

## 酸化チタンの光触媒能とリンカータンパク質 RPL2 を活用した神経細胞パターンニング

Surface modification in aqueous solution using  $\text{TiO}_2$  photocatalysis and immobilization

## of a scaffold protein using a linker protein RPL2 for patterning primary neurons

早大理工<sup>1</sup>, 早大高等研<sup>2</sup>, 早大ナノテ<sup>3</sup>, 広大先端研<sup>4</sup> ° 関根浩平<sup>1</sup>, 山本英明<sup>2,3</sup>, 池田 文<sup>4</sup>, 黒田章夫<sup>4</sup>, 谷井孝至<sup>1,3</sup>Waseda Univ.<sup>1</sup>, Hiroshima Univ.<sup>2</sup> ° K. Sekine<sup>1</sup>, H. Yamamoto<sup>1</sup>, T. Ikeda<sup>2</sup>, A. Kuroda<sup>2</sup>, T. Tani<sup>1</sup>

E-mail: h-yamamoto@ruri.waseda.jp

【背景】 細胞培養液中で基板表面の細胞親和性を局所的に改質することにより、接着細胞の伸展面積や遊走方向、さらには神経細胞の突起伸長経路を制御することができる[1]。私たちはこれまでに、酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )の光触媒作用を活用して、 $\text{TiO}_2$  表面の細胞接着阻害膜を培養液中において分解除去し、そこにコラーゲンなどの足場タンパク質を物理吸着させることで、基板表面の細胞親和性を局所的に改質でき、細胞の液中パターンニングに応用できることを示してきた[2]。しかしながら、初代神経細胞などの接着力の弱い細胞への応用を試みたところ、物理吸着した足場タンパク質の安定性が不十分で、神経細胞を接着させることができなかった。そこで、シリカや  $\text{TiO}_2$  に高い親和性を示すタンパク質 ribosomal protein L2 (RPL2; Si-tag)をリンカーとして用いることで、初代神経細胞の接着を支持するラミニン(Ln)を被改質領域に安定に固定し、さらにその領域に初代神経細胞を選択的に接着させることを試みた。

【実験方法】 スライドガラス表面に  $\text{TiO}_2$  膜(厚さ:約 120nm)をスパッタ法により成膜した。細胞接着阻害膜にはオクタデシルシラン単分子膜 (OTS SAM)を用い、表面を改質する直前に、基板を血清入り培地に一晩浸漬した。Protein A を融合させた RPL2(SpA-RPL2)[3]をウサギ由来抗 Ln 抗体および Ln と混合し、静置することにより、3 種タンパク質の複合体を形成させた(図 1 左)。所望の複合体が形成され、さらにこの複合体が  $\text{TiO}_2$  上に吸着することは免疫沈降法により確認した。細胞はラット海馬神経細胞を用い、Neurobasal 培地で培養した。

【結果・考察】 Ln-RPL2 複合体を結合させた  $\text{TiO}_2$  基板表面上では、培養開始から 2 週間以上に渡ってラット海馬神経細胞が安定に成長した。また、OTS SAM/ $\text{TiO}_2$  に対して蛍光顕微鏡の光学系で集光した紫外光(波長:365 nm もしくは 375 nm)を照射したところ、タンパク質複合体は光照射領域に選択的に吸着し、神経細胞を改質領域上にパターンニングすることができた(図 1 右)。未照射領域への非特異的な細胞接着はほとんど確認されなかった。RPL2 をリンカーとして用いて足場タンパク質 Ln が安定にパターンニングできるようになったことは、

$\text{TiO}_2$  の光触媒能を活用した液中表面改質技術が初代神経細胞にも応用できることを意味する。

本研究は、科研費・研究活動スタート支援(山本)、NEDO 産業技術研究助成(池田)ならびに日本板硝子材料工学助成会(谷井, 山本)の助成を受けて行われた。参考文献: [1] Yamamoto et al., Appl Phys Lett 99 (2011) 163701. [2] 出村他, 第 60 回応物春季学術講演会 (2013) 29a-G17-4. [3] Ikeda et al., Anal Biochem 385 (2009) 132.

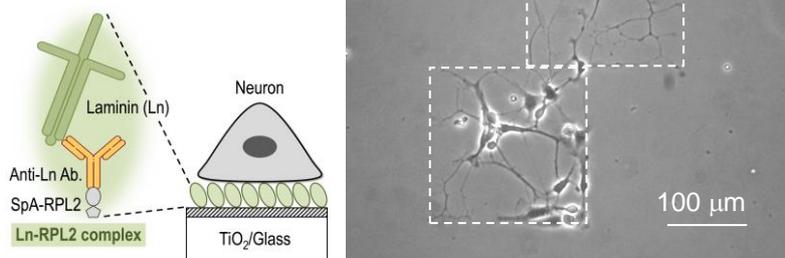


図 1. (左) 作製した Ln-RPL2 タンパク質複合体の模式図。(右) Ln-RPL2 タンパク質複合体を液中パターンニングした基板上で培養した神経細胞(培養 4 日目)。タンパク質複合体は、細胞の播種前に、タンパク質複合体の希釈溶液に基板を浸漬させながら集光した紫外光を照射してパターンニングした。