

平成 30 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02226

研究課題名(和文) オンチップ細胞計測を基盤とする光合成細胞の外部刺激応答特性の解明

研究課題名(英文) Investigation of Responsive Characteristics of Photosynthetic Cells against Environmental Stimuli by On-chip Cell Measurement

研究代表者

新井 史人(Arai, Fumihito)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90221051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：藍藻(Synechocystis sp. strain PCC6803)への外部刺激に対する細胞応答を計測するためのオンチップ細胞計測基盤を確立した。微細加工技術を用いて、マイクロ流体チップに、細胞を変形する加圧プローブと力計測用センサプローブを有するマイクロ・ナノロボットを組み込み、プローブの位置制御および力計測を安定に行うことが可能となった。このシステムを用いて、異なる浸透圧条件に置かれた藍藻の正常株と機械刺激受容性チャネルの遺伝子不活化株に対して浸透圧条件の違いで、細胞サイズと硬さの指標である等価ヤング率を評価した。浸透圧の変化に対する機械刺激受容性チャネルの役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established an on-chip cell measurement system, which can measure cell response to the external stimulus to *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Micro-nano robot was integrated with the microfluidic chip having pushing probe and force sensor probe by using micro-nano fabrication technology. We can position the tip of pushing probe and measure the force with sufficient stability. By using this measurement system, we could measure the force and deformation and compare the Young's moduli of two groups; a group of wild type cells and a group of mutant (genetically modified) cells with a defect in the mechanosensitive (MS) channels, at three different osmotic concentrations. The results showed that the Young's modulus of each group changed according to the osmotic concentration, while changes in cell size were too small to be detected. These results confirmed that the proposed evaluation method provides an understanding of the physiological function of MS channels.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 超精密計測 ナノバイオ 機械力学・制御 バイオ関連機器 藍藻 力計測 光ピンセット

1. 研究開始当初の背景

細胞は、外界の浸透圧が下がると破裂し、死に至ってしまう。このため、イオン輸送体を用いてイオン等を流出させることにより細胞内の浸透圧を下げ、それ以上の水の流入を防ぐ適応機構が備わっている。藍藻の生体膜にはイオン輸送体が発現している。例えば、イオン輸送体の一つである機械刺激受容性チャネル(mechanosensitive channel, MscL)は、細胞の浸透圧調節および生体膜のテンションの調節に必須と考えられている。これまで、MscLの機能解析はパッチクランプ法でイオン排出を測定する実験が行われていたが、実際に細胞の容量変化を示す実験は行われておらず、細胞の容量変化へのMscLの影響を考察させるデータも示されていなかった。我々は、MscLや水輸送の通路となる水チャネル(AqpZ)を対象として、これらを欠損した遺伝子不活化株を遺伝子操作によって作成し、これらを正常株と一細胞レベルで比較できる実験系を構築した。この系を用いて遺伝子不活化株の細胞の体積変化を調べ、特定の遺伝子の役割を世界で初めて明らかにした(J. Bacteriol., 2012①)。さらに、細胞への浸透圧刺激に対する細胞の体積変化をリアルタイムに評価することで、Ktr系K輸送体とKdp系K輸送体の機能の違いを世界ではじめて明らかにした(J. Bacteriol., 2014②)。

しかし、浸透圧刺激に対する細胞の力学的応答の計測は困難であった。特に、藍藻は大きさ約2 μm程の小さな細胞であり、環境が変化する前後で細胞の機械特性を評価することは困難であった。このような、外部刺激に対する細胞応答の仕組みに関する新しい知見は、生物学の発展に寄与すると考えられる。そこで本研究では、マイクロ流体チップとロボットをオンチップで統合し、藍藻に外部刺激として、浸透圧変化を与え、その前後の機械特性の変化を計測することを目的とした。本研究は、藍藻に浸透圧刺激を加えた際の機械特性である硬さを評価し、遺伝子の機能を特定するものである。

2. 研究の目的

生物は、環境変化などによる外部刺激によって代謝の変化を伴いながら、環境に適応する機能を有する。しかし、大きさ2 μm程度の小さな細胞の評価は困難であり、その機能の多くは未解明なままであった。このため本研究は、マイクロ流体チップとロボットをオンチップで統合し、光合成細胞である藍藻 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 に外部刺激として、浸透圧変化を加え、その前後の機械特性を計測して評価することで、応答特性を解明することを目的とする。

これを達成するために、藍藻への外部刺激に連動した細胞応答を計測するためのオンチップ細胞計測基盤を確立する。マイクロ流体チップに、細胞を変形するための加圧プロ

ーブと力計測用のセンサプローブを有するマイクロ・ナノロボットを組み込む。微細加工基盤を確立することで、プローブの位置制御および力計測を安定に行う。プローブは、チップの弾性要素を直接駆動する方式により精密位置決めし、藍藻の機械特性を力センサにより計測する。

このシステムを用いて、藍藻の正常株と機械刺激受容性チャネルの欠損株(遺伝子不活化株)に対して浸透圧条件の違いで、細胞サイズと硬さの指標である等価ヤング率を評価する。このような、分子生物学的手法に基づいて用意した遺伝子不活化株を正常株と比較することで、特定遺伝子の機能を調べることが目的とする。

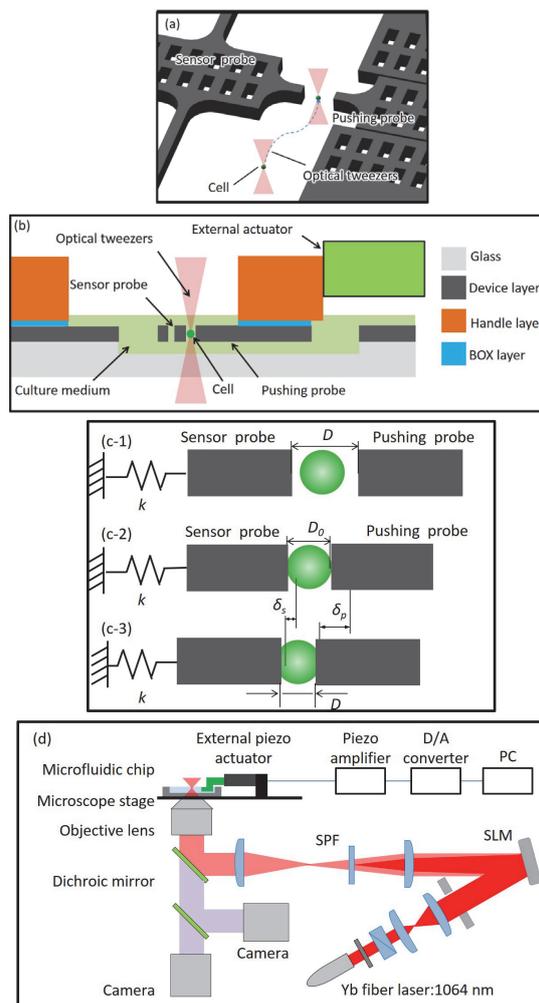


図1 計測システム

3. 研究の方法

図1に構築した計測システムを示す。図1(a)は概念図を示す。藍藻は光ピンセットで直接トラップして操作し、マイクロ流体チップ内に組み込まれた加圧プローブとセンサプローブの間に搬送する。藍藻を両プローブ間で挟むことで、力計測を行う。図1(b)は計測システムのチップ断面の概念図である。藍藻は培養液中で操作、計測される。マイクロ流体チップはSOIウェハの微細加工により作

製した。プローブはSOI ウェハのデバイス層に形成し、ガラス基板にボンディングした。これにより、操作、計測状況を光学顕微鏡で観察可能である。加圧プローブはSOI ウェハのハンドル層に接続され、これをチップ外部のピエゾステージで駆動することで、加圧プローブを精密に位置制御できる。図1(c)は両プローブで藍藻を挟んで力印加により変形する概念図である。図1(d)は計測システム概念図である。また、図2は、センサプローブの概念図を示す。SOI ウェハのデバイス層に形成する微小な弾性梁が変形することで、力が計測できる。

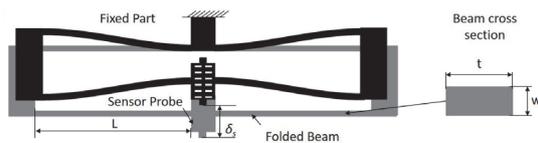


図2 センサプローブの概念図

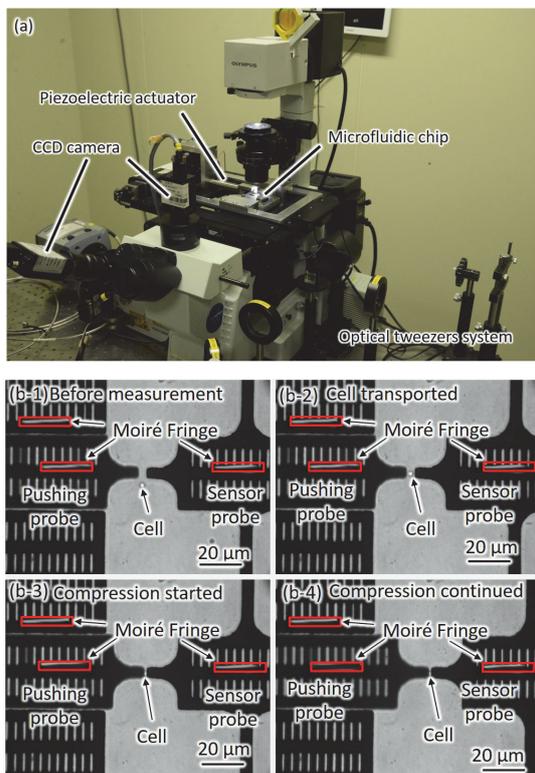


図3 藍藻の計測実験の様子

図3(a)は、構築した計測システムの外観である。図3(b)は、藍藻を光ピンセットで搬送し、両プローブ間に挟んで力計測している様子である。光ピンセットによりオンチップで藍藻を計測ポイントに搬送して力学的特性を繰り返し計測するシステムが構築できた。各プローブの位置はモアレ干渉計測により独立して計測できるようにした。モアレ干渉縞の計測条件を改良して位置決め分解能の改良し、ノイズレベル 4.7 nm (3σ) を達成した。これにより、力計測の分解能を 150

pN まで向上できた。これは従来研究と比較して大きな飛躍である。

また、力センサの理論的なバネ定数は 0.03444 N/m とした。力センサのキャリブレーションは Polydimethylsiloxane (PDMS) を材料とする大きさ約 $3\ \mu\text{m}$ のマイクロビーズを自作し、これを変形することにより行った。PDMS のヤング率を計測した結果、1.15 MPa となり、これから力センサのバネ定数は実験的に $0.03426\ \text{N/m} \pm 0.0017\ \text{N/m}$ となった。

このシステムを用いて、藍藻の正常株と機械刺激受容性チャンネルの欠損株（遺伝子不活化株）に対して浸透圧条件の違いで、細胞サイズと硬さの指標である等価ヤング率を評価した。通常の浸透圧条件は、藍藻の培養に用いられている BG11 とした。BG11 に 1 mol/L のソルビトールを加えたものを高浸透圧条件とした。また、BG11 と DI 水を容積比で 1:9 に調整したものを低浸透圧条件とした。力計測実験を開始する前に、各サンプルを指定の浸透圧条件下で 2 時間保持した。

