

2021年5月4日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
2020年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：神戸大学

職名：准教授

氏名：森垣憲一

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：パターン化人工膜と細胞の接着により形成するナノ空間を用いた細胞間隙モデルの創成

2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 笠井倫志

3. 研究期間：2020年4月1日～2021年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

細胞同士の接着により形成される厚さ数十ナノメートルの細胞間隙は、多様なシグナルが伝達される細胞間コミュニケーションの場であり、細胞の組織化、再生、分化の制御に極めて重要な働きを担っている。本研究は、人工膜近傍に細胞間隙モデルを作製し分子の振る舞いを1分子レベルで詳しく調べることで、細胞間隙の分子機構、細胞間隙での相互作用を通じて細胞集団が組織化する仕組みを、解明・制御する新しい方法論を開発することを目的とした。

申請者が独自に開発したパターン化人工膜を用いて、厚さの制御されたナノ空間を形成し、その内部における膜タンパク質の挙動を定量的に解析する技術を開発した。パターン化人工膜は、ポリマー化された脂質二分子膜と生体膜と同等の脂質二分子膜が任意の形状でパターン化されており、安定なポリマー脂質膜は、組み込まれた生体脂質膜を安定化することができる。本研究では、生体脂質膜として細胞由来の膜小胞 (blebs) を用いて、哺乳類細胞の膜タンパク質をパターン化人工膜に直接導入する技術を開発した。精神疾患に関わる重要な GPCR であるドーパミン受容体 (D2R) を CHO 細胞に発現し薬剤処理で膜小胞を形成した。膜小胞をポリマー膜で囲まれた生体脂質膜部位に導入する効率は低かったが、高分子エラストマー (PDMS) とパターン化人工膜を接着させて形成されたナノ空間部位においては、膜小胞由来の D2R が高密度で導入され、

分子が2次元拡散していることが観察された。D2Rが生理的な活性を持つことは、アンタゴニストの結合や二量体形成寿命などで検証することができた。これらの結果は、現在、論文を投稿中である。現在、人工膜とPDMSの間に厚さの制御されたナノ空間を開発中であり、今後、その内部において膜小胞由来の膜タンパク質を導入する手法を開発する。この技術が確立されれば、多様な膜タンパク質を人工膜とナノ空間において1分子計測して分子物性や機能を系統的に評価できるものと期待される。

2020年度にはさらに、生細胞を人工膜表面に結合させる検討を開始した。細胞接着を誘起する配列(RGD)を持ったペプチドをポリマー脂質膜に共有結合して提示し、パターン化人工膜表面にCHO細胞を接着させた。CHOに発現した接着性Gタンパク質共役型受容体(CELSR)を1分子蛍光標識することで、CELSRが細胞接着にどのように関与するかを検証する予備実験を行った。RGDを認識して接着するインテグリンにおいては、ポリマー脂質膜表面に接着班が形成されたが、CELSRはRGDとは独立した動きを示した。この結果は、パターン化人工膜を用いて細胞接着の精密な検証が可能であることを示唆している。今後、CELSRを組み込んだパターン化人工膜とCELSRを発現した細胞を共培養することで、接着・認識作用が生じる仕組みの解明を目指す。

人工膜は、多様な膜タンパク質を脂質組成が制御された環境下で再構成、機能解析することが可能であり、今後、膜タンパク質評価チップとしての応用が期待される。また、本研究で開発を行った細胞間隙モデルを用いて、細胞間の分子相互作用を精密に再現・計測することで、再生医療にも応用可能な基盤技術を構築できるもの期待される。さらに、膜タンパク質、ナノ空間を有機的に連携した人工膜を用いて、病気の診断などにも用いることが可能なバイオチップの開発を進めたいと考えている。

## 5. 研究成果の公表

学術論文(投稿中):

Rurika Nagai, Ayane Sugimachi, Yasushi Tanimoto, Kenichi G. N. Suzuki, Fumio Hayashi, Dorothee Weikert, Peter Gmeiner, Rinshi S. Kasai, Kenichi Morigaki, "Functional reconstitution of dopamine D2 receptor into a supported model membrane in a nanometric confinement"

学会発表:

Kenichi Morigaki, "Model biological membrane reconstituted in a nanometric space", ACS Spring 2021, 2021年4月6日(オンライン)(招待講演)

Rurika Nagai, Ayane Sugimachi, Yasushi Tanimoto, Kenichi G. N. Suzuki, Fumio Hayashi, Rinshi S. Kasai, Kenichi Morigaki, "Functional reconstitution of dopamine D2 receptor into a supported model membrane in a nanometric confinement", ACS Spring 2021, 2021年4月6日(オンライン)