer セット
PCR解析に用いたPrimer配列、T_m値、アニーリング温度(An)、PCR産物のサイズを示す。

Primer		sequence	T _m 値 (°C)	An(°C)
size(bp)				
Oct 3/4	F	GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC	59.2	56
310	R	CTCGAACCACATCCTTCTCT	60.8	
Nanog	F	GTACCTCAGCCTCCAGCA	61.7	56
124	R	CAACCACTGGTTTTTCTGC	60.7	
Nestin	F	AAGCAGGGTCTACAGAGTCAGATCG	67.7	62
299	R	GCTGTACAGGAGTCTCAAGGGTAT	67.5	
Musashi1	F	GCTCTCAAACGTGACAAA	57.3	53
227	R	AGCTCGACTCCAAAACAAT	58.8	
NF-M	F	GAGGCACTAAGGAGTCCCTG	62.7	58
296	R	TATTGTGACTGAGGGCTGTCTG	65.1	
Brachyury	F	ATGATAACTGGTCTAGCCTCG	59.4	61
424	R	AGCCTAGAAGATCCAGTTGAC	58.9	
Desmin	F	GTGGAGCGTGACAACCTGAT	65.2	60
335	R	ATGTTCTTAGCCGCGATGGT	65.6	
Albumin	F	CAGGATTGCAGACAGATAGTC	58.9	56
266	R	GCTACGGCACAGTGCTTG	63.4	
α-fetoprotein	F	TCGTATTCCAACAGGAGG	58.5	56
174	R	AGGCTTTTGCTTCACCAG	60.6	
β-actin	F	GGCATTGTTACCAACTGGGAC	65.2	61
281	R	GTAGATGGGCACAGTGTGGG	65.4	
Bcrp1 E1A Forward 138		CCTTTTGACACCTTCATTACACATAGC	63.5	60
Bcrp1 E1B Forward 122		CCAAGGGACCGCGAGAAA	68.2	
Bcrp1 E1C Forward 139		GGAAATTTTAACTGCACATTGAGAGA	65.0	
Bcrp1 E2 Reverse		GTCCTAACGGCTCTGGAGTTCA	66.5	

※F : Forward Primer, R : Reverse Primer

結 果

マウス成体組織および培養細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現

マウス成体組織（脳、心臓、肺、胃、筋肉、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、子宮）および培養細胞（フィーダー細胞、初代肝細胞）について *Bcrp1* Exon1 アイソフォームの発現状態の検討を行った（図3）。その結果、アイソフォーム B は、発現量は異なるものの全ての組織および培養細胞から検出された。アイソフォーム A についても、発現量は多少異なるものの、初代肝細胞を除く全ての組織と培養細胞から検出された。アイソフォーム C は、脳、心臓、肺、筋肉、脾臓、腎臓、精巣で検出された。

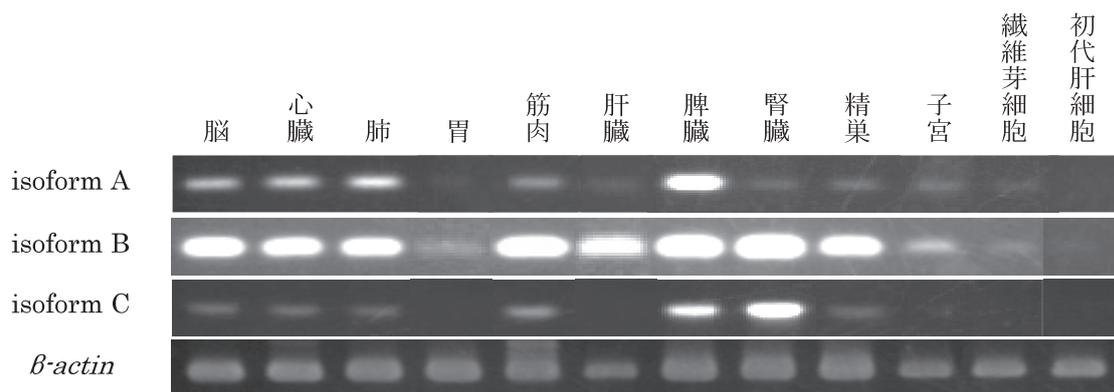


図3. マウス成体組織およびマウス培養細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォーム A、B および C の発現

