

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和6年4月1日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 自然科学研究機構 基礎生物学的研究所
職 名 教授
研究代表者 青木 一洋

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:)

1. 共同研究課題名	細胞増殖因子の蛍光バイオセンサーの開発				
2. 共同研究目的	細胞増殖因子を生きた細胞や組織、個体で可視化するための基盤技術開発を行う。これにより、上皮細胞増殖因子やインシュリンなどの細胞外分泌因子を定量的に可視化し、代謝関連疾患などの治療につなげる。				
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ~ 令和6年3月31日				
4. 共同研究組織					
氏 名	所属等		職名等		役 割 分 担
(研究代表者) 青木 一洋	自然科学研究機構 基礎生物学的研究所		教授		研究の統括、実施
(分担研究者) 遠山 藍夏 海老根 映美	同上 生命創成探究センター (基礎生物学的研究所 定量生物学研究部門)		総研大研究員 研究員		バイオセンサーの作成と評価 線虫を用いた実験・解析
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	生体膜機能分野		氏 名	佐藤 美由紀

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

- 1 成長因子バイオセンサーのデザイン: 成長因子の受容体の細胞外ドメインをセンサーとして用いる。EGFファミリーの成長因子とその受容体の結晶構造は知見が豊富であるので、EGF バイオセンサーをデザインする。結晶構造情報から、リガンドが結合したときに構造が大きく変化する受容体のループを同定し、そこにGCaMP6sに使われている円順列変異体の蛍光タンパク質(cpEGFP)を挿入したコンストラクトを作製する。
- 2 成長因子バイオセンサーのスクリーニング: デザインされたコンストラクトを用いて、受容体と円順列蛍光タンパク質の間のリンカー部位に飽和 PCR をかけて、さまざまなリンカー配列を持つバイオセンサーのライブラリーを作製する。これを出芽酵母、もしくは分裂酵母に遺伝子導入し、コロニーレベルで成長因子に対する応答を観察し、成長因子に対する高い応答を示すコロニーを選別する(1st スクリーニング)。次に、これらの酵母に導入されたリンカーの配列をシークエンスにより確認し、そのリンカーを含むバイオセンサーを培養細胞に導入して、成長因子に対する応答を確認する(2nd スクリーニング)。最も良い応答を示すバイオセンサーを採用する。
- 3 成長因子バイオセンサーを用いた成長因子の可視化: EGFセンサーを用いて、細胞集団運動時の成長因子の伝搬現象を可視化する。さらに線虫にセンサーを導入し、胚発生や生体内における成長因子の分布を可視化する。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

2023 年度は、本研究で開発する成長因子のバイオセンサーの開発と改良、特徴づけに注力した。上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)の細胞外ドメインに円順列変異体蛍光タンパク質(cpEGFP)を挿入したプロトタイプのバイオセンサーを複数種作製した。これらを HeLa 細胞に遺伝子導入したところ、いくつかのものは形質膜には局在せず小胞体に停留することが分かった。形質膜に局在することができたセンサーについて、EGF 刺激をしたところ、蛍光輝度が上昇するもの、変化しないもの、減少するものが存在した。これらの中で、一番応答するものを選別し、リンカー部位に飽和 PCR をかけ、さまざまなリンカー配列を持つバイオセンサーのライブラリーを作製した。これらを大腸菌にトランスフォームし、クローンを複数種類単離し、HeLa 細胞に遺伝子導入して EGF による蛍光輝度の変化を観察した。現在、20 クローンほど試したが、EGF による蛍光輝度の変化が小さいものが多く、スクリーニングの規模を広げる必要があると考えている。並行して、佐藤美由紀先生に青色光に応答する光遺伝学ツールを線虫に応用するための議論を行った。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
とくになし。

②この共同研究に基づくとの記載のある論文
とくになし。

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

第 46 回日本分子生物学会年会、円順列変異体蛍光タンパク質を用いた新規 ERK 活性センサーの開発、遠山 藍夏、後藤 祐平、尾納 隆大、鶴岡 樹、青木 一洋、2023 年 12 月 6 日

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)