

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25880021

研究課題名(和文) 高効率液中表面改質法による機能的神経回路のin vitro再構成

研究課題名(英文) Improvement of in situ surface modification techniques for manipulating neuronal networks

研究代表者

山本 英明 (YAMAMOTO, Hideaki)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：10552036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：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、神経細胞の突起伸長経路を制御できる。これまでに、酸化チタン(TiO₂)の光触媒作用を活用して、表面の細胞接着阻害膜を培養液中において分解除去し、そこに足場タンパク質を物理吸着させることで、細胞を液中パターンニングできることを示してきた。しかし、神経細胞への応用を試みたところ、足場タンパク質の安定性が不十分で、細胞を接着させることができなかった。そこで、ribosomal protein L2 (Si-tag)をリンカーとして用いることで、タンパク質を被改質領域に安定に固定し、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。

研究成果の概要(英文)：Titanium dioxide (TiO₂) photocatalysis can be applied to pattern proteins and cells under aqueous solution. Here, we extended the application of this technique to pattern primary neurons. We employed ribosomal protein L2 (RPL2) to stably bind laminin to TiO₂. We found that a protein complex consisting of laminin/anti-laminin antibody/protein A-RPL2 is spontaneously formed by simply mixing the precursor proteins in solution phase, and that the surface coated with the protein complex supports stable growth of rat hippocampal neurons. Finally, we showed that the cells can be selectively grown on the protein complex patterned with the TiO₂-assisted method. The protocol established here is a unique combination of a top-down micropatterning of the surface using TiO₂ photocatalysis and a bottom-up self-assembly of biomolecules, which can be further applied to pattern a wide range of proteins and cells. (Sekine, Yamamoto et al., e-J Surf Sci Nanotechnol 2015)

研究分野：ナノバイオサイエンス

 キーワード：神経細胞 自己組織化単分子膜 酸化チタン TiO₂ 表面改質 バイオインターフェース Si-tag RPL

2

1. 研究開始当初の背景

脳機能の諸原理を工学の観点から理解するためには、その機能素子である神経細胞の回路としての集団的な活動様式を明らかにする必要がある。この目的のために我々は、数個の神経細胞からなる小さな神経細胞回路を、細胞培養系で自由自在に構築する技術の開発を行っている。神経細胞は信号伝達において受送信の整流性を有しており、軸索(送信)と樹状突起(受信)と呼ばれる2種類の神経突起を持つ。従って、基板表面に回路の鑄型構造を作り込んでおくだけでは、任意の回路を作らせることは難しい。そこで本研究では、ガラス基板上に配列させた神経細胞間を培養環境下で“配線”することによって、神経細胞回路を構築することを目指している。

2. 研究の目的

この課題を達成するために研究代表者らは、酸化チタン(TiO₂)の光触媒作用を用いた新しいバイオフィューズの改質法の研究を進めてきた(Yamamoto et al., Biofabrication 2014)。TiO₂は生体適合性が高く安定な材料であり、紫外光(UV)を照射すると表面に吸着した有機物を分解する光触媒作用を有する。細胞接着阻害性のコーティングを予め施しておいたTiO₂に集光したUV光を照射すると、基板表面の細胞親和性を局所的に改質できる。

これまでに、TiO₂薄膜の光触媒作用を活用することで、表面に成膜した有機シラン単分子膜を液中で分解し、3 μm程度の加工分解能で細胞親和性を改質でき、さらに神経様細胞株 PC12 のパターンニングが可能であることも確かめてきた。しかしこの方法では接着阻害膜を分解した後露出する領域の細胞親和性が低く、接着力の弱い初代培養神経細胞には適応が難しかった。

そこで本研究計画では、露出したTiO₂領域の細胞親和性を高めるために、SiO₂やTiO₂などの無機材料を認識するタンパク質 RPL2 (Taniguchi, Kuroda et al., Biotechnol Bioeng 2007; Ikeda, Kuroda, Colloids Surf B 2011)を導入する。RPL2 と接着分子ラミニン(Ln)とを融合したタンパク質 Ln-RPL2 を表面改質時に細胞培養液に添加することで、光改質した領域の細胞親和性を向上する(図1)。融合タンパク質 Ln-RPL2 の作製では、無機材料認識タンパク質としての RPL2 の機能を解明し、応用研究を展開している広島大学・黒田章夫教授、池田丈助教の協力を受けた。

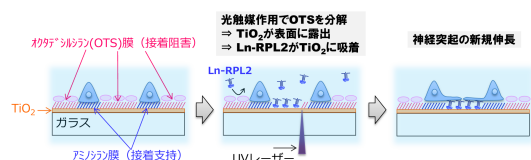


図 1. 酸化チタンの光触媒作用を応用した神経細胞のパターンニングプロセス

3. 研究の方法

スライドガラス表面にTiO₂膜(厚さ:約120 nm)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晚浸漬した。Protein Aを融合させたRPL2 (Ikeda et al., Anal Biochem 2009)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。所望の複合体が形成され、さらにこの複合体がTiO₂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 (Gibco)で培養した。