Real-time PCR による *Bcrp1* Exon1 アイソフォームの発現量の解析

未分化マウス ES 細胞 4 株を用いて、*Bcrp1* Exon1 各アイソフォームの発現量を Real-time PCR により定量した結果、用いたすべての細胞株において同様の発現パターンが得られた（図4）。すべての ES 細胞株において、ハウスキーピング遺伝子である *Gapdh* の発現量が 10^8 コピーであるのに対し、E1A、E1B、E1C はそれぞれ 10^6 、 10^5 、 10^4 コピーの発現レベルであった。すべての ES 細胞株で、E1A の発現量が多く検出されたのに対し、E1C の発現量が検出はされるものの、極めて少量であった。また、統計解析により有意差検定を行ったところ、E1A と E1C の発現量にきわめて有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

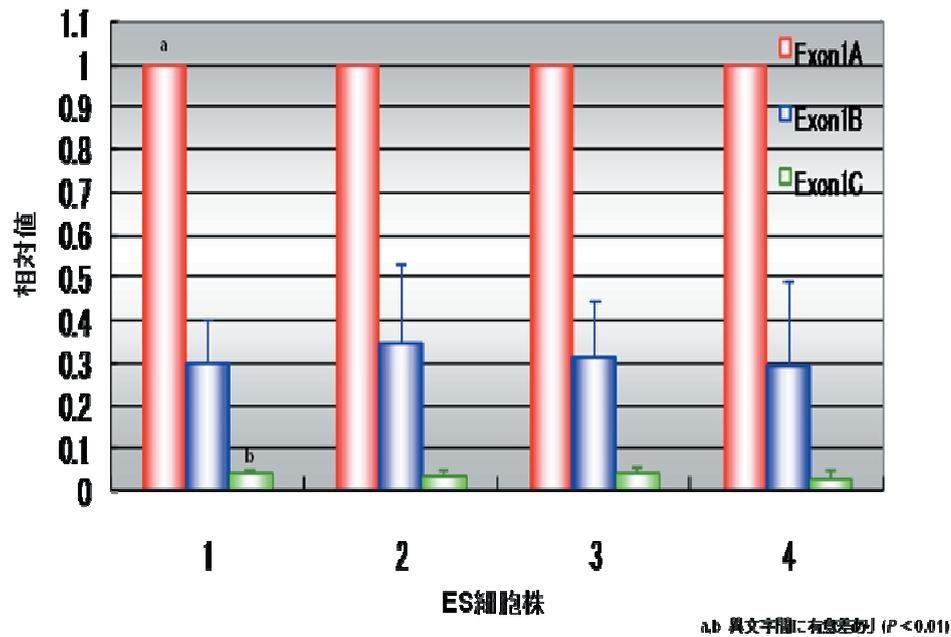


図4. マウス ES 細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現量
Gapdh の発現量をもとに各アイソフォーム発現量を補正し、E1A を 1 として
 E1B および E1C の発現量を相対値で示した。E1A および E1C の発現量において
 有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

