

研究成果報告書の概要

講座等名	ゲノム編集部門	事業推進者名	福田 尚代
所属部門	がん部門		
分担研究課題	GFP ノックイン細胞を用いた細胞極性制御因子の時空間的発現解析		
キーワード	CRISPR/Cas9, exocyst, vesicle tethering		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			2名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <p>本研究課題は福田尚代が研究全体の遂行および総括を担う。徳弘圭造氏は実験結果の分析を行う。</p>			
<p>研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）</p> <p>Exocyst は Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 の 8 つのタンパク質から構成される複合体であり、exocytosis において分泌小胞を細胞膜へ繫留する因子である。これまでに exocyst の機能解析は主に出芽酵母で進められてきており、哺乳類の exocyst の機能は不明な点が多い。哺乳類細胞株では、exocyst subunit を過剰発現させると、タンパク質分解や局所異常を誘起するため、exocyst の細胞内局在変化を解析することは困難であった。そこで、マウス乳腺細胞 NMuMG を用いて CRISPR/Cas9 により exocyst subunit の C 末端領域に sfGFP, mScarlet1, Halo を挿入したノックイン細胞を樹立し、生細胞内での 5 つの内在性 exocyst subunit の可視化に成功した。樹立したノックイン細胞株を用いて高速撮影可能な全反射照明顕微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)により分泌小胞融合前後の内在性 exocyst subunit の挙動を詳しく解析した。その結果、(1) exocyst は 2 つの subcomplex から成り立っており、各々の subcomplex は細胞膜への移動能を持つこと、(2) 2 つの subcomplex の細胞膜への到達時間には極僅かな違いがあること、(3) Sec3 は小胞融合前に他の subunit から解離すること、(4) Single molecule counting 解析により、融合時には 1 つの分泌小胞に対して約 9 つの exocyst 複合体が存在することが明らかになった。本研究は、ゲノム編集技術を用いることで、哺乳類細胞における内在性 exocyst のダイナミクスを定量的に解析したものであり、exocyst 複合体の解離を捉えた初めての研究報告である。</p>			