4. 研究成果

初めに、モデル分子として緑色蛍光タンパク質 GFP を融合させた RPL2 を用いて、RPL2 の TiO₂ 認識能と、TiO₂ 領域と OTS SAM 膜に対する RPL2 の選択性を調べた。GFP 単体に比べて RPL2 融合 GFP は、光改質により TiO₂ が露出した領域により多く吸着した。また周囲の OTS SAM 領域との選択性も高かった(図2)。OTS SAM と同じく、細胞接着を阻害する mPEG シラン SAM でも同様の実験を試みたが、OTS SAM よりも吸着の選択性が低かった。

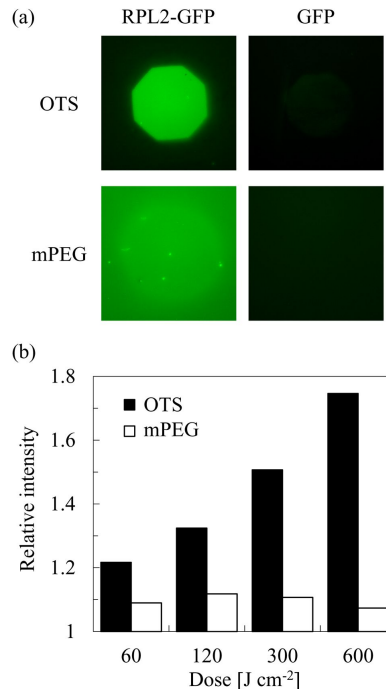


図 2. (a)UV 光照射により局所改質された SAM 膜/TiO₂ 基板へのタンパク質吸着。(b)八角形パターン内部の蛍光強度の定量評価。(Sekine et al., eJSSNT 2015 より転用)

続いて Ln-RPL2 複合体(図3(a))を作製し、所望の複合体が形成されていることを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確

認した(図 3(b), レーン 2; 広島大学 池田助教提供) Ln-RPL2 を結合させた 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(図 4). また, OTS SAM/ 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 5). 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.

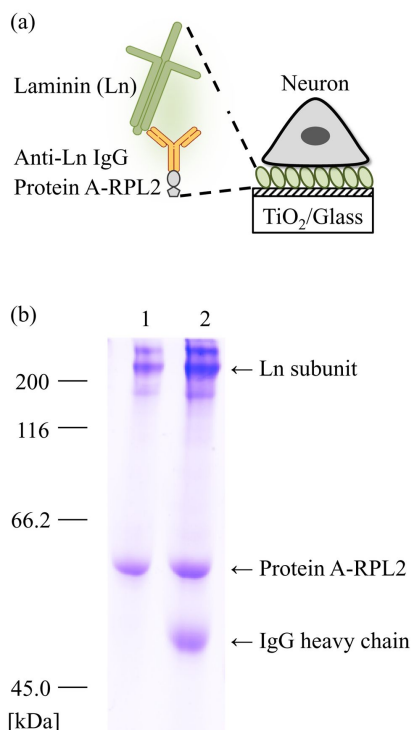


図 3. (a) Ln-RPL2 複合体タンパク質の模式図. (b) 形成させた複合体タンパク質の SDS-PAGE による評価. 完全な複合体(レーン 2) に比べて, 抗 Ln 抗体を除いた場合には, Ln の量が少ない. (Sekine et al., eJSSNT 2015 より転用)

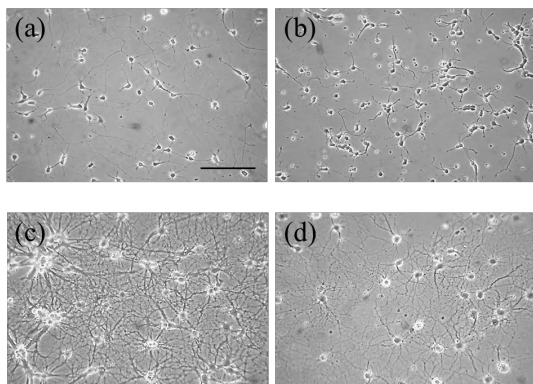


図 4. RPL2-Ln 複合体 (a,c) とポリリジン (b,d) コート基板表面上でのラット海馬神経細胞. 3 日間 (a,b), 16 日間 (c,d) 培養した

後に位相差顕微鏡で観察した.

