

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12621

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡を用いた生きた微生物細胞に働く相互作用力の直接測定法の開発

研究課題名(英文) Direct measurement of interaction force acting on living microbial cells using atomic force microscope

研究代表者

野村 俊之(Nomura, Toshiyuki)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00285305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原子間力顕微鏡AFMを用いて生きた微生物細胞に働く相互作用力を直接測定するために、AFMのカンチレバー先端への微生物1細胞やナノ粒子1個の固定について検討を行った。その結果、細胞もしくはナノ粒子がカンチレバーに付着したときの自由エネルギー変化が負の場合、細胞1個が生きたまま固定されたシングルセルプローブ、ナノ粒子1個が固定されたシングルナノプローブを作製できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to directly measure the interaction force acting on living microbial cells using an atomic force microscope (AFM), we investigated immobilization of one microbial cell or one nanoparticle at the tip of the AFM cantilever. As a result, we demonstrated that a single cell probe on which one living cell is immobilized or a single nanoparticle probe on which one nanoparticle is immobilized could be prepared if the change in free energy when a cell or a nanoparticle adheres to the AFM cantilever is negative.

研究分野：粒子 - 細胞間に働く相互作用力の評価と応用

キーワード：原子間力顕微鏡 細胞 ナノ粒子 相互作用

1. 研究開始当初の背景

微生物の付着現象は、廃水処理、有価物生産などの分野で積極的に利用される一方、食品、医療、金属腐食など、トラブルの原因となる場合も多い。これらの現象を理解して制御するには、生きた細胞表面に働く力を正確に知ることが必要不可欠である。しかし、微生物の場合、物理化学的相互作用に加えて、特異的相互作用、細胞表面層の高分子鎖による立体相互作用といった生物学的相互作用の影響も重要であるが、複雑なために理論は確立されていない。

申請者は、AFM のコロイドプローブに細胞を固定するとき、付着による自由エネルギー変化 ΔG に基づいてコロイド粒子を選択すると、細胞 1 個を生きたまま固定できることを見出した。また、エタノール中に分散したポリスチレンナノ粒子をカンチレバー先端に滴下後、真空脱気することで、チップ先端にナノ粒子 1 個を固定することも見出した。

以上のような学術的背景と申請者の知見を融合すると、『熱力学的観点から、細胞・ナノ粒子 1 個を AFM のカンチレバー先端に自由に固定できる万能な手法を開発でき、生きた細胞に働く相互作用を直接測定できる』と考えたのが本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

微生物に働く相互作用力を正確に理解することは、細胞が関係する分野において非常に重要な課題である。しかし、生物に由来した相互作用は極めて複雑なため、その理論は未だ確立されていない。そこで本研究では、物質間に働く相互作用を直接測定できる原子間力顕微鏡 AFM を用いて、生きた細胞に働く相互作用力を直接測定する手法の開発を目的とする。具体的には、熱力学的観点から、AFM のカンチレバー先端に微生物 1 細胞やナノ粒子 1 個を固定する方法を開発する。そして、得られた細胞表面に働く相互作用力を細胞の付着現象と比較することで、その妥当性について検討する。さらに、本法を進展させ、細胞-細胞・DDS キャリア粒子間の相互作用力を測定することで、バイオフィルム形成や環境ナノリスクの理解、DDS キャリアの開発にも役立つ。

3. 研究の方法

(1) シングルセルプローブ

まず、正立顕微鏡下において、マイクロマニピュレータを用いてエポキシ樹脂、シリカ粒子の順にカンチレバー先端に付けることでコロイドプローブを作製した。次に、コロイドプローブを AFM にセットし、基板から細菌を引き上げることでセルプローブの作製を試みた。作製したセルプローブは蛍光顕微鏡を用いて確認した。

作製したセルプローブを用いて、細菌-基板間と細菌-細菌間の付着力を直接測定し

た。測定は、細菌-基板間の場合、 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ の範囲を 10×10 pixels で各条件 3 cells についてフォースマッピングを行った。細菌-細菌間の場合、 $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ の範囲を 10×10 pixels で各条件 9 cells についてフォースマッピングを行い、中心の 9 点から付着力を算出した。また、細菌の変形量は接近過程におけるフォースカーブから算出した。

(2) シングルナノプローブ

カンチレバーの末端をカバーガラスで挟み、チップ側を下に向けてカバーガラスの上に設置した。次に、チップ先端に微量のナノ粒子懸濁液を滴下後、分散液を蒸発させた。作製したナノプローブは電子顕微鏡により確認した。

作製したナノプローブを用いて、ナノ粒子-細胞間の付着力を直接測定した。測定は、AFM に接続した顕微鏡を用いて、細胞の中心部 $600 \text{ nm} \times 600 \text{ nm}$ の範囲を 6×6 pixels で各条件 3 cells についてフォースマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) シングルセルプローブ

分散媒 (5, 154 mM NaCl)、基板 (負帯電の NC glass、正帯電の PC glass、ポリドーパミン (PDA) 修飾した PDA glass)、コロイドプローブ (PDA 修飾あり、なし) の組み合わせでセルプローブの作製を試みた。モデル微生物として、グラム陽性細菌の乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を使用した。その結果、分散媒は 5 mM、基板は NC glass、PDA 修飾したコロイドプローブの組み合わせにおいてセルプローブの作製に成功した。作製したセルプローブを図 1 に示す。これより、細菌 1 個を生きたまま PDA 粒子に固定できていることが確認できた。ここで、コロイドプローブへの細菌の固定要因を熱力学と DLVO 理論を用いて検証した。各種表面物性の実測値に基づき、細菌が基板に付着した際の表面自由エネルギー変化 ΔG と DLVO 理論を用いた細菌-基板間のポテンシャル障壁 V_{max} を算出した。その結果、細菌-基板間の ΔG は NC glass と PC glass は正で、細菌が付着しにくい一方、PDA glass は負で、細菌が付着し易いことが分かった。また、細菌-基板間の V_{max} は、5 mM 条件下における NC glass のみ存在し、細菌が付着しにくいと考えられる。それ以外の 5 mM 条件下での PC glass、PDA glass 及び 154 mM 条件下での各基板は V_{max} が消失し、ファンデルワールス引力が支配的であるため、細菌が付着し易いと考えられる。以上より、細菌と最も付着しやすい基板は PDA glass、最も付着しにくい基板は 5 mM 条件下での NC glass であることが分かった。

(細菌-コロイドプローブ間の付着力) > (細菌-基板間の付着力) の関係を満たせば、コロイドプローブ側に細菌が固定され、セルプローブは作製できる。したがって、5 mM 条件下において細菌-PDA 修飾したコロイド

ローブ間の付着力は細菌-NC glass間の付着力よりも強かったため、セルプローブを作製できたと考えられる。

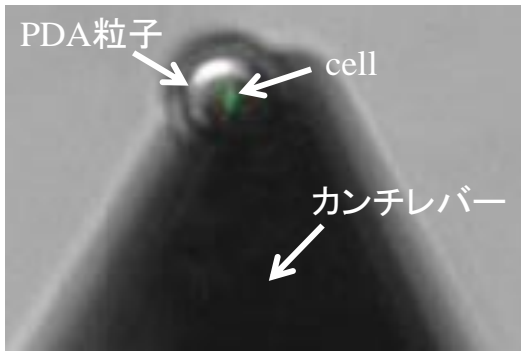


図1 シングルセルプローブ

セルプローブ法を用いて測定した細菌-NC glass間に働く付着力のヒストグラムとフォースカーブを図2に示す。これより、接触圧 0.5 nN では、イオン強度の増加に伴い付着力が増大した。これは細菌-NC glass間の静電斥力が減少したためである。また、接触圧の増加に伴い付着力も増大した。これは接触面積が増大したためであると考えられる。しかし、接触圧 5 nN ではイオン強度による付着力の違いがあまり見られなかった。これは接触圧 5 nN まで押し込むと細胞の変形量が大きくなり、ファンデルワールス引力が支配的となったためと考えられる。

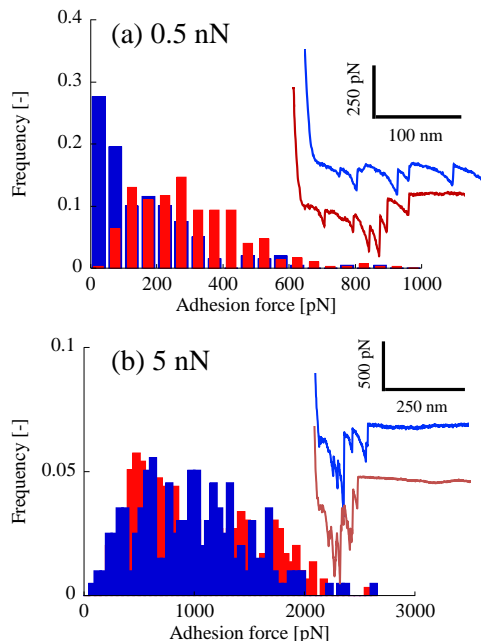


図2 乳酸菌-負帯電ガラス基板間の付着力のヒストグラムとフォースカーブ (青: 5 mM, 赤: 154 mM)

次に、細菌-細菌間に働く付着力のヒストグラムとフォースカーブを図3に示す。これより、接触圧 0.5 nN では、イオン強度によらず細菌-NC glass間と比較して付着力は非常に小さく、ほとんど働いていないことが分かった。また、接触圧を増加しても細菌-細菌間の付着力はほとんど変化しないことも分かった。

これは接触圧が増加すると付着力が増大した細菌-NC glass間と異なる結果であった。接触圧 5 nN における細菌の変形量の平均値を表1に示す。これより、イオン強度によらず細菌-細菌間の変形量は、細菌-NC glass間より明らかに増大していることが分かった。細菌はNC glassより明らかに柔らかい。そのため、細菌-NC glass間ではセルプローブの細菌だけが変形する。一方、細菌-細菌間では両方が変形するために細菌間の表面間距離は縮まりにくく、接触圧が増加しても付着力がほとんど変化しなかったと推察される。さらに、細菌周りの高分子鎖に起因する立体斥力も寄与していると考えられる。

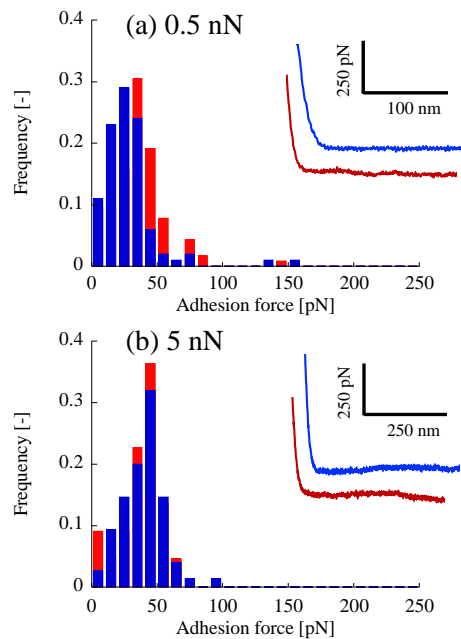


図3 乳酸菌-負帯電ガラス基板間の付着力のヒストグラムとフォースカーブ (青: 5 mM, 赤: 154 mM)

表1 細胞の変形量

Dispersion	Cell-NC glass	Cell-Cell
5 mM	58.1 ± 0.5 nm	171 ± 4.1 nm
154 mM	28.4 ± 6.7 nm	206 ± 4.8 nm

(2) シングルナノプローブ

AFM カンチレバーのチップ (窒化ケイ素) 先端に固定するモデルナノ粒子として、公称径 100 nm のカルボキシル修飾したポリスチレン (PSL) 粒子 (PS-COOH) とアミノ基修飾した PSL 粒子 (PS-NH₂) を用い、純水もしくはエタノールに分散させた。AFM カンチレバーは、そのままのものと、プラズマ処理で親水化したものを用いた。これらの組み合わせで、ナノプローブの作製を試みた結果、ナノ粒子を水に分散した場合、PS-NH₂ が未処理のチップ先端に固定され易い傾向が見られた。また、エタノールに分散した場合はいずれの

組み合わせにおいても、ナノ粒子がチップ先端に固定され易くなる傾向は見られたが、粒子が凝集している傾向も見られた。なお、チップをナノ粒子分散液に浸漬後、分散媒を蒸発させる速度を自然乾燥、真空脱気などにより変化させたが、ナノ粒子の固定化率に違いは見られなかった。一方、AFMを用いて大気下でガラス基板をタッピングモードでイメージングすることで、チップ先端を予め削って平坦化しておく、固定化率が向上することが分かった。作製したナノプローブを図4に示す。これより、ナノ粒子1個がチップ先端に固定化できていることが確認できた。ここで、チップへのナノ粒子の固定要因を熱力学的に検証した。各種表面物性の実測値に基づき、ナノ粒子がチップに付着した際の表面自由エネルギー変化 ΔG を算出した結果、水中ではPS-NH₂未処理チップ間、エタノール中ではナノ粒子とチップの組み合わせによらず負となり、実験結果の傾向と良く一致していた。

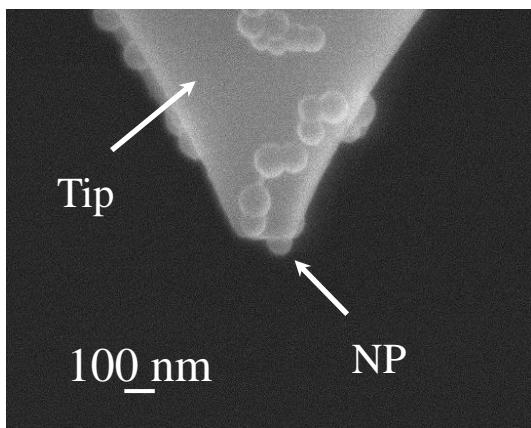


図4 シングルナノプローブ

ナノプローブ法を用いて測定したナノ粒子-細胞間に働く付着力のヒストグラムとフォースカーブの一例を図5に示す。シングルナノプローブは、PS-NH₂を純水に分散させ、先端を平坦化したチップに固定したを用いた。モデル細胞は出芽酵母を用い、分散媒(5 mM NaCl、154 mM NaCl、5%グルコース)中でナノ粒子-細胞間に働く相互作用力を直接測定した。図5より、PS-NH₂と酵母細胞間に働く付着力の中位値は、イオン強度の低い5 mM NaCl水溶液と5%グルコース水溶液中ではそれぞれ400 pNと310 pNであったのに対して、イオン強度の高い生理食塩水(154 mM NaCl水溶液)中では54 pNと約一桁小さくなることが分かった。また、酵母-ナノ粒子間に働く相互作用は、ナノ粒子の動的挙動(分散、付着、取込)の傾向とよく一致していることも分かった。以上より、作製したナノプローブの妥当性が実証された。

