A207 AFM を用いた骨系細胞における膜タンパク質検出技術の開発

Development of membrane protein detection methods on bone cells using AFM

学 ○玉木 嵩人 (京大・工)
正 安達 泰治 (京大・再生研)

正 韓 成雄 (京大・再生研)

Takato TAMAKI, Dept. of Mechanical Engineering and Science, Kyoto Univ., Kyoto, 606-8507 Japan
Sung-Woong HAN, Inst. for Frontier Medical Sciences, Kyoto Univ.
Taiji ADACHI, Inst. for Frontier Medical Sciences, Kyoto Univ.

Key words : Osteocyte, Osteoblast, AFM, Membrane protein, Force spectroscopy

1. 緒言

紡錘形状を示す骨芽細胞は、骨表面に存在し骨形成を担う。一方、細胞突起を多数持つ骨細胞は、骨芽細胞から分化し、骨基質中において骨に対する力学負荷を感知する⁽¹⁾。このように、骨芽細胞から骨細胞への分化によって、細胞形状や、それに伴う細胞機能は大きく変化する。従って、骨系細胞の分化段階を明らかにし、その機能の発現や消失がどの分化段階において生じるのかを解明することは、骨リモデリングを理解する上で非常に重要な課題である。

本研究では、骨系細胞における分化段階の新たな分類技術の開発を目的とした。その第一歩として、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)のフォーススペクトロスコピー法を用いて、骨細胞に特異的に発現する膜タンパク質 Phex を検出し、分化に伴う発現レベルの変化を評価した。また、得られたフォースカーブより細胞剛性を算出し、細胞形態に伴う細胞の力学特性の変化を評価した。

2. 実験方法

2-1 骨細胞の単離

17 日齢のニワトリ胚より採取した頭蓋冠から骨細胞を単離した。まず、採取した頭蓋冠を 2-5 mm 角に鋏を用いて裁断した。裁断した頭蓋冠を Bone isolation buffer を溶媒とする 1 mg/ml collagenase type I 溶液中において振盪培養し、骨膜と共に骨表面の細胞を除去した。次に DPBS を溶媒とする Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (5 mM) により振盪培養を行い、骨基質を脱灰した。再度、collagenase 溶液で振盪培養を行うことで、骨基質と細胞の結合を担うコラーゲン繊維を除去し、細胞を遊離させた。

得られた液体培地に、α-MEM を溶媒とする 0.25% NaCl を加え 1 時間静置することで、血球細胞を死滅させた。その後、直ちに α-MEM を加えて溶液の遠心分離を行い、上澄み液を除去して再び α-MEM を加えることで、単離した骨系細胞を含む液体培地を得た。単離した骨細胞は、 $\phi = 35$ mm Glass Base Dish with Grid(Iwaki)に $1.0\text{--}2.0 \times 10^4$ cells/dish の細胞密度で播種し、3-5 時間培養した。

遠心分離は全て 1200 rpm で 5 分間、骨細胞の培養は温度 37 °C、湿度 100%、5% CO₂ in air の環境下で行った。また、Glass Base Dish は、あらかじめ 20 µg/ml poly-D-lysine (Sigma-Aldrich)、および、20 µg/ml fibronectin (Chemicon Int.) で二重にコーティングしたものをを用いた。

2-2 OB7.3 修飾 AFM 探針の作製

AFM 探針表面に Phex に特異的に結合する抗体 OB7.3 を結合させるため、化学修飾を行った。まず、AFM 探針を Milli-Q を用いて洗浄し、その後オゾンクリーナーを用いて酸化させた。次に 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS) を用いてシラン化し、架橋剤である NHS-PEG-Mal (MW:

5000 Dalton) を用いて、OB7.3 を AFM 探針に固定した。

2-3 骨系細胞の形態による分類

紡錘形の骨芽細胞は、分化と共に細胞突起を獲得し、星形の骨細胞へと至る。従って細胞形態は細胞の分化段階を表す指標の 1 つと考えることができる。本研究では、この細胞形態に着目することにより、骨系細胞を (i) 細胞突起を有しない細胞 (Osteoblast)、(ii) 細胞突起を有し、かつその突起に分歧が存在する細胞 (Osteocyte)、および (iii) (i)、(ii) いずれの条件も満たさないもの (pre-Osteocyte) の 3 種類に分類した。

2-4 フォーススペクトロスコピー

OB7.3 を修飾した AFM 探針を単離した骨系細胞の表面にアプローチし、フォースカーブを取得した。フォースカーブとは、AFM の探針に加わる力を縦軸に、細胞に対する押し込み距離を横軸にプロットしたものである。フォースカーブの測定は骨系細胞の核近傍領域に対して行った。フォースカーブは、押し込み過程と引き離し過程の 2 段階に分類することができる。まず、引き離し過程におけるフォースカーブより、分子間の結合を破断するために必要な破断力を測定し、そのヒストグラムを作成した。ヒストグラムにガウス関数を用いたフィッティングを行い、Phex と OB7.3 間の結合破断力の分布を明らかにした。また、押し込み過程におけるフォースカーブより、骨系細胞の核近傍領域における細胞剛性の評価を行った。AFM の探針と試料との間に働く力 F は、

$$F = E \tan \alpha \delta^2 / \sqrt{2} (1-\nu^2) \quad (1)$$

で示される Hertz model により算出することができる。この Hertz model を用いて、細胞体部における弾性係数を算出した。ここで、 E はヤング率、 ν はポアソン比 (0.5)、 α は探針の面角、 δ は押し込み距離である。