ES 細胞の分化誘導過程における *Bcrp1* mRNA アイソフォームならびに分化マーカー遺伝子の発現

ES 細胞の体外分化誘導過程における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現パターンの検討を行った。また、未分化マーカー (*Oct3/4*, *Nanog*) および分化マーカー (外胚葉系; *Nestin*, *Musashi1*、中胚葉系; *Desmin*、内胚葉系; α -fetoprotein (*AFP*), *Albumin* (*ALB*)) の検出も行った (図 5)。その結果、未分化 ES 細胞において、全ての *Bcrp1* mRNA アイソフォームが検出された。アイソフォーム A および B は、分化誘導後早期にそれらの発現が一度大幅に減少し、その後再び増加することが示された。アイソフォーム C に関してはその発現量が極めて低かった。未分化マーカー (*Oct3/4*, *Nanog*) の発現は、分化誘導が進行するにつれ徐々に低下し、分化誘導 5 日目にはそれらの発現量が急激に低下しほぼ消失した。外胚葉系の分化マーカー (*Nestin*, *Musashi1*) は未分化 ES 細胞においてもわずかに発現が認められたが、分化誘導が進行するにつれてそれらの発現が増加した。中胚葉系の分化マーカーである *Desmin* は、分化誘導 5 日目からその発現が確認され、分化誘導が進行するにつれてそれらの発現が増加した。内胚葉系の分化マーカーである *AFP* は、分化誘導 3 日目からその発現が確認され、分化誘導が進行するにつれてそれらの発現が増加した。*ALB* は、分化誘導 13 日目でわずかに検出されたのみであった。

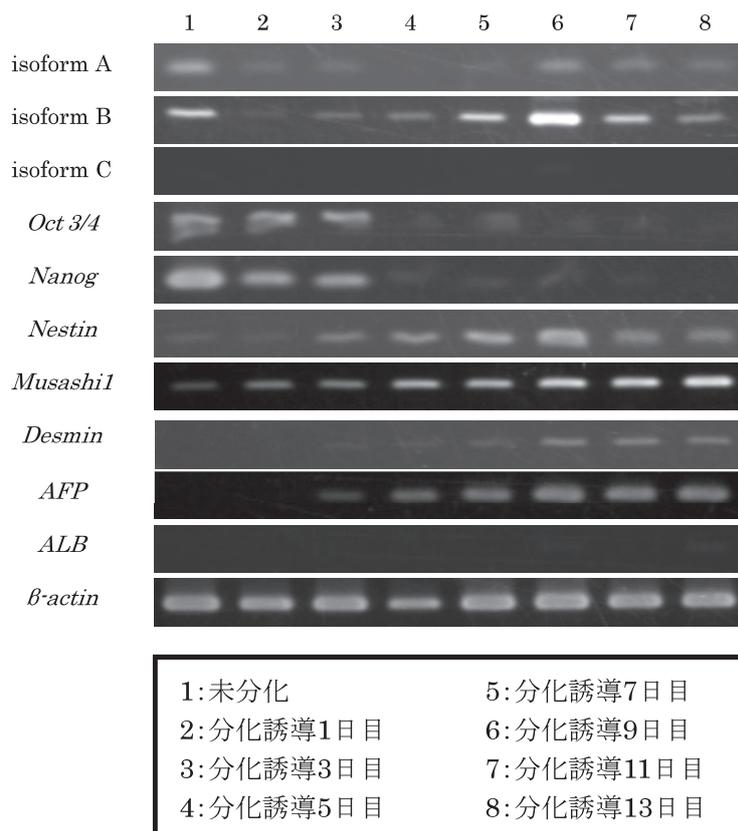


図5. ES細胞の分化誘導下における *Bcrp1* mRNA アイソフォーム A、B、C および未分化マーカー、分化マーカー遺伝子の発現

ES細胞を LIF 非添加レチノイン酸添加 ESM15% FBS で培養し、分化誘導後に *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現を RT-PCR により解析した。電気泳動写真は、上段から順に、アイソフォーム A、B、C、未分化マーカー (*Oct3/4*、*Nanog*)、分化マーカー (*Nestin*、*Musashi1*、*Desmin*、*AFP*、*ALB*) を示し、最下段はハウスキーピング遺伝子として β -actin を示している。各レーンは左端が未分化 ES 細胞であり、右に移行するほど分化誘導が進行している。

