

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14703

研究課題名(和文) 表面微細構造を形成した寒天培地による微生物の増殖制御

研究課題名(英文) Micro-Patterning of Agar Surface for Cultivation Control of Microbes

研究代表者

中村 振一郎 (Nakamura, Shinichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・イノベーション推進センター・特別招聘研究員

研究者番号：10393480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の培養に用いられる寒天培地の表面は通常平滑な状態であるが、我々は、寒天培地の表面に微細な凹凸構造を施すことにより微生物の増殖を抑制あるいは促進させる可能性があることを見出した。

ハスの葉の微細な表面形状や一次元的な条線パターン、二次元的な市松模様型パターンなど様々な表面形状を寒天培地に転写する手法を確立し、枯草菌などの微生物の増殖が培地表面構造から影響を受けることを明らかにした。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、微細表面構造の形状とサイズにより微生物の増殖を抑制・促進・異方化できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Although a flat and smooth surface of Agar medium has been used for the cultivation of microbes, we demonstrated that micro-patterning of the surface of agar medium can control growth of microbes.

We have established a method to transfer the surface structure onto agar surface from various materials such as lotus leaves, sandpapers, meshed cloths, and moreover, well-defined patterns fabricated by photolithography.

We cultivated some microbes such as *Bacillus subtilis* on various surface structures of agar medium, and found that growth of the microbes is affected by the surface pattern on the agar medium.

Although the mechanism is not elucidated yet, we have demonstrated that the growth can be suppressed, enhanced, or anisotropic, depending on the pattern form and size.

研究分野：計算科学

キーワード：微生物の増殖制御 寒天培地表面への微細構造構築 コロニー形成の異方性 フォトリソグラフィ 条線構造 二次元周期構造

1. 研究開始当初の背景

微生物の培養制御は、有用な新規微生物の発見とその利用や、有害な微生物の増殖抑制などに不可欠である。これまで培養制御は、培養温度や、培地に添加する成分などの(生)化学的手法によって行われてきた。しかしながらこれらの手法は対象となる微生物種によって条件が異なり、一般的な制御指針は確立されていないのが現状である。申請者は以前、化学会社におけるプラントの物質輸送の最適化にかかわり、最近では光合成を活用したエネルギーや食料生産の高効率化の一環として光合成細菌に着目している。微生物を、栄養物質などを取り込み、生成物などを放出する「マイクロファクトリ」と考えると、その活動は外部環境との物質のやりとりに大きく依存すると考えられる。微生物の多くは土壌中に生息しているため、生活する場の空間のサイズと形状が微生物の活動や増殖に大きく影響すると考えられ、人工的な培養環境においても培地の表面形状を変えることによって微生物の培養を制御できるのではないかという着想を得た。心筋細胞や神経細胞などの動物細胞の接触型培養では、表面の構造パターンニングにより培養制御を行っている例が報告されている。一方微生物の培養においては、産業的な大量培養は液体培養で行われることから、寒天培地の表面構造が微生物増殖へ及ぼす影響についてはこれまで検討されてこなかった。もし培地表面構造による増殖制御が実現できれば、新規微生物の探索やコロニー培養試験といった基礎研究のみならず、抗菌剤などの化学的手段を用いない抗菌表面の実現といった実用的な産業応用まで幅広い展開が見込まれる。

そこで本課題では、培地表面構造による微生物の増殖制御の可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

本課題では、培地表面の微細構造による微生物の増殖制御の実現を目的とした。微生物の増殖に影響を与える要因としては、以下のように表面構造のサイズや形状などが考えられる。

表面構造のサイズについては、培養する微生物のサイズとの関係で微生物が構造内に入り込めるか、どのような運動ができるかが決まると考えられる。また、表面構造と微生物の間隙の大きさによって、微生物と環境との物質の授受の効率が変化し、増殖に影響が出ることも考えられる。

形状については構造の形状が一次元的(条線パターン)であるか二次元的(格子状パターンなど)であるかといった要因が微生物の増殖に影響すると考えられる。

表面構造を系統的に変えて実験することで、これらの要因の微生物増殖への影響を明らかにして、培養制御の指針を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 寒天培地表面への微細構造構築法の確立

