

※課題番号 : F-12-UT-0027
※支援課題名 (日本語) : 細胞の自己組織化現象の操作と理解
※Program Title (in English) : Manipulation and Understanding of Self-Organization Process in Cells
※利用者名 (日本語) : 澤井 哲
※Username (in English) : Satoshi Sawai
※所属名 (日本語) : 東京大学大学院総合文化研究科
※Affiliation (in English) : Department of Arts and Sciences, University of Tokyo

※概要 (Summary) :

単細胞生物がえさを探索する場合や、多細胞生物の発生過程での組織形成、免疫応答、創傷治癒といった様々な場面で細胞は運動する。このように細胞運動は生物の普遍的現象のひとつであるが、近年、細胞運動を司る細胞内分子群が基質と接着する細胞膜基底面上で自己組織化的な構造を形成していることがわかり、その時空間動態が細胞の自発運動を司るメカニズムではないかと注目を集めている。本研究では、細胞の置かれた局所環境によって細胞の自己組織化パターンと自発運動がどのように振る舞うかを調べた。

※実験 (Experimental) :

障害物が多い環境中での細胞の自発運動と自己組織化パターンの振る舞いを調べるため、20 から 250 μm 幅の矩形または円形が正方格子に並び、深さ 50 μm 程度のパターンをもつ 2 \times 2cm のチャンバを作製した。まず、シリコン基板上に電子線レジスト (OEPR-CAP112) を 1.5 μm 厚にスピコートし、高速大面積電子線描画装置を用いて基板上にパターンを描画した。クリーンドラフト (潤沢超純粋付) 内で現像の後、シリコン深掘りエッチング装置を用いて、Bosch 法による Deep reactive ion etching (DRIE) によってシリコン基板を深堀することで深さ 50 μm のチャンバを作製した。一度の描画で複数のチャンバパターンを描画することができるので、ステルスダイサーを使って基板を切断し、各々のチャンバに分割した。

細胞基底膜上でみられる走化性関連因子の自己組織化パターンの観察は以下のように行った。細胞性粘菌 AX4 にリン脂質シグナリングに関わる細胞内タンパク質 CRAC (Cytosolic regulator of adenyllyl cyclase) の PH ドメインに RFP が付加されたタンパク質 (PHcrac-RFP) を発現させた細胞を 3-4 時間飢餓処理 (細胞密度 2×10^7 cells/ml in Developmental Buffer, 155rpm 下で震盪) した。飢餓処理後、細胞密度

2×10^5 cells/ml に希釈した細胞懸濁液 50 μl をシリコンチャンバに滴下し、上からカバーガラス (Matsunami, No.1) をのせた。軽く押し付けて余分な溶液を拭き取り、細胞をチャンバ内に封入した。チャンバをガラス面が下になるように顕微鏡ステージにのせ、倒立型の共焦点顕微鏡下でガラス上での自発的細胞運動と自己組織化パターンの振る舞いをタイムラプス観察した。障害物がない場合の細胞の振る舞いをみるため、カバーガラスにフレイムシール (BioRad) を貼って作製した 1 \times 1cm の大きさを持つウェルに細胞懸濁液を滴下して同様に観察をおこなった。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

観察面を細胞の基底面上にあわせてタイムラプス観察したところ、PHcrac-RFP の 2 次元的な自己組織化波を観察することができた。細胞が障害物のない環境下で自由に動ける場合、波はどの方向にもランダムに伝搬し、細胞の端に到達した波が細胞膜を押し出して仮足を形成した。一方、シリコンチャンバに閉じ込められ細胞の片側がシリコンの壁に接した細胞では、PHcrac-RFP 波はシリコンの壁に衝突しても膜を押し出すことができないため、そこで波が消失したり、壁にそって波が伝搬した。その結果、細胞は壁にそって移動した。今後、障害物の有無による自己組織化波の生成、伝搬の解析をすすめ、細胞基底面の自己組織化波による細胞の物理環境知覚と自発運動の関係についての理解を進める。

※その他・特記事項 (Others) :

なし

共同研究者等 (Coauthor) :

中島昭彦 (総合文化研究科広域科学専攻 特任研究員)
島田奈央 (総合文化研究科広域科学専攻 助教)