考 察

未分化状態の ES 細胞では *Bcrp1* mRNA アイソフォーム A が優位に発現する

マウス成体組織およびマウス培養細胞（フィーダー細胞、初代肝細胞）について、*Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現状態の検討をおこなった結果、アイソフォーム B の発現量は異なる傾向がみられたが、全ての組織・細胞で発現していた（図3）。アイソフォーム A についても、発現量は多少異なるものの初代肝細胞を除く全てのサンプルから検出された。アイソフォーム C は、脳、心臓、肺、筋肉、脾臓、腎臓、精巣でのみ検出された。脳および肝臓での *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現状態は既報と同様であった⁹⁾。腎臓におけるアイソフォーム C の発現は、既報⁹⁾と比較して高い傾向がみられた。

そこで、未分化状態の ES 細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現を Real-time PCR により解析した結果、異なる 4 株すべてにおいて共通の発現パターンがみられた。アイソフォーム A の発現量が最も多く、アイソフォーム B および C の発現量は少なく、特に、アイソフォーム C では発現量が極めて少量であることが示された（図4）。造血幹細胞では、未分化状態の造血幹細胞においてはアイソフォーム B が最も多く発現すると報告されている⁹⁾。今回の結果から未分化状態の ES 細胞と造血幹細胞の両方においてアイソフォーム A および B が比較的多く発現し、アイソフォーム C の発現量が微量であるという点で共通

していたが、未分化状態の ES 細胞ではアイソフォーム A が優位であることが示された (図 5)。造血幹細胞や未分化状態のマウス ES 細胞における結果から、細胞内の環境が各アイソフォームの発現量を調節し、特にアイソフォーム A の発現調節は、未分化維持機構あるいは分化誘導機構に何らかの影響をもたらしていると考えられた。*Bcrp1* mRNA アイソフォームの転写調節に関しては、配列情報ではアイソフォーム A の上流には造血幹細胞での転写制御に関わる v-Myb や Tal-1 (a,b) などの結合モチーフが存在する。また、アイソフォーム B の上流には、NF- κ B などの結合モチーフが存在している。したがって、高い未分化性を維持している幹細胞ほど、*Bcrp1* mRNA、特にアイソフォーム A の転写活性が高い可能性が考えられる。

ES 細胞の分化過程において *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現パターンはダイナミックに変化する

Zong ら⁹⁾ は、定量的 Real-time PCR により造血幹細胞の *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現量の解析を行った結果、未分化造血幹細胞ではアイソフォーム A および B の発現が高く、分化過程が進行するのにしたがい、アイソフォーム A は低下しアイソフォーム C の発現が増加することを示している (図 6)。そこで、ES 細胞の分化状態と *Bcrp1* の発現に相関があるかを検討するため、ES 細胞の体外分化誘導をおこない、未分化 ES 細胞および分化誘導 1、3、5、7、9、11、13 日目の *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現パターンを RT-PCR により解析した。その結果、分化に伴い各アイソフォームの発現状態が大きく変化することが示された。アイソフォーム A および B は分化初期にそれらの発現が大きく一度減少し、その後再び増加することが示された。しかし、アイソフォーム C については、未分化状態での発現は微弱であり、分化誘導によるその後の発現についても大きな変化は認められなかった。注目すべき現象として、ES 細胞の未分化の指標である *Oct3/4* および *Nanog* の減衰に先立ちアイソフォーム A および B が減衰していることから、*Bcrp1* mRNA の減衰が未分化性の維持、もしくは分化プロセスの誘因環境の調整と関係がある可能性が示唆された。マウス ES 細胞において、3 つの転写因子 (STAT3, *Oct3/4*, *Nanog*) が未分化性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになっている^{11,12)}。LIF は STAT3 を活性化し、STAT3 により GAPB α (GA-repeat binding protein α) の発現が誘導される¹¹⁾。その発現により *Oct3/4* リプレッサー (Cdx2, GCNF, Coup-tf1) と呼ばれる一群の *Oct3/4* 発現抑制分子の発現を抑制し、*Oct3/4* の発現を正に制御していると考えられる¹¹⁾。また、 β -catenin は LIF により安定化され、核内へ蓄積され、*Oct3/4* のコアクチベーターとして働くことで *Oct3/4/Sox2* 複合体による *Nanog* の発現誘導が促進されると考えられている¹²⁾。したがって、分化誘導過程における *Oct3/4* と *Nanog* の発現消失は、LIF 非存在下での培養環境による STAT3 やその他の因子のシグナルの変化に伴うものであり、*Bcrp1* mRNA アイソフォームの減衰は直接的に関与しているものではないと考えられる。細胞分化過程における *Bcrp1* の役割に関しては、*Bcrp1* を高発現している SP 細胞集団が高い未分化性を維持していることから、分化に関与する因子の排出機能を担っている可能性が考えられる。マウス *Bcrp1* は Hoechst33342 やローダミン等の色素の他、mitoxantrone, topotecan, doxorubicin 等の抗ガン剤、ステロイド、植物ステロール等を排出する³⁾。また、キイロタマホコリカビにおいては *Bcrp1* が分化促進因子 (DIF-1) を排出することにより未分化性を維持している²⁾。したがって、アイソフォーム A および B の減衰により、トランスポーターとしての機能が低下し、ES 細胞が分化シグナルを受け取りやすい状態になり、分化の進行が促進されるのかもしれない。しかし、*Bcrp1* mRNA の発現低下と *Bcrp1* の機能低下を直接結び付けるには、タンパク質レベルでの発現量および局在の確認をおこなう必要があると考えられる。