3. 実験結果および考察

3-1 フォーススペクトロスコピー法を用いた Phex の検出

Fig. 1 (a) に、Osteoblast に対して測定を行った場合、(b) に osteocyte に対して測定を行った場合の典型的なフォースカーブを示す。AFM 探針に修飾した OB7.3 と、細胞膜上の Phex タンパク質が結合する場合には、Fig. 1 (b) のような結合破断力 f が測定される。形態により分類した骨系細胞に対してフォースカーブ測定を行うことにより、結合破断力 f のヒストグラムを作成した (Fig. 2)。さらに、これらのヒストグラムに対してガウス関数を用いたフィッティングを行い、ピーク値を算出した。Fig. 2(a) より、Osteoblast に対して測定を行った場合、ピークは一つ観察され、そのピーク値は 34 pN であった。このピーク値を、非特異的な相互作用の最頻破断力であると判断した。次に Fig. 2(b), (c) より、pre-osteocyte および osteocyte に対して測定を行った場合、ピ

ークは三つ観察された。Fig. 2(a)の結果より、最も小さいピーク値を非特異的な結合の最頻破断力であると判断した。従って、二番目に小さいピーク値を一分子結合の最頻破断力、三番目に小さいピーク値を二分子結合の最頻破断力であると判断した⁽²⁾。これらのことから、本実験手法により、OB7.3 と Phex の特異的な結合が測定可能であることが明らかとなった。

Fig. 1 Typical force curves.

(a) Osteoblasts.

(b) Pre-osteocytes.

(c) Osteocytes.

Fig. 2 Histograms for rupture forces f of non-specific adhesion of (a) osteoblasts and OB7.3/Phex bindings of (b) pre-osteocytes and (c) osteocytes. The histograms were fitted by Gaussian distribution function.

Table 1 Rate of the interaction detection.

	Rate [%]
Osteoblast	0.2
Pre-osteocyte	11.0
Osteocyte	37.6

Table 2 Stiffness of bone cells.

	Elastic modulus [kPa]
Osteoblast	15.5 ± 1.9 ($n=5$)
Pre-osteocyte	10.4 ± 3.2 ($n=10$)
Osteocyte	6.8 ± 1.0 ($n=5$)

3-2 Phex の検出頻度

第3-1節の結果をもとに、OB7.3とPhexの相互作用を示すと考えられる結合破断力の全測定試行回数に対する検出頻度を算出した (Table 1)。Table 1より、検出頻度は osteoblast から osteocyte への分化に伴い増加することが示された。これは、分化段階が進むにつれて Phex が徐々に発現することを示している。この結果は、骨系細胞における Phex の発現レベルの蛍光観察結果⁽³⁾と一致する。

3-3 細胞剛性

得られたフォースカーブにより算出した各骨系細胞の核近傍領域における細胞剛性を Table 2 に示す。Table 2より、分化が進行するにつれて、骨系細胞の細胞剛性は小さくなることが示された。骨芽細胞では細胞内部にアクチンフィラメントが配向し、ネットワーク構造が形成されるのに対し、骨細胞の細胞体部では同様の構造は形成されない⁽⁴⁾。従って、細胞剛性が減少した原因は、このような分化に伴う細胞内部の細胞骨格構造の変化であると考えられる。

以上のことから、AFM を用いた骨細胞に特異的に発現するタンパク質 Phex の検出、および核近傍領域における細胞剛性の測定、いずれの実験手法においても、分化に伴う状態の変化を評価可能であることが示唆された。

4. 結言

本研究では、AFM を用いて、膜タンパク質 Phex と OB7.3 の相互作用測定および骨系細胞の核近傍領域における細胞剛性の評価を行った。その結果、骨芽細胞から骨細胞へと分化が進むことによって、Phex の検出頻度は増加し、細胞剛性は小さくなることが示された。これらのことから、AFM を用いた本実験手法により、骨系細胞の分化段階の分類が可能であることが示された。本実験手法は、測定による細胞への影響が小さく、かつ連続的に測定可能であるという点で、分化段階の分類手法として非常に有用であると考えられる。今後、さらなる詳細な分化段階を明らかにしていくために、フォースカーブの定量的な解析手法の開発を進めることが重要である。

本研究は一部、日本学術振興会「最先端・次世代研究開発支援プログラム」(LR017)による援助を受けた。記して謝意を表する。

参考文献

- (1) A. Miyauchi, K. Notoya, Y. Mikuni-Takagaki, et al., J Biol Chem, 275, (2000), 3335-3342.
- (2) Odorico, M., Teulon, J.M., Bessou, T., et al., Biophysical Journal, 93, (2007), 645-654.
- (3) Y. Sugawara, Ando, R. Kamioka, H. et al., Bone, 43, (2008), 19-24.
- (4) Kamioka, H., Sugawara, H., Honjo, T., et al., J Biol Chem, (2004), 471-478.