

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

2020年 4月 7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2019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)の一過的ダイマー形成や機能が、脂質ラフト等、脂質の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	2019年7月1日 ~ 2020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。

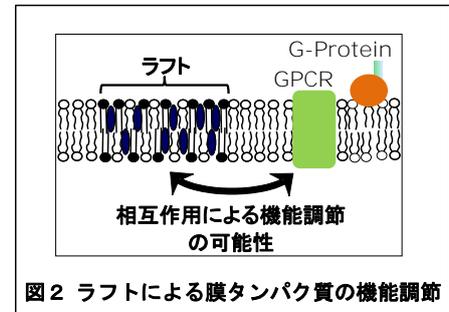
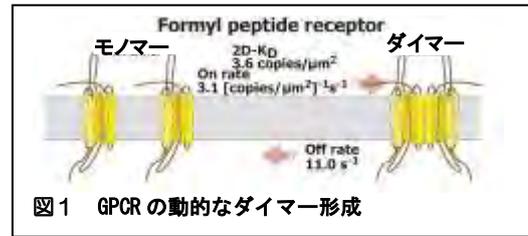
## 6. 共同利用研究計画

**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。** GPCRとして、ドーパミン受容体、および、接着性 GPCR、CELSR を用いて、GPCR のラフト親和性と機能の関連を蛍光1分子観察法によって調べる。

このため、脂質環境を任意で制御しながら機能を調べる必要があるが、このような制御を生細胞で行うことは極めて難しいので、本研究では、人工膜環境を用いる。すなわち、**生体膜の構造と機能を模したパターン化人工膜をガラス表面に作製し、その中へ GPCR を再構成する事**で実験を行う。

人工膜中の GPCR を蛍光1分子観察する事で、拡散係数やダイマー形成等のダイナミクスを直接捉え、周辺脂質がダイマー形成に及ぼす影響を解析する。具体的には、主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パターン化人工膜で構成し、ラフトがダイマーの寿命や形成頻度に及ぼす影響を調べる(図1)。また、脂質分子の種類や脂肪酸の長さの影響も調べる。その後、三量体 G 蛋白質などのシグナル分子と GPCR を二色同時に蛍光1分子観察し、両者の相互作用がラフト等の周辺脂質環境で制御されているか調べる(図2)。さらに、接着性 GPCR を人工膜中に再構成した基板を作製し、脂質組成によるダイマー形成能の制御や、細胞接着機能が制御できるか検討する。

いずれの研究も、神戸大学における人工膜作製技術と、主に笠井らが開発してきた蛍光1分子観察法を基盤として用い、蛍光褪色を抑える等の先進的な蛍光1分子観察の手法も組み合わせて、高・時空間分解能で行う。



## 7. 共同利用研究の成果

- 1) 前回の神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用(課題番号:301002)によって確立した、ドーパミン受容体を安定的に高発現する培養細胞株、および、Blebの精製法を用いて、ドーパミン受容体を含んだBlebを調整し、人工膜中への再構成を再現性高く行うことが可能になった。
- 2) この際、ガラス基板とPDMSシートに生じた隙間に、ドーパミン受容体を含む膜が高い効率で生じることを発見した。現在、こうした高効率の再構成が起きる原因の解明と、新たなナノ空間デバイスとして用いることができるか、検討を進めている。
- 3) ドーパミン受容体の細胞内発現量を増やすことで、再構成効率を上げる試みを行った。そのため、培地にブチル酸ナトリウムを加えた。Bleb中のドーパミン受容体量は増えたが、人工膜基板への再構成には失敗したので、現在、原因の解明を進めている。
- 4) Blebを用いた、接着性GPCRの抽出を行ったが、Bleb中に含まれる接着性GPCRの量が極めて少ないことが分かった。現在、原因の解明を進めている。

## 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

### 【学会発表】

1. 笠井倫志 “蛍光1分子観察法による膜分子の動態観察と機能の解明: G蛋白質共役型受容体の動的なモノマー・ダイマー変換” 日本化学会 第100春季年会 コラボレーション企画・シンポジウム “新学術領域研究『発動分子科学』報告会 ~化学者と物理系および生物系 研究者がコラボレーションする発動分子~” 2020年3月22~25日(新型コロナウイルス禍のため誌上開催)
2. 笠井倫志 “Examining the transiently formed GPCR dimer: An approach by single fluorescent molecule observation in living cells” 第57回日本生物物理学会 年回 シンポジウム “The Quality of Proteins - Multiple Approaches for Protein Evaluation -” 2019年9月26日 宮崎・シーガイア
3. Rurika Nagai, Yasushi Tanimoto, Rinshi Kasai, Kenichi Suzuki, Fumio Hayashi, Kenichi Morigaki “細胞膜断片ブレブを用いたモデル生体膜への膜タンパク質再構成 / Direct reconstitution of membrane proteins from cell membrane blebs into a model biological membrane” 第57回日本生物物理学会 年回 ポスター発表 2019年9月26日 宮崎・シーガイア
4. 永井るりか、谷本泰士、笠井倫志、鈴木健一、林文夫、森垣憲一 “パターン化人工膜への膜タンパク質の再構成” 光・量子デバイス研究会 2020年1月8日 姫路・西はりま地場産業センター

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。

該当なし