



2023年度助成

研究経過・**終了**報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	再構成脂質膜基板を用いた、液中タンパク質—膜脂質間相互作用の1分子感度測定法の構築
研究の結果	<p>まず、蛍光色素で標識した様々な細胞分泌因子の調製を行った。蛍光観察用の Halo タンパク質でラベルしたエクソソームマーカー、CD9、CD63、CD81 のうちいずれかを発現させた、マウス線維芽細胞由来の L 細胞からエクソソームを調整した。エクソソームマーカーは、種類によって、サイズや組成が異なるエクソソームをラベルする可能性があるため、改めて区別して調整した。エクソソームは、超遠心法によっても回収できたが、エキソメと呼ばれる微小膜断片が混入する可能性があるため、内層膜脂質であるフォスファチジルセリンを表面に露出しているエクソソームを選択的に選択する TIM4 タンパク質ビーズを用いて精製した。得られた粒子の平均直径は約 70 ナノメートルであった (Tunable resistive pulse sensing 法)。別の精製法として、抗 CD9 や抗 CD81 抗体を用いた精製も行ったが、いずれの方法でも、エクソソームマーカーを含む画分を回収することができた。これらの方法で、エクソソームマーカーでラベルされたエクソソームを別々に調整することに成功した。TIM4 タンパク質ビーズを用いることで、ヒト前立腺癌由来の PC3 細胞からもエクソソームを回収できることもわかった。</p> <p>次に、様々な膜タンパク質を脂質小胞膜上に提示する、細胞外分泌因子の調整法を検討した。そのため、細胞に、還元剤とホルムアルデヒドを用いた化学ストレスと、水流による物理ストレスを加えて得られる、直径50ナノメートル～10ミクロン程度の脂質二重層膜構造を持つ膜小胞 Bleb を用いた。この方法を用いると、テンジクネズミ卵巣上皮細胞由来の CHO-K1 細胞から得られた膜小胞 Bleb 膜中に、エクソソームマーカーが含まれることを今回新たに発見した。Nagai らの先行研究 (Adv Biol (Weinh). 2021 5: e2100636) によって、この手法で得られた膜小胞 Bleb は大部分が形質膜に由来すると考えられるため、エクソソームとは異なる脂質組成やタンパク質組成を持つ可能性がある。すなわち、膜小胞 Bleb は、エクソソームとは異なる脂質環境で様々な膜タンパク質を提示することができる新たな分泌単位として用いることができることが分かった。</p>
研究発表 (実績)	<p>【総説】 笠井 倫志 Dynamic dimer formation of G-protein coupled receptor in the lipid bilayer 膜 (Membrane) 49: 93-98 (2024)</p> <p>【招待講演】</p> <ol style="list-style-type: none"> 笠井 倫志 細胞内の分子がメゾスケールレベルで組織化する仕組みの解明 シンポジウム～発動分子科学の展望と課題～ 2023年 12月 23日 東京 笠井 倫志 膜中での G タンパク質共役型受容体のダイマー形成についての研究 膜学会・生体膜シンポジウム 生体膜における生命現象の理解を目指して～分子から個体レベルまで～ 2023年 11月 20日 東京 笠井 倫志 qCMOS カメラを用いた蛍光 1 分子観察で、分子が働く仕組みを探る 第 61 回 日本生物物理学会年会 浜松ホトニクス株式会社 BP セミナー 2023年 11月 14日 名古屋 笠井 倫志 1 分子観察法による、メゾスケールでの分子の作動機構の解明 第 15 回 MPRC セミナー・令和 5 年度第 3 回 MCRC セミナー 2023年 6月 22日 千葉 <p>【学会発表】 Kasai RS, Nishiguchi S, Uchihashi T. Stably formed trans protein complex of adhesion GPCR at the cell-cell interface. 第 61 回日本生物物理学会 年回 2023年 11月 14-16日 名古屋</p>

提出期限：研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。