

L19

RGD 配列と基板への固定化部位を有するタンパク質の開発とその性能評価

(九大工)○(学)福田 貴之・(九大院工)(学)久保 孝文・(学)堺 淳一・(正)武井 孝行・
(正)境 慎司・(正)井嶋 博之・(正)川上 幸衛

【緒言】生物学、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの分野に貢献できる新たなバイオアッセイ法として細胞アレイ技術が注目されている。しかしながら、通常の単層培養における臓器特異的な細胞機能発現の低さや、スフェロイド培養における個々の細胞の培養環境の相違の解決が大きな課題である。これに対して我々はインテグリンの認識配列である RGD (Arg-Gly-Asp) 配列とポリエチレンジリコールからなる PEG-GRGDS による初代肝細胞の浮遊（非接着）培養技術を開発した。これにより、立方的な生体肝類似の球状の肝細胞培養が可能となった。そこで本研究では上記浮遊培養技術の実用化を目指し、球状細胞を任意配置することを目的としたアプローチを試みた。

【実験方法】細胞接着性ペプチドである GRGDS と基板への固定化部位として His タグもしくは Cys を両端に有する強化緑色蛍光タンパク質を作製した (GRGDS-EGFP-His/C)。当該分子は pGEX-6P-3 を用いてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として大腸菌 (BL21) により生産し、精製後実験に供した。また、GRGDS-EGFP-His/C 固定化基材として Ni イオンプレチャージ担体、Ni-NTA (nickel- nitrilotriacetic acid) 固定化基材もしくは Pt を蒸着させたガラス基板を用いた。一方、細胞接着性評価には二段階コラゲナーゼ灌流法により取得した初代ラット肝細胞を用いた。

【結果と考察】発現誘導後(精製前)のタンパク質は約 56 kDa で、精製後は GST 部が切断されて約 28 kDa となる (Fig.1)。また、GRGDS-EGFP-His および GRGDS-EGFP-C はそれぞれ Ni キレート基材および Pt 蒸着ガラス基板への固定化が可能であることが EGFP による蛍光を観察することで示唆され

た (Fig.2, Fig.3)。GRGDS の細胞接着性は肝細胞培養後、足場認識による細胞の付着・伸展の様子を観察することでの評価を試みたが、明確な結果は得られなかった。今後は細胞の RGD 認識に必要なタンパク質濃度、固定化密度の最適化を行う予定である。

【結言】

- 大腸菌を宿主とした目的のタンパク質生産ができた。
- 目的のタンパク質を基材に固定化できる可能性がある。

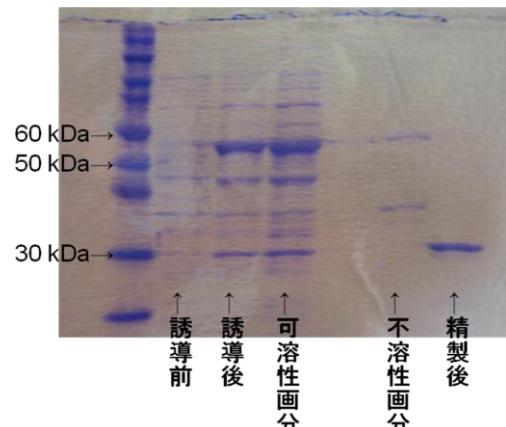
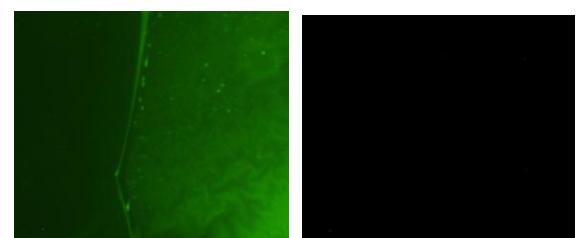
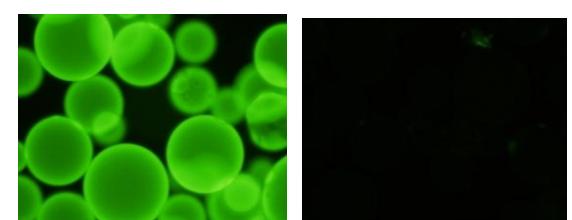


Fig.1 SDS-PAGE



(a)GRGDS-EGFP-C+buffer (b)bufferのみ

Fig.2 Pt 被覆ガラス基板



(a)GRGDS-EGFP-His (b)GRGDS-EGFP

Fig.3 Ni キレート基材