今後、*Bcrp1* mRNA アイソフォームの転写制御領域の解析や *Bcrp1* タンパク質の発現量および局在についての解析を行うことにより、ES 細胞における *Bcrp1* の未分化性の維持機構あるいは分化誘導機構における役割が明らかにされ、さらに幹細胞の特性についての生理学的な理解に貢献することが期待される。

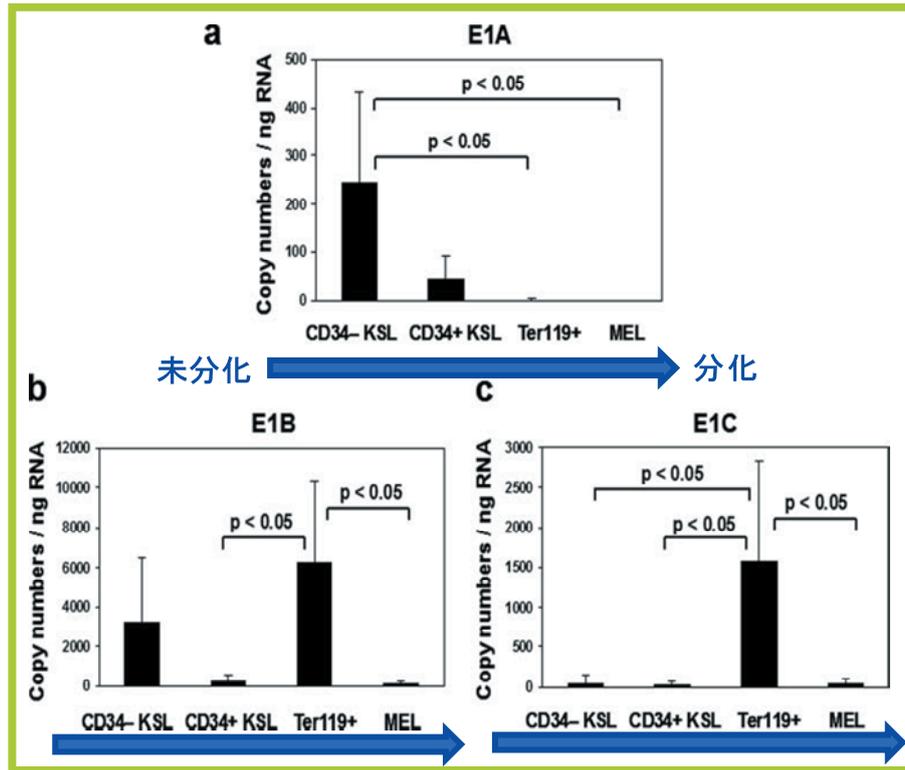


図6. 造血幹細胞における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現量
 定量的 Real-time PCR による造血幹細胞の各アイソフォームの発現量解析の結果。未分化幹細胞状態ではアイソフォーム A およびアイソフォーム B の発現が多く見られ、分化過程が進むにつれてアイソフォーム A は低下し、アイソフォーム C の発現が増加する。(Zong, Y *et al.* (2006)⁹⁾ から引用)

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金（18580283）の助成により行われた。

参考文献

1. Jonker J, Freeman J, Bolscher E, Musters S, Alzi A, Titley I, Schinkel A, Dale T. Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice. *Stem Cells* 23: 1059-1065, 2005.
2. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro A-M, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* 9: 1028-1034, 2001
3. 植田和光 編 学会出版センター「ABC 蛋白質」(2005)
4. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. *Medical sciences* 19: 12339-12344, 2002

-
5. Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I. Side population cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germline stem cells. *Development and disease* 131: 479-487, 2003
 6. Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* 205: 23: 834-841, 2005
 7. Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *AJP-Lung Cell Mol. Physiol.* 285: 97-104, 2003
 8. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20: 11-20, 2002
 9. Zong Y, Zhou S, Fatima S, Sorrentino BP. Expression of mouse Abcg2 mRNA during Hematopoiesis is regulated by alternative use of multiple leader exons and promoters. *Journal of Biological Chemistry* 40: 29625-29632, 2006
 10. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275: 124-142, 2004
 11. Kinoshita K, Ura H, Akagi T, Usuda M, Koide H, Yokota T. GABP α regulates Oct-3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 686-691, 2007
 12. Takao Y, Yokota T, Koide H. β -Catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 699-705, 2007

