

固体表面に形成された細胞認識サイトのナノスケール分解能での可視化

Visualization of cell recognition sites formed on solid surfaces at nanoscale resolution

東京工業大学¹, 東京大学², [○]田原 寛之¹, 張 嶺碩¹, Evan Angelo Quimada Mondarte¹, 林智広^{1,2}

Tokyo Tech¹, U.Tokyo², [○]Hiroyuki Tahara¹, Ryongsok Chang¹, and Tomohiro Hayashi^{1,2}

E-mail: tahara.h.ab@m.titech.ac.jp, tomo@mac.titech.ac.jp

【緒言】培養細胞が生存・増殖するためには、足場となる接着性タンパク質内の細胞認識サイト (RGD 配列) に接着し伸展することが肝要となる。特殊な培養基材を除いて、培養液には動物由来の血清が添加されることが多い。これは増殖因子の供給の他に、血清に含まれる接着性タンパク質を基材表面に吸着させて足場とするためである。Huang らはナノパターニングされた基板に RGD を化学修飾し分布を見積もることで、細胞の接着量・形態が RGD 分布に依存することを示した[Huang et al, *Nano letters*, 2009]。一方で、吸着した接着性タンパク質や RGD の化学修飾により固体表面に形成された RGD 分布を直接評価する手法はなく、それらが細胞の接着量・形態に及ぼす影響を議論できなかった。本発表では、RGD 分布をナノスケール分解能で可視化する手法とともに、固体表面に形成された RGD 分布と細胞の接着量・形態の関係について報告する。

【実験方法】自己組織化単分子膜(SAM)の末端に $-\text{CH}_3$ ($\text{CH}_3\text{-SAM}$)、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ (EG1OH-SAM)、 $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ (SB-SAM)という異なる特性を持つ SAM 修飾基板をそれぞれ作製し、ウシ由来の血清を含むリン酸緩衝液に 37°C で一晚浸漬した。基板をリンス後、原子間力顕微鏡と抗 RGD ペプチドを化学修飾した探針を用いて接着力マッピングを行った。また同一条件で作製した基板上でヒト由来血管内皮細胞を培養した後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の接着量・形態を評価した。

【実験結果】図 1(a)に蛍光顕微鏡像と接着力マッピング像、図 1(b)に接着力マッピングから得られた RGD 分布と細胞接着量の関係を示す。接着力マッピング像は、基板上で RGD と抗 RGD ペプチドとの間に特異的な相互作用を検出した点を像に反映している。細胞の接着量、伸展度、RGD 分布はともに $\text{CH}_3\text{-SAM} > \text{EG1OH-SAM} > \text{SB-SAM}$ の順番で多かった(高かった)。これらの結果は、血清中から SAM 修飾基板に吸着した接着性タンパク質により形成されるナノスケールの局所的な RGD 分布を細胞が認識して、接着や伸展を行なっていることを示唆している。

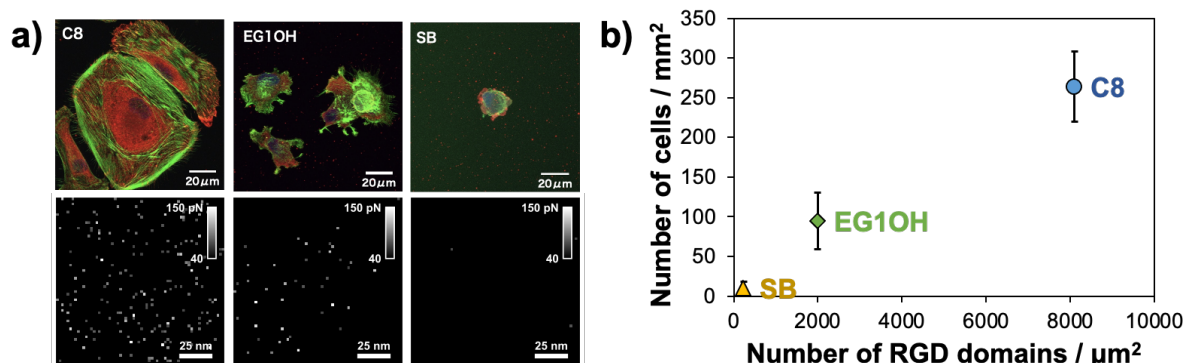


図 1 (a) 血清を吸着させた SAM 修飾基板上での蛍光顕微鏡像と接着力マッピング像 (b) 接着力マッピングから得られた RGD 分布と細胞接着量の関係