

研究テーマ：走査型プローブ顕微鏡による細胞表層における生体相互作用マッピング	
研究代表者（職氏名）：講師・吉野智之	所属：生命環境学部生命科学科
共同研究者（職氏名）：	

動脈硬化の原因のひとつである変性 LDL (変性低密度リポ蛋白質)が、スカベンジャー受容体(LOX-1)により細胞内に取り込まれる過程は顕微学的に明らかにされていない。これまでの SPM による顕微学的研究において、LOX-1 と AcLDL (アセチル化 LDL ; 変性 LDL の 1 種) が 1 対 1 で結合しているような結果が得られておらず、逆に AcLDL の凝集が予測される知見が得られおり、詳細は不明なところが多い。

そこで、本研究では、SPM(走査型プローブ顕微鏡)プローブを AcLDL で修飾したバイオセンサプローブを作製し、細胞表層の LOX-1 との相互作用による吸着力測定を行った。

①細胞の培養

CHO 細胞(理化学研究所細胞材料リソースセンター)および独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域機能分子設計ユニットにより確立された蛍光蛋白質(CFP)を結合させた LOX-1 の遺伝子を導入し CFP-LOX-1 を低発現させた細胞である CHO:T 細胞を試料とした。

SPM測定用には、洗浄、滅菌したカバーガラス上に 1.5×10^3 個/ml の CHO:T 細胞濃度を 400 μ l 播種し、37 $^{\circ}$ C で 2 日間培養した細胞を用いた。

②バイオセンサプローブによる相互作用の測定

SPM により、CHO 細胞および CHO:T 細胞を液中用プローブ(オリンパス製 OMCL-TR400PSA)および AcLDL で修飾したバイオセンサプローブを用いて、F12 溶液中で相互作用の可視化を行った。本研究では、バイオセンサプローブが細胞表面と相互作用がなくなる(離れる)距離を測定することにより吸着力の強弱を示した。

測定の結果、特異的吸着がないと考えられる液中用プローブおよびバイオセンサプローブと CHO 細胞、液中用プローブと CHO:T 細胞との組み合わせのそれぞれの移動距離は最大でも 90nm、40nm および 10nm であった。一方、特異的吸着があると考えられるバイオセンサプローブと CHO:T 細胞の吸着による移動距離は約 240nm と大きかった。特異的吸着力がない組み合わせの場合は、100nm 以下の移動距離であり、これは、SPM プローブのバネ定数の代表値 0.08N/m で概算すると、8nN の範囲である。一方、バイオセンサプローブの吸着力は、19.2nN の範囲であることがわかった。これらの結果から、バイオセンサプローブによる細胞膜に発現している受容体 LOX-1 との相互作用の可視化できることがわかった。

さらに、吸着力は一様ではなく、強い吸着が見られた部位は、AcLDL と LOX-1 が大きく相互作用し、弱い吸着部位は、何らかの相互作用があるものの非特異的な相互作用であると考えられる。これらの吸着力を概算すると、特異的吸着力部位と非特異的吸着力部位との移動距離の差は 4nm 程度で吸着力は 300pN であった。

本年度で達成した相互作用測定法は、生体分子の単純な可視化のみならず、形状の位置情報と合わせることにより生理活性がナノレベルで解析可能になる。その位置情報により、蛋白質をはじめとする特定の物質の解析が行える効果がある。今後、さらに、この相互作用の力の正確な定量性を求めるためのシステムの開発を行う予定である。