

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19760552

研究課題名 (和文) ピコリットルバイオリアクターのオンデマンド調製技術の確立

研究課題名 (英文) On-demand preparation of picoliter bioreactor

研究代表者

小野 努 (ONO TSUTOMU)

岡山大学・大学院環境学研究科・准教授

研究者番号：30304752

研究成果の概要：

ピコリットルスケールの体積を有するマイクロカプセルを利用してバイオリアクターへの応用を検討するもために、精密な微細液滴調製技術の構築と細胞と同等レベルの単分散マイクロカプセル内での物質生産の構築を行ってきた。マイクロリアクターを用いて単分散ピコリットルカプセルの調製を実現し、そのなかで大腸菌の培養と増殖およびプラスミド (目的蛋白質の遺伝子をコードした環状DNA) の導入によって目的蛋白質の生産を確認することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：界面化学・コロイド化学，生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学－生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ生産プロセス，バイオリアクター，生体触媒工学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、ピコリットルスケールの体積を持つマイクロカプセルを種々の用途に応じたバイオリアクターとして用いるために、穏和な条件で均一性の高いピコリットルカプセル中へ生体触媒を包括する手法を開発し、カプセル表面の機能化と制御によりオンデマンドで生物機能を利用できるマイクロバイオプ

ロセスの構築を目的としている。

近年、自己組織化や精密高分子合成技術の発達により、ナノ～マイクロレベルで微粒子・コロイドを自在に設計・開発することが可能になってきている。現在では国の重点推進4分野として「ナノテク・材料」「ライフサイエンス」が掲げられ、ライフサイエンスに有用なナノスケールの材料開発は今後の科

学技術の推進においても重要な課題であるといえる。

タンパク質（酵素）もまたナノスケールの機能性高分子であり、生体内で安定に化学反応の特異的触媒や高度認識の役割を担っている。しかしながら、生体の持つ特異な機能はこれら酵素群が閉ざされた空間（セル）内で巧みに協奏的に働くことによって生み出されており、バイオリアクターとして用いるには細胞スケールでコンパートメント化することが機能面かつハンドリング面で最も効果的な材料候補になるであろう。

それゆえ、精密な微粒子調製技術を活かして、細胞と同等レベルの10  $\mu\text{m}$ 程度の直径を有する単分散なカプセルに生体触媒を包括する手法について検討し、高活性でかつ回収利用が可能なピコリットルリアクターの構築を目指す。特に、従来の大きな生体触媒包括カプセルに比べて（1）非表面積が大きい（2）拡散時間が短い（3）触媒の有効利用（4）剪断応力に対する強度増加（5）迅速な温度制御（6）浮遊性の向上、といった利点が期待される。これらの特徴は、バッチ反応に対するマイクロリアクターの利点と重なる点が多く、その利点が既に実証されている。また、細胞と同等サイズであるため、既存の遠心分離技術によって安定な回収も容易に行うことができる。

## 2. 研究の目的

近年、遺伝子工学の発展により目的とする生体触媒は遺伝子的に改良され、大腸菌などの宿主細胞を利用したタンパク質生産が活発に進められている。そこで、ピコリットルスケールのカプセル内で目的のタンパク質を発現することで、バイオリアクターとして機能するマイクロカプセルを調製することが可能となる。本研究では、高い均一性を有したマイクロカプセル調製にマイクロリアクターを

利用して、単分散なアガロースゲルカプセルの調製を試み、そのアガロースゲル粒子内部において無細胞タンパク質合成による目的タンパク質生産の挙動および大腸菌を内封して菌体そのものにタンパク質生産を促すマイクロカプセルの調製を試みた。

このような斉一なマイクロカプセル内における生体触媒生産機能は、時間と労力のかかる変異タンパク質生産による多数のライブラリ作成およびスクリーニングを行う進化分子工学的応用に優れていると期待される。

本報告書では、マイクロリアクターを用いた単分散アガロースゲル内部での無細胞タンパク質合成とピコリットルの体積を有するアガロースゲル粒子に内包された大腸菌の増殖およびタンパク質生産挙動についてまとめた。

## 3. 研究の方法

### (1) CFPS試薬内包アガロースゲル粒子の調製

無細胞タンパク質合成の対象として緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用した。ゲル粒子調製にはシラン溶液によって疎水化処理を施した幅171  $\mu\text{m}$ 、深さ44.5  $\mu\text{m}$ のT字型の合流部を持つガラスマイクロ流路を使用した。水相には、無細胞タンパク質合成（Cell-free Protein Synthesis, CFPS）試薬（*E. coli* T7 S30 Extract System, Promega）とGFPをコードしたプラスミドを溶解させたアガロース溶液、油相にはSpan80とTween80を溶解させたデカン溶液を使用して、37°Cの空気恒温槽中でマイクロリアクターによりエマルジョンを調製した。得られたエマルジョン液滴は氷冷することによってゲル化させた。