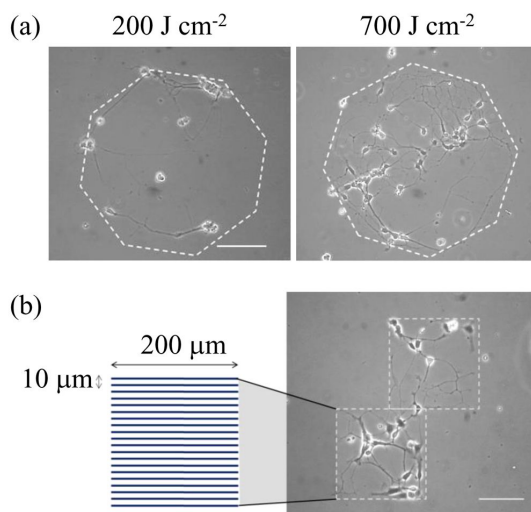


図 5. RPL2-Ln パターン基板上で培養したラット海馬神経細胞. 培養 4 日目. (a) 水銀灯の UV 光によるパターンニング. (b) UV レーザによるパターンニング. (Sekine et al., eJSSNT 2015 より転用)

このように 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, 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.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

H. Yamamoto, T. Demura, K. Sekine, S. Kono, M. Niwano, A. Hirano-Iwata, T. Tanii. Photopatterning proteins and cells in aqueous environment using TiO_2 photocatalysis. J. Vis. Exp. (in press). (査読有; 招待論文)

K. Sekine, H. Yamamoto (責任著者), S. Kono, T. Ikeda, A. Kuroda, T. Tanii: Surface modification of cell scaffold in aqueous solution using TiO_2 photocatalysis and linker protein L2 for patterning primary neurons. e-J. Surf. Sci. Nanotechnol. 13 (2015) 213-218. (査読有)

H. Yamamoto, T. Demura, M. Morita, S. Kono, K. Sekine, T. Shinada, S. Nakamura, and T. Tanii: In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalytic decomposition of organosilane monolayers. Biofabrication 6 (2014) 035021. (査読有)

〔学会発表〕(計 21 件)

H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, M. Niwano, T. Tanii: Single-cell micropatterning techniques for engineering neuronal networks in vitro. 3rd RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Tohoku University (Miyagi, Japan), 2015 年 2 月 18 日.

H. Yamamoto, T. Tanii, M. Niwano, A. Hirano-Iwata: Spontaneous activity patterns of micropatterned neuronal networks in culture. 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014), Ehime University (Ehime, Japan), 2014 年 12 月 5 日.

S. Kono, H. Yamamoto, K. Sekine, T. Tanii: In Situ Modification of Cell-Culture Scaffolds by Photocatalytic Decomposition of Organosilane Monolayers on Titanium Dioxide. 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structural Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5), Tokyo Medical and Dental University (Tokyo, Japan), 2014 年 11 月 19 日.

H. Yamamoto, S. Kono, T. Kushida, A. Hirano-Iwata, M. Niwano, T. Tanii: Optimization of micropattern geometry for long-term culture of isolated neurons and identification of excitatory-inhibitory cell types. Neuroscience 2014, Washington, D.C. (USA), 2014 年 11 月 18 日.

K. Sekine, H. Yamamoto, S. Kono, T. Ikeda, A. Kuroda, T. Tanii: Surface modification in aqueous solution using TiO₂ photocatalysis and a linker protein L2 for patterning primary neurons. 7th International Symposium on Surface Science (ISSS-7), Shimane Prefectural Center (Shimane, Japan), 2014 年 11 月 3 日.

山本英明, 谷井孝至, 庭野道夫, 平野愛弓: 培養神経細胞・神経回路操作のための表面マイクロ加工技術. 第 52 回日本生物物理学会年会(招待講演), 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市), 2014 年 9 月 25 日.

関根浩平, 山本英明, 池田 丈, 黒田章夫, 谷井孝至: 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. 第 61 回応用物理学会春期学術講演会, 青山学院大学(神奈川県, 相模原市), 2014 年 3 月 18 日.

山本英明, 谷井孝至: 表面ナノ改質技術を活用した培養神経回路の構造・機能制御. 生物物理学会北海道支部 支部講演会, 北海道大学(北海道, 札幌市), 2014 年 3 月 6 日.

H. Yamamoto, T. Tanii: Intrinsic activity of defined neuronal networks in culture. 2nd RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Tohoku University (Miyagi, Japan), 2014 年 2 月 21 日.

T. Tanii, H. Yamamoto. Fabrication of novel cell chips using in-situ surface modification. Collaborative Conference on Materials Research (CCMR) 2013, Jeju Island (Korea), 2013 年 6 月 24 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

査読無論文

山本英明, 谷井孝至: 機能性分子のナノパターンニングによる生体分子検出と細胞操作. Molecul. Electron. Bioelectron. 24 (2013)

266-271.

ホームページ等

<http://www.fris.tohoku.ac.jp/fris/organization/creative/yamamotoHideaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英明 (YAMAMOTO, Hideaki)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・
助教
研究者番号：10552036

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし