

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13319

研究課題名(和文) MEMS技術を用いた細菌類の形状制御

研究課題名(英文) Development of Shape Regulating methods using MEMS

研究代表者

平山 佳代子(Hirayama, Kayoko)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任研究員

研究者番号：60710564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細菌の形状制御機構を明らかにするために、従来の分子生物学的な手法ではなく、マイクロ・ナノ加工技術を用いて大腸菌の細胞膜を変形させる方法を開発した。細菌は、精密な形状制御機構を有していることが近年明らかになり、その機構にかかわる分子等の特定が進んでいる。本研究では、桿状細菌である大腸菌が、外部からの物理的な圧力による膜の変形に対してどのように応答するのかを明らかにすることを目的として、微小なチャンバーを作製し、そこに大腸菌を封入して培養する技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed a method to deform cellular shape of Escherichia coli by using micro-nano technology. Recent studies identified several proteins which play key role in complex system controlling the shape of E. coli. I fabricated micro chamber and confine E. coli cells into the chamber to see the response of the key proteins of E.coli.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：大腸菌 形状制御 マイクロナノ加工 MEMS

1. 研究開始当初の背景

形状と機能の関係は、部分的に哺乳類細胞で研究がなされているが、哺乳類細胞はゲノムが大きく煩雑であり、全体的なシステムの解明は困難となっている。一方、細菌類のゲノムは小さいが、その大きさがサブミクロンスケールであるため、研究方法が開発されていないのが現状である。細菌は、その形状や鞭毛の配置、分裂する位置などきわめて正確に制御している。例えば、モデル細菌である大腸菌は桿状をしているが、等張液下で細胞壁を除去するとスフェロプラストという球状の細胞になり、細胞壁を再合成させると再び桿状の細胞壁を形成することが報告されている。つまり、大腸菌は既存のテンプレート無しに桿状の細胞壁を合成するシステムを持っている可能性がある。しかし、大腸菌が「なぜ」桿状の細胞壁を「どのようにして」形成しているのか不明である。従来の遺伝子工学的手法や生化学的手法により、細菌の形状・分裂制御機構を明らかにするには、変異を入形状制御システム、強いては形状の持つ意味を明らかにしたい。

れた膨大な量の菌株を観察し、研究の目的に合致した変異株を取得するという作業が必要となる。適切な変異体を得るには多くの時間と手間が必要とされ、これが研究の律速段階になってきたといえる。一方、MEMS (Micro electro mechanical systems) に代表されるマイクロ・ナノ加工技術は微小な構造物を扱うツールとして優れており、申請者の属する研究室ではサブミクロンスケールの加工を高い精度で実現することができる。そこで、MEMS 技術を応用して、大腸菌の細胞膜の形状を強制的に改変すれば、従来の手法と比較して、より直接的に細菌の種固有の形状を決定する因子を明らかにすることができるかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ・ナノ加工技術を利用して細菌の形状を改変する技術確立し、サブミクロンスケールの生物において、生物の機能に対して形状がどのような役割を持つのか明らかにすることである。細菌類は、それぞれ固有の形状を維持する機構を有しているが、応募者の実験成果により、マイクロ・ナノ加工技術を応用すれば、 $1 \mu\text{m}^3$ に満たない微小な細菌の膜形状を改変できることが期待できる。本研究では、この形状が改変された細菌の応答を調べ、さらに培養を試み、細胞壁合成がどのように行われるかをしらべ、細菌の形状がどのように維持されているか明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

大腸菌は、細胞壁を酵素処理によって除去すると、スフェロプラストという柔らかい

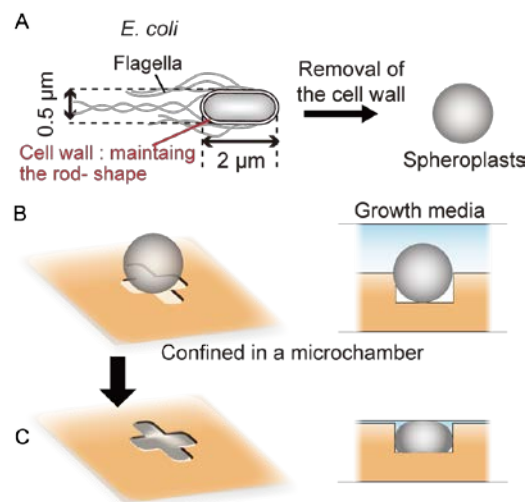


図 1 本研究手法の図解

大腸菌の細胞壁を除去し、スフェロプラストを作製(A)、スフェロプラストを μ ウェルに封入して変形させる (B,C)

球体になる。その状態から細胞壁を再合成させると、元の形状 (桿状) を取り戻すことが知られている。本研究では、MEMS 加工技術を用いてサブミクロンオーダーのマイクロウェルを作製した。そこに、細胞壁を取り除いた大腸菌 (スフェロプラスト) を封入して培養することで、大腸菌が変形した状態での細胞壁の再合成を促した。

また、形状制御機構に重要であると考えられている MreB タンパク質の動態を観察するために、mcherry 蛍光で標識された MreB タンパク質を発現する大腸菌株 FB76 を使用した。この FB76 株は、ケースウェスタン大学の Piet de Boer 教授に分譲いただいた。

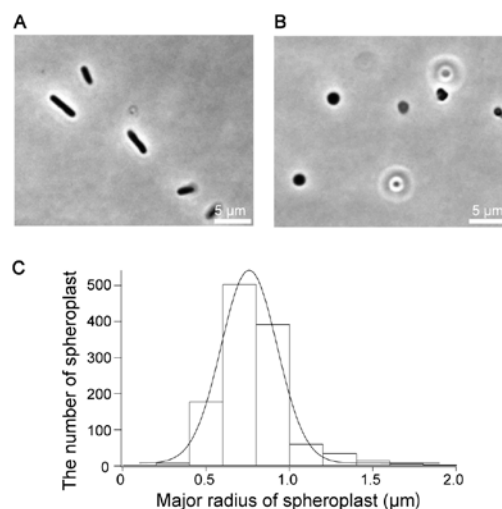


図 2 大腸菌の大きさ

A) 細胞壁除去前、B)細胞壁除去後 (スフェロプラスト) の顕微鏡写真。C) スフェロプラストの長半径分布。

4. 研究成果

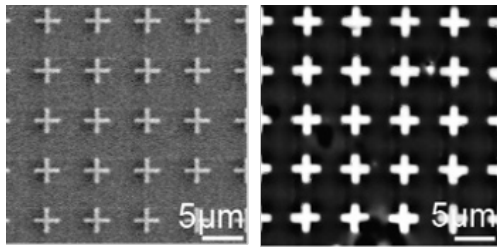


図 3 作製したマイクロウェルの電子顕微鏡写真(左)と転写されたアガロースゲルの顕微鏡写真(右)。

大腸菌菌体 (図 2A) から細胞壁を酵素により除去することでスフェロプラストを作製し (図 2B)、画像解析によってスフェロプラストの平均長半径を求めたところ、 $0.8 \mu\text{m}$ であることがわかった (図 2C)。したがって、スフェロプラストを半径 $0.8 \mu\text{m}$ の球体とみなすと、その平均体積は $1.6 \mu\text{m}^3$ であり、同程度の体積をもつマイクロウェルを作製する必要がある。そこで、電子描画と高アスペクト比エッチングによって、大きさの異なる十字型の突起アレイ (長さ: 2, 2.5, 3, 3.5 μm 、幅: $0.7 \mu\text{m}$ 、深さ: 約 $1 \mu\text{m}$) を作製した (マスタープレート)。このマスタープレートの十字突起を、培地成分をから成るアガロースゲルに転写し、十字型のマイクロウェルアレイを作製した (図 3)。

培養した大腸菌の細胞壁を酵素処理によって除去して得たスフェロプラストを等張栄養液体培地に再懸濁して、スフェロプラスト懸濁液を作製した。これを、マイクロ

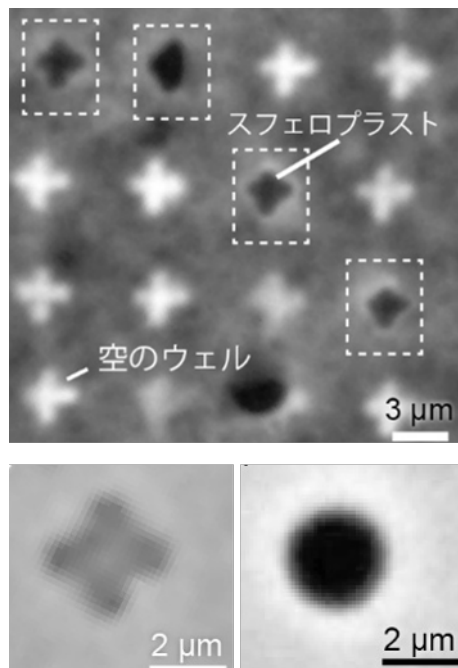


図 4 アガロースマイクロウェルに封入されたスフェロプラストの顕微鏡写真 (上段)、その拡大写真 (下段左) と変形前のスフェロプラスト (下段右)。

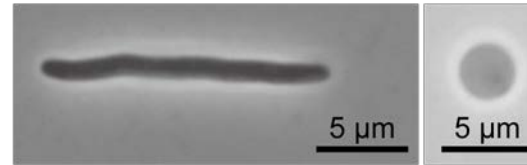


図 5 セファレキシシンによりフィラメント状になった大腸菌(左)、その細胞壁を除去して得られる大型スフェロプラスト(右)

ウェルが作製されたアガロースゲル上に $10 \mu\text{l}$ ほど滴下し、その上からカバーガラスをのせて適度な力でカバーガラスをアガロースゲルに押し付けると、一部のスフェロプラストがマイクロウェルに補足されるのが観察された (図 4)。この状態での MreB タンパク質の動態観察には、高解像度・高倍率で観察できる共焦点顕微鏡が必須である。しかし、研究代表者の異動により、この顕微鏡が使用できなくなったため、下記方法を考案した

まず、大腸菌 FB76 株を抗生物質であるセファレキシシン存在下で培養する。セファレキシシンは細胞分裂を阻害するため、細胞が連結した細長いフィラメント状の大腸菌を得ることができる。セファレキシシン存在下で培養し、 $10 \mu\text{m}$ 以上になるまで伸長させる。伸長し、フィラメント状になった大腸菌に、A22 という MreB 阻害剤を添加して培養すると、細胞壁が合成できなくなり、複数のスフェロプラストが融合した状態の大型のスフェロプラストが得られる。この大型スフェロプラストの直径は約 $5 \mu\text{m}$ であった (図 5)。

この大型のスフェロプラストの懸濁液を、前述の方法と同様に作製した寒天のマイク

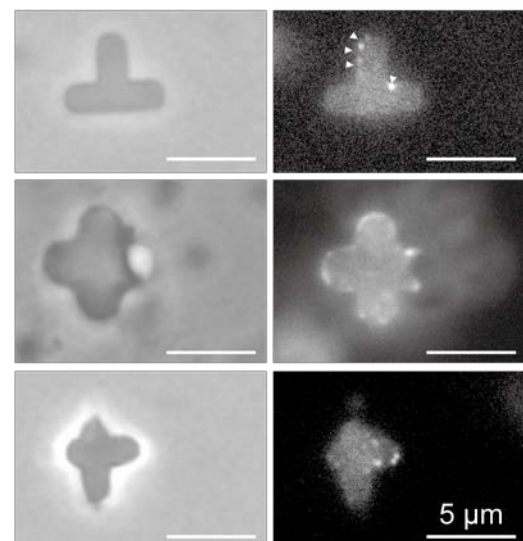


図 6 マイクロウェルに封入され、変形した大型スフェロプラストの位相差写真 (左) と MreB を可視化した蛍光顕微鏡写真(右)

ロウエルに滴下し、ガラスボトムディッシュに滴下した面が接着するように寒天ブロックを配置して、位相差顕微鏡にて大型スフェロプラストを観察した(図 6)。その結果、大腸菌の膜を変形させた状態で MreB の局在を観察することに成功した。その結果、MreB は曲率が高い部分には局在しにくい傾向があることが示唆された。これは、曲には MreB が存在しないことが必要であるという報告と整合性のある結果である。

現在のセットアップだと、乾燥によりスフェロプラストが死ぬため、数時間以上培養できない。今後はセットアップを改良し、継続して培養し、変形させた状態での細胞壁の再合成を観察したいと考えている。

5. 主な発表論文等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 佳代子 (Hirayama, Kayoko)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任
研究員

研究者番号：60710564