

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

2021 年度 年次報告書

米原 圭祐

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所
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が共焦点顕微鏡スキャンにより観察された。近接 EGFP 陽性 HEK 細胞へ EnvA 狂犬病ウイルスが有意に感染したが LPETG 配列なしのコンストラクトでは EGFP 陽性 HEK 細胞への感染が起らなかったことから、TVA が mgSrtA の作用により近接細胞表面に転移したと思われる。また、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行った。ビオチン標識細胞をセルソーターによりシグナル定量を行い、mgSrtA を発現させた場合では発現させない場合と比較して EGFP 陽性へのビオチン標識が増加することを示した。コントロール実験のための LPETG 配列なしのコンストラクトを発現する AAV ベクターを作成したので、生体内標識実験を今後開始する。