様々な表面微細構造を寒天培地表面に形成するために、原型の表面構造を寒天培地表面に転写する手法を確立した。原型としては、フラクタル構造を有するハスの葉など植物の葉や、メッシュクロス(布)、サンドペーパー、フォトリソグラフィによりガラス基板上に形成した周期的条線(line&space)構造や市松模様などを用いた。これらの原型はサイズや柔らかさ、表面の親水性などもまちまちのため、直接寒天培地表面に転写するのは難しい。そこで、これら原型の表面を一旦シリコン樹脂表面に転写したうえで、このシリコン樹脂型を寒天培地表面に転写するという、二段階転写法を用いることとした。具体的なプロセスは以下の通りである。

① シリコン樹脂型の作製

シリコン型は直径 9cm のプラスチックペトリ皿に合わせて作製した。植物の葉、サンドペーパー、メッシュクロスなどの原型表面素材については、ペトリ皿の底内側半面をカバーするように半円形にカットして両面テープで貼りつけたものを用いた。またフォトリソグラフィにより作製したフォトレジストによる微細表面形状については、ペトリ皿の底に合わせた円形のガラス基板(φ85mm、厚さ1mm)上にフォトレジスト AZ-1500 をスピコートし、マスク露光機(ナノシステムソリューション製 D-light-DL1000RS)を使って基板の半面のみで微細な凹凸面を形成したものを準備した。これらの原型を底面に取りつけたプラスチックペトリ皿に、高精細転写用シリコン印象材(SIM-340、硬化剤 CAT-340(信越化学(株)))を約 12g 注入して減圧脱泡後 35°C で 2 時間静置して硬化させ、静かに剥離してシリコン型とした。

② シリコン樹脂型の寒天培地表面への転写

直径 9cm のペトリ皿に融解した寒天培地を注入し、その上にシリコン型を静かに浮かべた。培地が十分に冷えて固化した後にシリコン型を静かに剥離して、表面形状の転写された寒天培地を得た。クリーンベンチ内でペトリ皿の蓋を 15 分間ほど開けて寒天培地表面の余分な水分を飛ばした。

本プロセスによる転写精度を確認するため、市販の回折格子とそれを転写したシリコン型、シリコン型を転写した寒天培地の各表面をそれぞれ反射型レーザー共焦点顕微鏡(オリンパス製 3D レーザー顕微鏡 OLS4100)で観察して表面形状を比較検討した。原型からシリコン型への転写精度は非常に高いが、シリコン型から寒天培地への転写においてパターンの深さは場合によっては 1/10 以下に減じること、パターン周期

が短い場合と寒天濃度が低い場合に極端に転写精度が低下しパターン深さが減少することが判明した (図 1)。これらの結果から、培養実験に供試する寒天培地の寒天濃度を3%とした。

なお、シリコン型から寒天培地への表面形状の転写精度の低下はシリコン材の疎水性に起因するものであることが判明したため、疎水性を軽減するための措置としてUVオゾン処理、エタノール処理を検討したが、UVオゾン処理ではシリコン型に亀裂が入り脆くなること、またエタノール処理では効果が低いため、当面の実験では疎水性の軽減処置を行わないことにした。

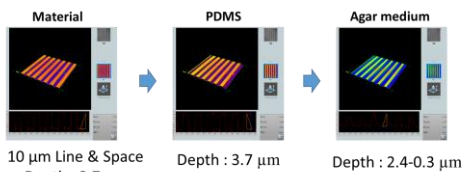


図1 素材⇒シリコン型⇒回折格子への転写精度の検証

(2) 微細表面構造を持つ寒天培地上での培養実験

培養実験は以下の菌株を用いて行った (図 2)。

大腸菌 *Escherichia coli* K-12 MG1655

枯草菌 *Bacillus subtilis* JCM20105

納豆菌 *Bacillus subtilis* var. *natto* JCM20083

巨大菌 *Bacillus megaterium* JCM2506

紅光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* NBRC16435

酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* JCM1499

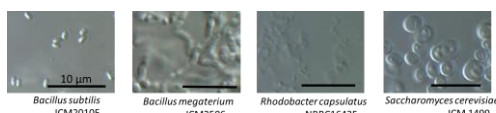


図2 供試菌株の一部

① 寒天培地表面への供試菌の接種：

菌株は TSA 斜面培地で 30°C、3 日間培養後に滅菌水で懸濁、 10^5 CFU/ml となるように調整した菌液約 $1 \mu\text{l}$ (概ね 100 細胞) を点接種した。

② 微生物コロニーの観察：

菌接種後 27°C または 30°C で 3 日から 5 日間培養後に肉眼で観察、写真を撮影した。写真から画像処理 (ImageJ ソフトウェア (米国 NIH) を使用) によってコロニーサイズや形状異方性などを計測した。また、コロニーを実体顕微鏡下および生物顕微鏡 (オリンパス IX71) 下で観察して写真を撮影した。