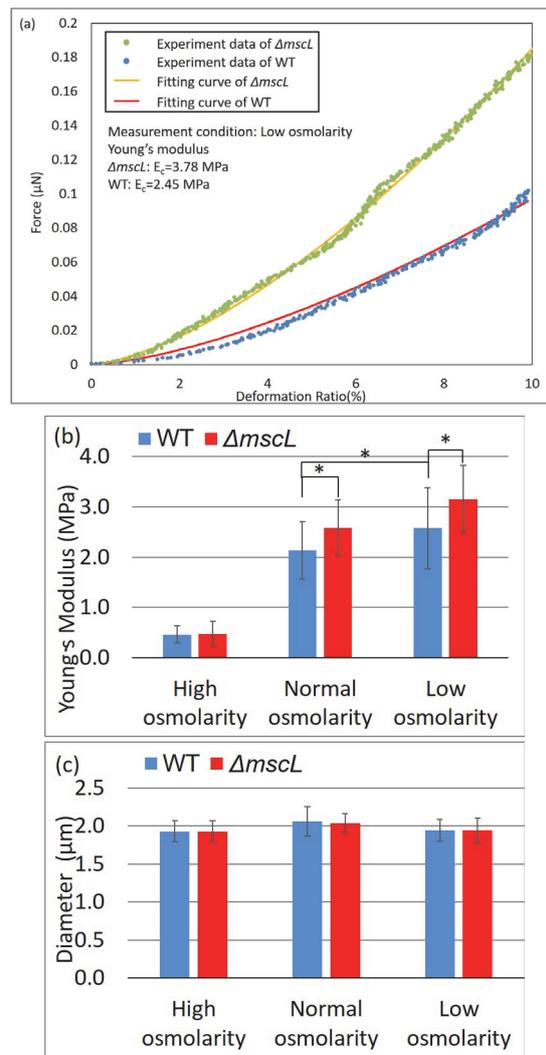


図4 藍藻の正常株と機械刺激受容性チャンネルの欠損株（遺伝子不活化株）の比較実験結果

図4に藍藻の正常株と機械刺激受容性チャネルの欠損株（遺伝子不活化株）の比較実験結果を示す。実験データは、条件ごとに6個の異なる藍藻のデータである。ここで、硬さ指標として、藍藻を球形モデルとして仮定し、ヘルツの変形モデルから算出されるヤング率を用いた。このときのポアソン比は0.5で一律とした。図4(a)は、このように計算した等価ヤング率を示す。図4(b)は細胞サイズであり、藍藻を挟み始めたときの両プローブ間距離とした。

図4(a)から、通常の培養条件より高い浸透圧条件下の藍藻は、正常株の等価ヤング率が 0.46 ± 0.17 MPa、遺伝子不活化株の等価ヤング率が 0.47 ± 0.25 MPaで、正常株、遺伝子不活化株ともに硬さ指標に違いはみられなかった。一方、通常の培養条件である通常の浸透圧条件の下では、正常株の等価ヤング率が 2.14 ± 0.57 MPa、遺伝子不活化株の等価ヤング率が 2.57 ± 0.57 MPaで、共に藍藻の硬さが増加し、遺伝子不活化株の硬さが正常株の硬さより大きくなった。さらに低い浸透圧条件の下では、正常株の等価ヤング率が 2.59 ± 0.82 MPa、遺伝子不活化株の等価ヤング率が 3.16 ± 0.66 MPaで、共に藍藻の硬さがさらに増加し、遺伝子不活化株の硬さが正常株の硬さより大きくなった。また、図4(b)より、全ての条件で、正常株、遺伝子不活化株共に、大きさの違いはほとんど見られなかった。これより、正常株と遺伝子不活化株の違いが、大きさではなく硬さによって判別できるという興味深い結果を得た。

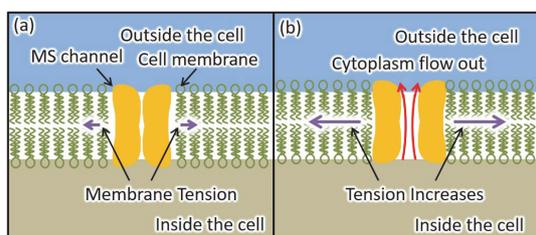


図5 機械刺激受容性チャネルの動作メカニズムの概念

図5に、機械刺激受容性チャネルの動作メカニズムの概念を示す。膜張力が低い場合は、図5(a)のように、チャネルは閉じており、膜張力が高い場合は、図5(b)のように、チャネルは開いていると考えられている。低浸透圧条件下では膜張力が高い状態になり、正常株では機械刺激受容性チャネルが動作し、遺伝子不活化株と比較して、等価ヤング率が下がったと考えられる。以上の知見は、本計測システムを用いて、正常株と特定に遺伝子不活化株の比較実験を実施したことによって初めて明らかになったと考えられる。