### (2) アガロースゲル粒子培養によるGFP発現

調製したCFPS試薬内包アガロースゲル粒子をスライドガラス上に採り、デカンを蒸発させて、37°Cの空気恒温槽中で培養した。培養後、冷却して反応を止め、蛍光顕微鏡によってGFPによる蛍光を観察した。

### (3) 大腸菌内包アガロースゲル粒子の調製

タンパク質発現量の測定および増殖挙動の確認のためGFPをコードした遺伝子で形質転換させた大腸菌を用いた。ゲル粒子調製には、上述と同様の疎水化処理を施したT字型のガラスマイクロ流路を使用した。水相には、LB培地などを含む大腸菌懸濁液を加えたアガロース溶液を用いた。大腸菌懸濁液は液体培地で希釈することで所定濃度に調製した。油相には、界面活性剤を溶解させたデカン溶液を使用してW/Oエマルションを調製した。得られた液滴は氷冷し、ゲル化させゲル粒子を得た。

### (4) ゲル粒子での大腸菌培養とGFP発現

調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子を各温度で培養後スライドガラス上に採り、氷冷して増殖を抑え、蛍光顕微鏡によってGFPによる蛍光を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) CFPS試薬内包アガロースゲル粒子の調製

図1には、調製したアガロースゲル粒子とCFPS試薬内包アガロースゲル粒子の粒径と粒径分散度を与えるエマルション調製時の油相流速の影響を示した。この結果より、10%以下の粒径分散度をもつ単分散ゲル粒子の調製に成功し、油相流速の増加に伴い粒径は減少した。油相流速20  $\mu\text{l}/\text{min}$ においては、アガロースゲル粒子は調製できたが、CFPS試薬内包アガロースゲル粒子は調製できなかった。しかしながら、ゲル粒子が得られる油相流速範囲では、CFPS試薬内包の有無に関わらずほぼ等しい粒径で調製できた。

図2はエマルション調製直後とスライドガラス上でデカンを蒸発させた後のCFPS試薬内包アガロースゲル粒子の実体顕微鏡写真を示す。CFPS試薬を内包したゲル粒子は脆弱で油相中に静置すると凝集した。そこで、ゲル粒子の状態を培養を行うためにスライドガラス上でデカンを蒸発させた。この結果、40  $\mu\text{m}$

程度の凝集しないゲル粒子を調製できた。

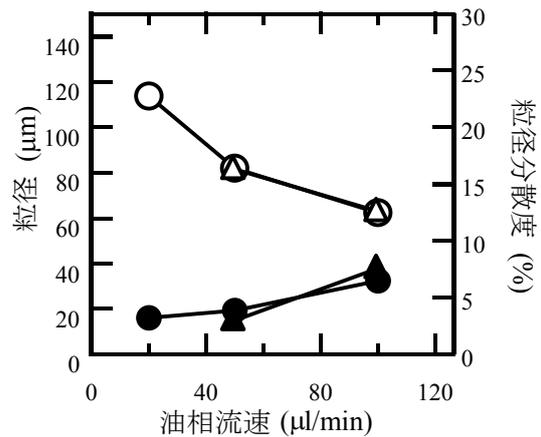


図1 ゲル粒子の粒径および粒径分散度を与える油相流速の影響 (○, ●; アガロースゲル粒子, △, ▲; CFPS試薬内包アガロースゲル粒子)

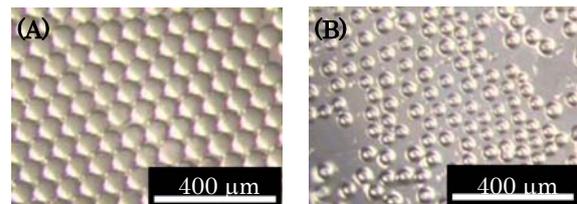


図2 CFPS試薬内包アガロースゲル粒子の実体顕微鏡写真: (A) エマルション調製直後, (B) デカン除去後

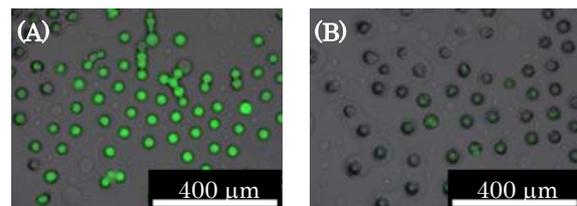


図3 24時間培養後(37°C)のCFPS試薬内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真: (A) GFP遺伝子あり, (B) GFP遺伝子なし

