

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2021 年 7 月 30 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 ウイルス・再生医科学研究所(3月末まで)・岐阜大学(現在)

職 名 助教(助成決定時から3月末まで)・特任准教授(現在)

氏 名 笠井 倫志

助 成 の 種 類	令和 2 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	接着性GPCRを介した細胞間接着と極性形成の仕組みの解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 【学会発表】 1. 笠井倫志 “蛍光1分子観察法による細胞膜中の分子の動態と機能の解明:会合体形成とダイナミクス” 日本化学会秋季事業 第10会 CSJ化学フェスタ2020, 2020年 10月 20日 (オンライン開催) 2. Kasai RS, Nemoto YL. Single molecule observation of adhesion GPCR accumulated at the cell-cell interface. 第58回日本生物物理学会 年回, 2020年 9月 16-18日 群馬 (オンライン開催)			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		微弱光カメラ制御用PC	650,639	
		解析用ワークステーション	349,361	
計		1,000,000		
当財団の助成に つ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 助成を頂くことで、研究を進めることができました。大変助かりました。深く感謝申し上げます。			

研究内容

細胞の接着と極性形成は、細胞が組織化して働くために極めて重要である。特に、細胞同士が接触する場所では、接着分子のトランス相互作用や、極性形成のためのシグナル生成等、重要な反応が起きていると考えられる。一方で、こうした細胞間隙での分子の働き方の実態については良く調べられておらず、不明な点が多い。本研究では、接着性GPCRを介した細胞間接着と極性形成に注目し、細胞間隙で働く分子や分子複合体の分布やダイナミクスを1分子レベルで明らかにする。

研究成果と今後の見通し

細胞同士が接触して生じる膜近接領域に注目し、蛍光1分子観察や超解像観察によって、接着性 GPCR、CELSR や、極性形成分子 Frizzled 等を詳しく調べ、下記の結果を得た。

1. 細胞間隙に存在する、接着性 GPCR のトランス型分子複合体の可視化に成功した

それぞれ異なる蛍光色素で染めた CELSR 分子を発現する 2 つの細胞を共培養することで、細胞間隙に集積した分子を1分子レベルで観察する系の確立に成功した。接着性 GPCR、CELSR が細胞間隙に集積する領域“CELSR ドメイン”中で2色同時蛍光1分子観察することで、そこでの CELSR 分子のトランス型分子複合体の蛍光1分子観察に成功した。トランス型分子複合体の多くは停留し、接着作用に関連することが示唆されたが、一方で、並進拡散するものも観察された。拡散する分子複合体は、アクチンとの相互作用がない、もしくは非常に弱いことから、CELSR 分子がトランス型分子複合体を形成するだけでは細胞の接着能を獲得できず、アクチンもしくは膜構造物に架橋する別の分子の介在が示唆された。

2. 接着性 GPCR がパッチ状の構造を形成することを明らかにした

超解像観察を行うことで、CELSR は細胞間隙でパッチ状の構造を形成することを発見した。これらが細胞接着の機能単位であると考えられるので、今後は、パッチを構成する分子複合体の構成分子数やダイナミクスを調べる。現在、そのための方法の開発を進めている。

3. 極性形成分子が細胞間隙に集積する仕組みを検証した

極性形成分子 Frizzled と CELSR の同時観察を行い、細胞間隙の CELSR ドメインに Frizzled が特異的に集積することを見出した。この領域で、CELSR と Frizzled の2色同時超解像観察を行うと、両者は光学分解能以上の分解能でも非常に良く共局在することが分かった。一方で、膜間隙領域でも、CELSR が存在しない領域が存在するが、こうした領域でも、Frizzled が集積する部分が観察された。すなわち、CELSR に依存しない Frizzled 集積のメカニズムがある可能性があることが分かった。一方で、極性形成した細胞内では Frizzled と対をなす別の極性形成分子、Vangl と、CELSR を同時に観察すると、こちらも細胞間隙の CELSR ドメインに特異的に集積することを見出した。今後は、Frizzled

と Vangl を選別する仕組みの解明のため、膜上での分子の拡散や、小胞輸送などに注目した観察を行う。

4. 極性形成を誘導する分子が細胞外小胞に含まれるらしいことを発見した

Frizzled のリガンド、Wnt が細胞外小胞 sEV (small Extracellular Vesicle, exosome) に含まれるらしいことを発見した。超遠心を用いた標準的な sEV の調整手法によって、数分子の Wnt が濃縮した粒子が回収されること、および、こうした粒子の一部は sEV のマーカ分子と共局在することが根拠である。今後は、細胞膜上や膜間隙での Wnt の振る舞いを調べることで、sEV-Wnt と、モノマー型 Wnt での生理的意義の違いの解明を進める。特に、細胞間隙へ sEV が入り込めるかを、シリンドリカルレンズを用いた 3 次元蛍光 1 分子観察によって調べる。また、GPCR の活性化をリアルタイムイメージングで可視化する手法を開発し、細胞間隙で集積する Frizzled の意義の解明を進める。GPCR の活性化イメージングは、GRK や Arrestin をはじめとした複数のシグナル分子を用いて行うが、その他の手法も検討する。また、sEV であっても、濃縮するマーカ分子の違いにより種類や性質の違いがあることが知られているので、Wnt が含まれる sEV の性質の同定も進める。

本研究に関連する学会発表

1. 笠井倫志 “蛍光 1 分子観察法による細胞膜中の分子の動態と機能の解明：会合体形成とダイナミクス”

日本化学会秋季事業 第 10 会 CSJ 化学フェスタ 2020, 2020 年 10 月 20 日 (新型コロナウイルス禍のためウェブ会議で開催)

2. Kasai RS, Nemoto YL. “Single molecule observation of adhesion GPCR accumulated at the cell-cell interface”

第 58 回日本生物物理学会 年回, 2020 年 9 月 16-18 日 群馬 (新型コロナウイルス禍のため ZOOM での開催)