4. 研究成果

藍藻への外部刺激に連動した細胞応答を計測するためのオンチップ細胞計測基盤を

確立した。高剛性マイクロ流体チップに、細胞を変形するための加圧プローブと力計測用のセンサプローブを有するマイクロ・ナノロボットを組み込んだ。これに必要な微細加工基盤を確立し、プローブの位置制御および力計測を安定に行うことが可能となった。このシステムを用いて、異なる浸透圧条件に置かれた藍藻の正常株と遺伝子不活化株に対して浸透圧条件の違いで、細胞サイズと硬さの指標である等価ヤング率を評価した。浸透圧が低い条件では、遺伝子不活化株の硬さが正常株の硬さより大きくなることが明らかになり、一方で、細胞の大きさの違いはほとんど見られなかった。実験結果より、浸透圧の変化に対する機械刺激受容性チャネルの役割を明らかにした。

<引用文献>

- ① Akai, M., et al., “Aquaporin AqpZ is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *J. Bacteriol.*, 194, 24, 2012, 6828-6836
- ② Nanatani, K., et al., “Comparative analysis of kdp and ktr mutants reveals distinct roles of the potassium transporters in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *J. Bacteriol.*, 197, 4, 2015, 676-687

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Di Chang, Shinya Sakuma, Kota Kera, Nobuyuki Uozumi and Fumihito Arai*, Measurement of Mechanical Properties of Single *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 Cells in Different Osmotic Concentrations Using Robot Integrated Microfluidic Chip, *Lab on a Chip*, 査読有, 18, (2018), pp.1241-1249
DOI: 10.1039/C7LC01245D

[学会発表] (計11件)

1. 佐久間臣耶, Chang Di, 解良康太, 魚住信之, 新井史人, オープンマイクロ流路を有するロボット統合型マイクロ流体チップを用いた単一藍藻の機械特性計測, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会 (37th CHEMINAS), 2018
2. Di Chang, Shinya Sakuma, Kota Kera, Nobuyuki Uozumi, Fumihito Arai, Mechanical Characterization of a Single *Synechocystis* sp. PCC 6803 Cell in Different Osmolarity Solutions, IEEE 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human

- Science, 2017
3. 杉浦広峻, 佐久間臣耶, 金子真, 新井史人, 単一細胞のオンチップ機械特性計測: 細胞変形のメカニクス, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017, 2017
 4. S. Sakuma, D. Chang, F. Arai, K. Kera, and N. Uozumi, MECHANICAL CHARACTERIZATION OF CYANOBACTERIA UNDER OSMOTIC STRESS, IEEE MEMS 2017, 2017
 5. Hirotaka Sugiura, Shinya Sakuma, Makoto Kaneko and Fumihito Arai, Elasticity Evaluation of Single Cell with Uniaxial Deformation in Microfluidic Chip, IEEE 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2016
 6. 杉浦広峻, 佐久間臣耶, 金子真, 新井史人, 単一細胞の大変形圧縮モデルを用いたオンチップ弾性特性計測, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016, 2016
 7. 長谷川貴之, 佐久間臣耶, 魚住信之, 新井史人, 浸透圧ストレス適応機能評価のためのラン藻のオンチップ機械的特徴量計測, 第16回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2015
 8. 長谷川貴之, 佐久間臣耶, 魚住信之, 新井史人, 環境適応機能評価のためのラン藻のオンチップ機械的特徴量計測, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会, 2015
 9. Takayuki Hasegawa, Shinya Sakuma, Kei Nanatani, Nobuyuki Uozumi, Fumihito Arai, Mechanical Characterization of a Single Synechocystis sp. PCC 6803, IEEE 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2015
 10. Takayuki Hasegawa, Shinya Sakuma, Kei Nanatani, Nobuyuki Uozumi and Fumihito Arai, Mechanical Characterization System of Cyanobacteria Using a Robot Integrated Microfluidic Chip, 2015 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2015
 11. 長谷川貴之, 佐久間臣耶, 七谷 圭, 魚住信之, 新井史人, ラン藻のオンチップ機械的特徴量計測, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
名古屋大学大学院工学研究科マイクロ・ナノ機械理工学専攻 新井研究室 Research
<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 史人 (ARAI, Fumihito)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90221051

(2) 研究分担者

魚住 信之 (UOZUMI, Nobuyuki)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 40223515

(3) 連携研究者

丸山 央峰 (MARUYAMA, Hisataka)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 60377843