

多細胞システムにおける細胞間相互作用とそのダイナミクス
2020 年度採択研究者

2020 年度 年次報告書

米原 圭祐

オーフス大学 医学部ダンドライト研究所
准教授

コンタクトーム解析の基盤技術の確立

§ 1. 研究成果の概要

本研究ではマウス中枢神経系における神経細胞の機能ドメインを介した多細胞相互作用解析のための技術基盤”コンタクトミクス”を確立することを狙いとする。まず TVA 細胞外ドメイン-LPXTG-mgSrtA-細胞膜機能ドメイン局在化シグナルの発現プラスミド作成及びアデノ随伴ウイルスベクターの作成を行った。外部から投与された分泌型 TVA-LPXTG-SpyTag を mgSrtA-SpyCatcher でトラップする方法のためのコンストラクトも作成し発現ベクターへサブクローニングした。また、EnvA 外殻遺伝子改変狂犬病ウイルスの調製も行った。概念実証のために培養細胞を用いた実験を行った。HEK 細胞に TVA-LPXTG-mgSrtA-PDGFRbeta あるいは TVA-LPXTG-mgSrtA-Neurexin をリポフェクションで発現させた後、EGFP を事前導入しておいた HEK 細胞と共培養した。共培養後 TVA に付加した V5 タグや mgSrtA に付加した FLAG タグの抗体染色により TVA 及び mgSrtA が起始細胞の細胞膜に局在することを共焦点顕微鏡スキャンにより確認した。近接 EGFP 陽性 HEK 細胞への TVA 付加は現在確認中である; EGFP 陽性 HEK 細胞表面に TVA-V5 エピトープタグと思われたシグナルが見えた事例があったが、実験数を重ねて確証を強める必要がある。TVA の転移付加に加えて、先行研究で用いられているビオチン-LPETG を用いた近接細胞標識実験も開始した。ビオチン標識した細胞を Streptavidin-Alexa Fluor 蛍光色素で発色し、蛍光顕微鏡で画像取得した。Alexa Fluor シグナルが弱い懸念が生じたため、Streptavidin-HRP 及び Tyramide-Alexa Fluor でシグナルを増幅するアプローチ及び FACS によるシグナル定量も開始した。