### (2) アガロースゲル粒子培養によるGFP発現

図3には、CFPS試薬内包アガロースゲル粒子の24時間培養後の蛍光顕微鏡写真を示す。GFP遺伝子を含むゲル粒子(図3A)は、含まないゲ

ル粒子(図3B)と比べてGFPによる強い蛍光を示した。この結果から、単分散アガロースゲル粒子中での無細胞タンパク質合成が可能なことが明らかとなった。

(3) 大腸菌内包アガロースゲル粒子の調製  
マイクロリアクターで調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子の粒径および粒径分散度におよぼす油相流速の影響を図4に示す。CFPS試薬内封アガロースゲル粒子調製の場合と同様に、10%以下の粒径分散度をもつ単分散ゲル粒子の調製に成功した。ゲル粒子が得られる油相流速範囲では、大腸菌内包の有無に関わらず粒径のほぼ等しいゲル粒子が得られた。

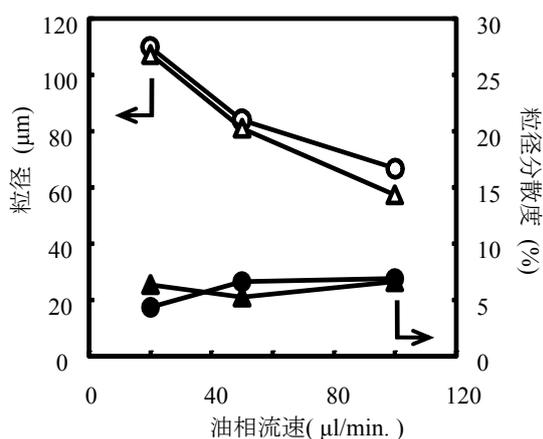


図4 マイクロリアクターで調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子の粒径および粒径分散度におよぼす油相流速の影響(○, ●; 大腸菌内包アガロースゲル粒子, △, ▲; アガロースゲル粒子)

#### (4) ゲル粒子での大腸菌培養とGFP発現

48時間培養後(25℃)の大腸菌内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真を図5に示す。ゲル粒子あたり大腸菌が1~2個内包される様に調製した場合、通常の培養温度よりも低い温度である25℃で培養を行うことで大腸菌タンパク質発現が確認された。また、隣

り合うゲル粒子の蛍光強度の違いから大腸菌の相互作用の抑制に成功し、ゲル粒子内の大腸菌コロニーに由来する蛍光強度から内包された大腸菌数はほぼ1個であることを確認した。以上のことから、アガロースゲル粒子内に区画化した大腸菌が通常の培養と同様に増殖することを確認した。

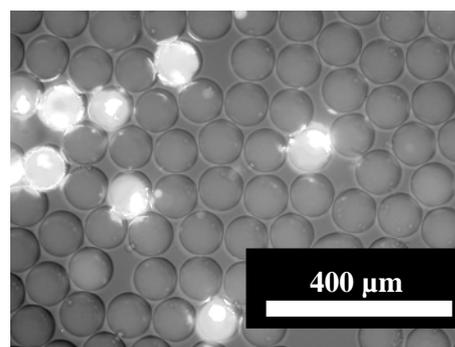


図5 48時間培養後(25℃)の大腸菌内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真

このように、マイクロリアクターを用いることで、数十μmの直径を有する(=ピコリットルの体積を有する)アガロースゲル微粒子の作製に成功し、そのアガロースゲル微粒子内で目的遺伝子に由来するタンパク質の生産が可能であることを明らかにした。

本手法は、流速の制御によってサイズの揃ったピコリットルの容器を任意に作り出すことが可能であり、内部において遺伝子から生体触媒であるタンパク質を生産することが可能であり、今後の新たなバイオリアクター調製法として有望であると期待される。

#### 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)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 鷺尾直紀, 小野努, 木村幸敬, 「単分散ゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動」, 第11回化学工学会学生発表会, 平成21年3月7日, 岡山
- ② 鷺尾直紀, 天野陽介, 小野努, 「マイクロリアクターで調製した単分散ゲル粒子内

- での大腸菌培養」, 第2回中四国若手CE合宿, 平成20年8月22日, 広島
- ③ 岸佑磨, 小野努, 「遺伝子デリバリーを目的とするナノカプセルの調製」, 第2回中四国若手CE合宿, 平成20年8月22日, 広島
  - ④ 吉田圭志, 神尾英治, 小野努, 「マイクロリアクターを利用した単分散ミリカプセルの調製」, 第2回中四国若手CE合宿, 平成20年8月22日, 広島
  - ⑤ 天野陽介, 小野努, 「マイクロリアクターで調製した単分散ゲル粒子中での無細胞タンパク質合成」, 化学工学会第73年会, 平成20年3月21日, 静岡
  - ⑥ J. Kubota, T. Ono, “Phase inversion temperature (PIT) method utilized preparation of o/w nano-emulsion by microreactor system”, AIChE annual meeting, 2007.11.6, Salt Lake City (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 努 (ONO TSUTOMU)

岡山大学・大学院環境学研究科・准教授

研究者番号：30304752