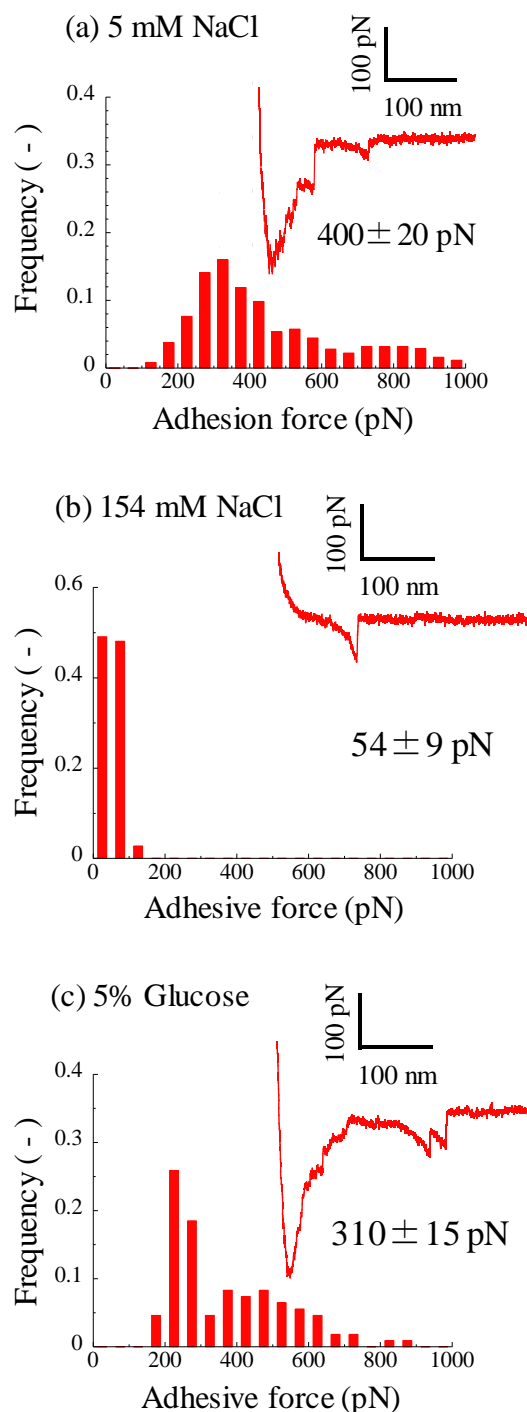


図5 アミノ基修飾した正帯電ナノ粒子-酵母細胞間の付着力のヒストグラムとフォースカーブ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① T. Nomura, M. Minamiura, K. Fukamachi, S. Yumiyama, A. Kondo, M. Naito, Adhesion control of fungal spores on solid surfaces using hydrophilic nanoparticles, Adv. Powder Technol., 印刷中, 査読有
DOI: 10.1016/j.appt.2018.01.007
- ② 吉原章仙, 豊田峻介, 小西康裕, 野村俊之, 大腸菌-ガラス表面間の付着力

に及ぼす細胞外代謝物の影響, 粉体工学会誌, 54, 167-171, 2017, 査読有

DOI: 10.4164/sptj.54.167

- ③ 弓山翔平, 藤澤瑛梨, 豊田峻介, 栗山雄太, 小西康裕, 野村俊之, PSL ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす酵母エキスの影響とナノ粒子-細胞間付着力のAFM測定, 粉体工学会誌, 53, 762-767, 2016, 査読有
DOI: 10.4164/sptj.53.762

[学会発表] (計 10 件)

- ① 和田将幸, 小西康裕, 野村俊之, 原子間力顕微鏡を用いた生きた乳酸菌に働く付着力の直接測定, 化学工学会金沢大会 2017 (2017)
- ② 野村俊之 (依頼講演), ナノ粒子接合を利用したカビ胞子の付着抑制機構の解析, 大阪大学接合科学研究所東京セミナー (2017)
- ③ S. Yumiyama, Y. Konishi, T. Nomura, Direct measurement of interaction forces between microorganism and microbubble using atomic force microscopy, 7th Asian Particle Technology Symposium (APT 2017) (2017)
- ④ 和田将幸, 小西康裕, 野村俊之, コロイドプローブAFM法を用いた生きた細胞に働く付着力の直接測定, 第 19 回化学工学会学生発表会 (大阪大会) (2017)
- ⑤ 和田将幸, 豊田峻介, 小西康裕, 野村俊之, 原子間力顕微鏡を用いた種々の細胞に働く付着力の直接測定, 2016 年度粉体工学会秋期研究発表会 (2016)
- ⑥ E. Fujisawa, Y. Konishi, T. Nomura, Direct measurement of bacterial adhesive force on solid surface using cell probe atomic force microscopy technique, 12th Japan-Korea Symposium on Materials & Interfaces (2016)
- ⑦ 弓山翔平, 豊田峻介, 小西康裕, 野村俊之, コロイドプローブAFM法による生きた細菌に働く付着力の直接測定, 第 46 回化学工学会秋季大会 (2016)
- ⑧ 吉原章仙, 豊田峻介, 小西康裕, 野村俊之, 細胞外代謝物が乳酸菌の付着力に与える影響, 第 52 回粉体工学会夏期シンポジウム (2016)
- ⑨ 弓山翔平, 小西康裕, 野村俊之, 水溶性高分子を用いた酵母細胞へのナノ粒子の取込制御, 日本バイオマテリアル学会第 11 回関西若手研究発表会 (2016)
- ⑩ 弓山翔平, 藤澤瑛梨, 豊田峻介, 栗山雄太, 小西康裕, 野村俊之, 原子間力顕微鏡を用いた酵母細胞へのナノ粒子の取込解析, 2016 年度粉体工学会春期研究発表会 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)

大阪府立大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 00285305