4. 研究成果

(1) 植物の葉などの表面形状を転写した寒天培地上の微生物増殖

ハスの葉やサトイモの葉およびアルキルケテンダイマーの表面 (これらは撥水性の強い表面構造である) を転写した培地では平滑面と比べると明らかにコロニーが小さくなり、メッシュクロス転写した培地では目のサ

イズによってはコロニーが小さくなる、あるいは逆に速やかにコロニーが拡大するなどの反応の違いが見られた。菌種による違いも若干認められた (図 3, 4)。

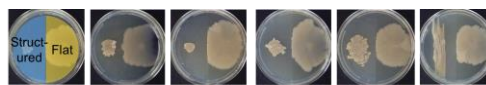


図3 納豆菌のコロニー 3% agar, 37°C, 3days



図4 枯草菌のコロニー 3% agar, 37°C, 3days

(2) 一次元の周期的凹凸パターン (条線型構造) を転写した寒天培地上の微生物増殖

フォトリソグラフィで作製した線幅 5~20 μm 、高さ 3.7 μm の条線構造 (図 5) を転写した寒天培地では、枯草菌、納豆菌、酵母菌ともに条線に沿って長く伸びる異方性コロニーを形成した (図 6)。この異方性増殖は、凸部を構成する壁による増殖阻害とともに、凹部での速やかな長手方向への延伸によると考えられる。これは後述のコロニー端部の顕微鏡観察でも裏付けられている。図 6 の右の二つのグラフは、増殖の様子を異なる観点でプロットしたものである。上のグラフは培養開始後 1 日目のコロニー面積を横軸に、2 日目の面積を縦軸にとって各コロニーをプロットしたものであり、原点からの傾きが増殖率を示す (1 日目と 2 日目のコロニー面積比、縦軸は横軸の 3 倍のスケールであることに注意)。黒点は平坦面上、色のついていない点はパターン面上のコロニーであり、寒天培地表面の有無によらず増殖率はほぼ一定であることがわかる。下のグラフは、横軸に培養開始後 1 日目のコロニー面積、縦軸にコロニー形状の異方性 (長軸と短軸の長さの比) をとったものである。平坦面上のコロニー (黒点) はほぼ等方的であるのに対し、パターン面上のコロニー (色点) は異方性が大きいことがわかる。

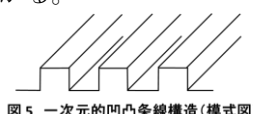


図5 一次元的凹凸条線構造 (模式図)

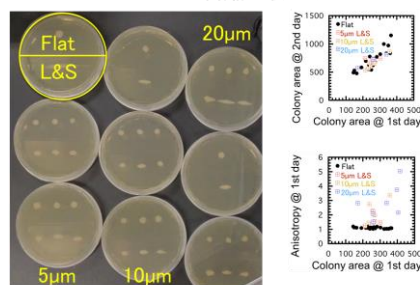


図6 一次元凹凸パターン (条線型構造) 上の枯草菌のコロニー (条線の幅は 5 μm 、10 μm 、20 μm)

(3) 目の粗さが異なる様々なサンドペーパーを転写した寒天培地上の微生物増殖

二次元的表面構造の一つとして、サンドペーパーを転写した寒天培地上に形成されるコロニーの検討を行った。目の粗い #240 から

目の細かい#5000まで12種類のサンドペーパーの凹凸面をそれぞれ転写したシリコン型を用いて寒天培地に転写して枯草菌、大腸菌、巨大菌のコロニーを形成させた。その結果、巨大菌では寒天培地表面の目の粗さでの差異は殆ど認められなかった(図8)が、枯草菌と大腸菌では目の粗さによる増殖反応に違いが見られ、極細目#1000以上では平坦面と比べてコロニーが縮小する傾向が見られたが、#1200、#1500、#2500ではコロニーが縮小しなかった(図7)。

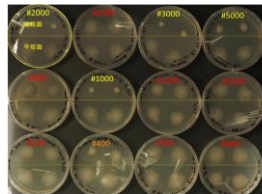


図7 目の粗さの異なるサンドペーパーを転写した寒天培地上の枯草菌 (*B. subtilis*) のコロニー (TSA, 27°C, 4日間培養後)

