

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 31 年 4 月 8 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
 職 名 助教
 研究代表者名 笠井 倫志

下記のとおり平成30年度の共同利用研究成果を報告します。

記

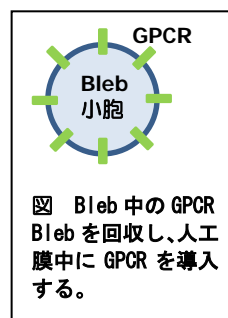
(課題番号: 301002)

1. 共同利用研究 課題名	パターン化人工膜を用いた G 蛋白質共役型受容体のラフト親和性と機能の解析			
2. 共同利用研究 目的	G 蛋白質共役型受容体(GPCR)の機能が、ラフトなど、周辺の脂質組成によって制御されるという、GPCR の新たな機能調節の仕組みを解明する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 笠井 倫志	京都大学 ウイルス・再生医 科学研究所	助教	実験及び研究を遂行する	
(分担研究者) 該当無				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究 部門 環境物質応答研究分野	氏 名	森垣 憲一

※ 次の6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

まず、任意の脂質環境に調整した人工膜中に、GPCR を再構成した観察チャンバ
ーを作製する。そのため、**Bleb と呼ばれる、直径～数ミクロン程度の細胞膜由来の分
泌小胞を利用する(図)**。Bleb は、GPCR を発現している培養細胞に外部からストレス
を加えて生じたものを回収する。さらに、Bleb の膜融合を誘導することで、Bleb 中に回
収された GPCR をガラス基板上のパターン化人工膜中に再構成する。これは、**森垣
研究室で培ってきた人工膜作製法を発展させ共同で行う**。



具体的には、用いる GPCR であるドーパミン受容体を、タグ蛋白質を介して、蛍光
色素で特異的にラベルして蛍光 1 分子観察する。予備実験として、蛍光ラベルしたド
ーパミン受容体を含んだ Bleb の抽出を行ったところ、成功した。さらに、分子を再構
成するためには、より多量かつ、分子を傷めずにドーパミン受容体を抽出する必要が
ある。そのため、遺伝子編集技術を用いて、安定的に高発現する培養細胞株を樹立して用いる。また、Bleb
の抽出や精製の際のバッファ条件の検討も行う。

次に、飽和脂肪酸が形成する一種の相分離状態である“ラフト”と呼ばれる膜領域を、脂質を部分重合し
たパターン化人工膜上で再現する。そこでの GPCR の拡散や、ダイマーの寿命や頻度を蛍光1分子観察法
によって調べて、非ラフト領域での結果と比較することで、ラフトがダイマー形成に及ぼす影響を調べる。ラフ
ト様領域の生成は、森垣研究室で確立した技術を用いて行う。

さらに、再構成する際の脂質組成を変え、ダイマー寿命の変化をとらえる。その際、脂肪酸の鎖長や脂質の
種類を変え、ラフトおよび周辺脂質環境の影響を調べる。これらから、脂質による GPCR の機能調整の全容
を、具体的、かつ網羅的に調べる。

いずれの研究においても、神戸大学において開発されてきた、自在かつ精密な人工膜と、主に笠井らが
開発してきた蛍光1分子観察を観察の基盤技術として用いるが、さらに蛍光褪色を抑えることで、数分間
におよぶ蛍光1分子追跡が可能な、超長時間蛍光1分子観察など、先進的な観察手法も組み合わせる。これによ
って、“個々の分子の性質”について調べる事ができるので、ダイマー形成をしやすい・しにくい
分子が、ラフト様領域を好む・好まない分子であるかどうかなど、受容体分子の個性とシグナル生成との関連
も明らかにしたい。

7. 共同利用研究の成果

ドーパミン受容体を安定的に高発現する培養細胞株の樹立に成功した。この細胞を用いて、ドーパミン受
容体を含んだBlebの調整法を検討し、Bleb の作製法や濃縮法、バッファ置換条件等を最適化した。特に、
濃縮のためには遠心濃縮分離と限外濾過を組み合わせると効率がいいこと、また、その際にバッファの
置換も同時に行えることが分かった。この方法によって、Bleb 生成の際に用いる、アルデヒドや還元剤など有
害な試薬を素早く、効率的に除けることが分かった。これらによって、ドーパミン受容体を含んだ Bleb を、再
現性高く、効率的に調整することが可能になった。さらに、得られた Blebを効率よく膜融合させるため、外部
から加える試薬の検討、用いる Bleb のサイズの検討を行うことで、パターン化人工膜上にドーパミン受容体
を再構成し、さらに、蛍光 1 分子観察することにも成功した。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さ
い。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

2018 年度 第56回 生物物理学会年会 “Direct reconstitution of membrane proteins from cell membrane
blebs into a model biological membrane” Rurika Nagai¹, Yasushi Tanimoto², **Rinshi Kasai**³, Kenichi Suzuki^{4,7},
Fumio Hayashi⁵, **Kenichi Morigaki**⁶ (¹Grad. Sch. Agr., Univ. Kobe, ²Biosignal research Center., Univ. Kobe,
³Institute for Frontier Life and Medical Sciences., Univ. Kyoto, ⁴G-chain., Univ. Gifu, ⁵Grad. Sch. Scie.,
Univ. Kobe, ⁶Grad. Sch. Agr., Univ. Kobe, ⁷Grad of Nat. Scie and Tech., Univ. Gifu)

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等が
ありましたらご記入ください。

科研費・新学術領域研究・計画研究 “生体・人工発動分子によるエネルギー変換過程の1分子計測法の開
発” 研究分担者 笠井 倫志 (課題番号: 18H05424 代表 分子科学研究所 飯野 亮太 教授)