

細胞の動的・高次構造体  
2022年度採択研究代表者

2022年度  
年次報告書

戸田 浩史

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構  
助教

生体防御と睡眠:液-液相分離がつなぐ2つの高次機能

## 研究成果の概要

### 培養細胞を用いた Nemuri の顆粒の確認

まず *in vitro* 培養細胞系 (S2 細胞) を用いて、Nemur-GFP を発現させるために Nemuri-GFP を発現させるためのプラスミド作成をおこなった。恒常的に発現させるためにアクチンプロモーターの下流に Nemuri-GFP をつないだプラスミドと培養液中に銅を添加することで誘導的に Nemuri-GFP を発現させるプラスミドの両方を作成した。誘導的に発現を促すプラスミドは発現が弱く顕微鏡下での観察が困難であったが、アクチンプロモーターは非常に強く Nemuri-GFP を発現することが確認できた。また一過性の発現よりも利便性の高い Stable 細胞株も作成することに成功した。次に Nemuri-GFP の細胞内挙動を観察するために共焦点顕微鏡を用いて局在を確認したところ、細胞内で顆粒状の構造体を確認することができた。顆粒状の構造物は2種類あることも確認できた。一つは非常に強く蛍光を発する球状の構造体でもう一つは他の箇所より若干傾向が強くなっている球状の構造体である。

### Nemuri-GFP を精製する系の確立

細菌に対する Nemuri の作用を調べるため、イメージング用に Nemuri-GFP の精製に挑戦した。GFP を Nemuri の N 末端に付加したタンパク質の発現・精製は大腸菌を用いて行うことができなかったが、Nemuri の C 末端に GFP を付加した Nemuri-GFP の精製に成功した。また negative control として GFP のみの精製もおこなった。

### Nemuri とその相互作用因子が相分離に与える影響の検証

Nemuri 相互作用因子が Nemuri の液滴形成における役割を調べるため、まず相互作用因子の精製をおこなった。精製するのに困難を極める因子もあったが、相互作用因子の一つであるタンパク質修飾酵素は全長で大腸菌で発現・精製することに成功した。このタンパク質修飾因子の量を増やすことで Nemuri が白濁し沈殿していく過程が可視化された。このことからこの相互作用因子と Nemuri は液滴形成を促進するものと考えられる。