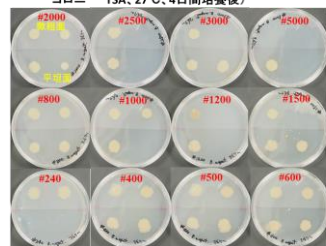


図8 目の粗さの異なるサンドペーパーを転写した寒天培地上のコロニー (巨大菌 (*B. megaterium*)) TSA, 27°C, 4日間培養後)

#1200、#1500、#2500でコロニーが縮小しなかった原因を明らかにするため、寒天培地表面形状を観察したところ、#1200、#1500、#2500は#1000と比べるとむしろ凹凸が逆に粗くなっていることが分かった(図9)。これらのサンドペーパーは他のものとは異なるメーカーの製品であったため、菌の増殖のサイズ依存性が特異な挙動を示したわけではないと考えられる。

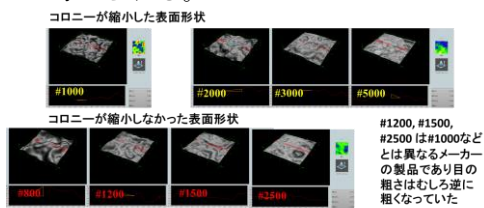


図9 サンドペーパーを転写した寒天培地表面の三次元形状 (レーザー共焦点顕微鏡 (OLS-4000)による計測)

(4) 二次元の周期的凹凸パターン (市松模様型) を転写した寒天培地上の微生物増殖パターンサイズを正確に設定した周期パターンとして市松模様のパターンをフォトリソグラフィで作製した。四角柱の1辺が5~56μm、高さ2.7μmの周期的凹凸表面(図10)を形成して寒天培地上に転写し、これを枯草菌の培養に供試した。

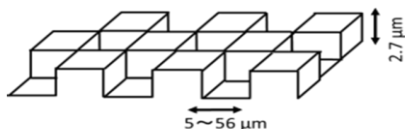


図10 二次元的凹凸表面形状(模式図)

市松模様パターンの周期的表面構造上の枯草菌のコロニーは、平滑面のそれと比べると小さくなる傾向が認められた。四角柱の1辺が5~14μmのパターンの表面では、コロニーがパターン形状に起因するとみられる二次元的な異方性(円形ではなくやや四角い形状)を示し、四角に広がる傾向を示した。また、20μm~ではコロニー形状に顕著な異方性は見られなかった(図11)。

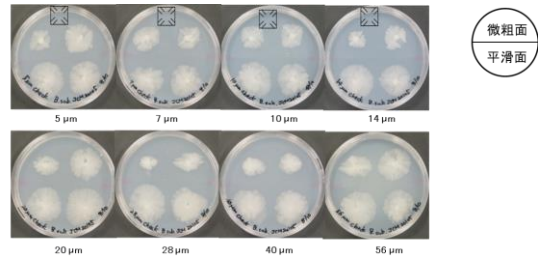


図11 市松模様型凹凸表面構造を転写した寒天培地上の枯草菌のコロニー (TSA, 27°C, 5days)

(5) パターン表面上の微生物の顕微鏡観察

一次元的条線構造の寒天培地上の異方性コロニー及び市松模様型二次元周期構造の寒天培地上の異方性コロニーを顕微鏡観察した。その結果、細胞の長軸方向に分裂する枯草菌などでは、培地表面の凹凸の壁部分が細胞分裂の抑制要因となって増殖方向が規制されていることが明らかとなった(図12)。条線構造では条線の向きに沿って菌体が増殖延伸している。また市松模様型では隣接する凹部分は繋がっていないため、凹部分の中の菌の増殖が抑制されるとともに、溢れた菌が壁のもっとも狭い対角方向に乗り越えて隣接する凹部に到達して増殖することによって特異なコロニー形状を示すと考えられる。

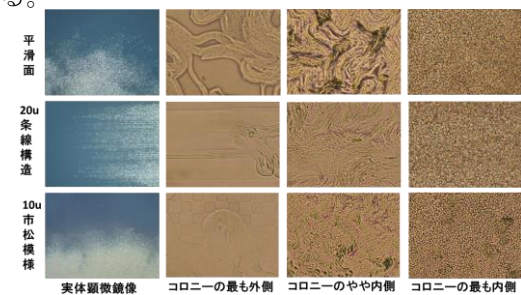


図12 寒天培地表面上のコロニーの顕微鏡観察結果

(6) まとめ

以上のように、寒天培地上の微細表面構造によって微生物の増殖を制御するコンセプトは実証できた。表面構造の壁の部分が菌の増殖を抑制し、このため一次元構造における異方性が生じているらしいことなど、メカニズムの解明につながる知見も得ることができた。制御性の範囲やメカニズムの全面解明など残された課題も多いが、萌芽的研究としての一定の成果は得られたと考えている。今後は、より複雑なパターンやより深い表面構造の作製など技術上の制約を克服しつつこれらの課題に取り組み、抗菌表面や難培養微