英文要旨

Expression of *Bcrp1* mRNA isoforms of mouse embryonic stem cells

Hiroko Kawamura¹, Naoki Amimoto¹, Yoshitomo Taguchi¹, Masayuki Anzai²,
Hiromi Kato², Akira Iritani², Tasuku Mitani²

Abstract

Stem cells from various organs can be identified as the side population (SP) cells based on the efflux of Hoechst 33342 using flow cytometry. As the molecule involved in the SP phenotype, breast cancer resistance protein 1 (*Bcrp1*) has been identified. Mouse *Bcrp1* mRNA has three untranslated leader exons (termed Exon1A, Exon1B and Exon1C) and the differential expression of *Bcrp1* mRNA isoforms is alternatively regulated in the stem cells and somatic cells. Mouse ES cell is considered to be “stem cells” but actually has the side population. In this study, the expression of *Bcrp1* mRNA in mouse ES cells was investigated. The expression pattern of *Bcrp1* mRNA isoforms in various tissues in adult mice and undifferentiated ES cells was analyzed by RT-PCR and the expression level of each isoform in ES cells was analyzed by Real-time PCR. The transcript containing Exon1B was strongly expressed in all tissues and ES cells. The transcript containing Exon1A was also expressed in the most tissues and ES cells but the transcript containing Exon1C was alternatively transcribed and was quite low in ES cells. RT-PCR analysis showed that after induction of differentiation all *Bcrp1* mRNA isoforms immediately decreased, followed by the disappearance of *Oct3/4* and *Nanog*, and various differentiation markers such as *Nestin*, *Musashi1* and *Desmin* appeared thereafter. These results indicate that the expression of mouse *Bcrp1* mRNA isoforms would be regulated by the similar manner to HSCs and down-regulation of *Bcrp1* would provide the appropriate intracellular environment for ES cell differentiation.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, 642-0017, Japan