生物の易培養化などのための構造を設計する指針を確立して、応用にも繋げていきたい。

<参考文献>

- ① M. Matsushita et al. Colony formation in bacteria: experiments and modeling. *Biofilms* 1, 305-317 (2017)
- ② 三好 洋美、「遺伝情報選択における力のバイオマテリアル制御」、*バイオマテリアル-生体材料-*、34 巻、132-137 (2017)
- ③ Miyoshi H and Adachi T. Topography Design Concept of a Tissue Engineering Scaffold for Controlling Cell Function and Fate Through Actin Cytoskeletal Modulation *Tissue Eng. B*, 20, 609-627 (2014)
- ④ Kimura K., Tomaru Y. A unique method for culturing diatoms on agar plates. *Plankton Benthos Res.* 8, 46-48 (2013)
- ⑤ 山口 晴生、早川 由真、関 美紀、足立 真佐雄、木村 圭、外丸 裕司、滅菌処理した表面微細凹凸寒天培地による有害赤潮藻類の培養、*藻類*、第 64 巻、第 2 号、89-93 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 なし

〔学会発表〕 (計 8 件)

国際会議 2 件 (うち招待講演 2 件)

- ① (招待講演) Isoshima T., Uchiyama S., Ito Y. and Nakamura S., “Micro-patterning of agar surface for Cultivation Control of Microbes”, UNAM-ICN(メキシコ国立自立大学原子核研究所) Seminar, Mexico City, Mexico, (2017. 10).
- ② (招待講演) Isoshima T., Uchiyama S., Ito Y. and Nakamura S., “Micro-patterning of agar surface for cultivation control of microbes”, XXVI International Materials Research Congress (IMRC 2017), Cancun, Mexico, (2017. 08)

国内学会 6 件 (うち招待講演 1 件)

- ① (招待講演) 内山 茂、磯島 隆史、中村 振一郎、伊藤 嘉浩、“微細な凹凸表面構造を形成した寒天培地表上での微生物の培養制御”、第 2 期第 11 回 (通算 24 回)「レーザーのカオス・ノイズダイナミクスとその応用」専門委員会研究会、久米島、沖縄 (2017. 11)
- ② 磯島 隆史、内山 茂、伊藤 嘉浩、中村 振一郎、“微細な凹凸表面構造を形成した寒天培地表上での微生物の培養制御-物理屋の側からの検討”、第 2 期第 11 回 (通

算 24 回)「レーザーのカオス・ノイズダイナミクスとその応用」専門委員会研究会、久米島、沖縄 (2017. 11)

- ③ 磯島 隆史、内山 茂、伊藤 嘉浩、中村 振一郎、“寒天培地表面の微細構造作製による微生物培養制御”、日本物理学会 2017 年秋季大会、盛岡、岩手 (2017. 09)
- ④ 内山 茂、磯島 隆史、中村 振一郎、“微細な凹凸表面構造を形成した寒天培地上での微生物の増殖制御”、環境微生物系学会合同大会 2017、仙台、宮城 (2017. 08)
- ⑤ 内山 茂、磯島 隆史、中村 振一郎、“寒天培地表面への微細凹凸形成による微生物の培養制御の試み”、日本微生物生態学会第 31 回大会、横須賀、神奈川 (2016. 10)
- ⑥ 磯島 隆史、内山 茂、伊藤 嘉浩、中村 振一郎、“微生物培養制御のための寒天培地表面パターンニング”、第 77 回応用物理学会秋季学術講演会、新潟、新潟 (2016. 9)

〔図書〕 (なし)

〔産業財産権〕 (出願、取得ともになし)

〔その他〕 (なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 振一郎 (NAKAMURA, Shinichiro)
国立研究開発法人理化学研究所・イノベーション推進センター・特別招聘研究員
研究者番号：1 2 3 9 3 4 8 0

(2) 研究分担者

磯島 隆史 (ISOSHIMA, Takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員
研究者番号：4 0 2 7 1 5 2 2

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし