

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 6月 30日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23658085

研究課題名（和文） 透明電極基板を利用した生きた微生物の付着配置および剥離回収法

研究課題名（英文） Attachment and detachment of living microorganisms using an optically transparent electrode.

研究代表者

小山 純弘 (KOYAMA SUMIHIRO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：50344297

研究成果の概要（和文）：本研究では、土壌中および培養液中の様々な微生物を、1) 光学的に透明な ITO 電極基板上へ電気的に誘引付着させる技術、そして 2) 電極基板上に付着した微生物を、生きた状態で剥離回収する技術を開発した。電位印加による微生物の吸着および剥離手法を用い、相模湾初島沖の深海底泥から生きた微生物のみの回収を試みた。その結果、Direct sediment DNA extraction 法とほぼ変わらない 19 門、23 綱のバクテリアを回収することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The author developed an electrical modulation method for attachment and detachment of microorganisms. When we applied this method to separate microorganisms from deep-sea sediment, bacteria belonging to 19 phyla and 23 classes were collected without undesirable high molecular-weight contaminants such humic acids. At the phylum level 95% and at the class level 87% of the phlotypes among electrically retrieved bacteria were common to the gene clones from the direct sediment DNA extraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000 円	930,000 円	4,030,000 円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物

## 1. 研究開始当初の背景

単一細胞解析のための空間配置制御技術は、基板上へ細胞をアレイ状に配置し、single cell レベルで遺伝子やタンパク質の機能解析後、細胞を回収する技術である。この空間配置制御技術は、近年、動物細胞で飛躍的に研究が進められている[1]。動物細胞の single cell 解析技術は、細胞が基板表面上に付着する性質を利用するため、様々な光学顕微鏡を活用している[1]。しかし微生物は、基板表面上に一つ一つを付着配置し、一度配

置した微生物を基板表面上から剥離するための制御技術がこれまで存在しなかった。そのため、微生物の single cell レベルでの解析は、おもにセルソーターを利用した技術が活用されている[2]。しかし、セルソーターによる微生物の single cell 解析は、土壌中に生息する微生物を直接解析することが極めて困難であった。1 個の土壌微粒子に複数個の微生物が強固に付着しており、土壌微粒子に付着した微生物を生きたまま剥離することが極めて困難なためである [3]。

引用文献

[1] Robertus, J., Browne, W.R. and Feringa, B.L.: Dynamic control over cell adhesive properties using molecular-based surface engineering strategies, Chem. Soc. Rev., **39**, 354-378 (2010).

[2] Manome, A., Zhang, H., Tani, Y., Katsuragi, T., Kurane, R., and Tsuchida, T.: Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells, FEMS Microbiol. Lett., **197**, 29-33 (2001).

[3] Ramsay, A.J.: Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography, Soil Biol. Biochem., **16**, 475-481 (1984).

2. 研究の目的

本研究は、土壤中および培養液中の様々な微生物を、1) 光学的に透明な電極基板上へ電氣的に誘引付着させる技術、そして2) 電極基板上に付着した微生物を、生きた状態で剥離回収する技術を開発する。

3. 研究の方法

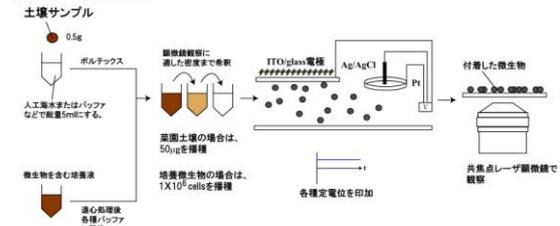
図1に実験方法のプロトコルを示した。微生物を電極基板上に付着する手法を以下に説明する。PBSまたは人工海水で土壌サンプルを5分間ボルテックスする。その後、50マイクログラム/5mlまで希釈した後、3電極チャンバーに加える。一晚培養した微生物の場合、微生物を遠心処理後、上澄みをPBSまたは人工海水に置き換える。そして、 $1 \times 10^6$  cells/5mlに希釈した微生物懸濁液を3電極チャンバーに播種する。3電極チャンバー内の各種サンプルを、24時間、各種定電位にて印加した。24時間の定電位印加後、電極上に付着した微生物をデヒドロゲナーゼ活性染色試薬で処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。

微生物を電極基板上から剥離する手法を以下に説明する。電極基板上に付着させた微生物に、 $\pm 10$  mV vs Ag/AgCl, 9MHzの三角波変動電位を1時間印加する。

変動電位印加前後の上澄みを寒天培地に播き、形成したコロニーを数えることで、変動電位印加によって剥離した生菌の回収率を測定した。

さらに電極上に残された微生物をバックライト染色法で生死判別し、1時間の変動電位印加後における微生物の生存率についても測定した。

微生物の誘引付着



微生物の剥離回収

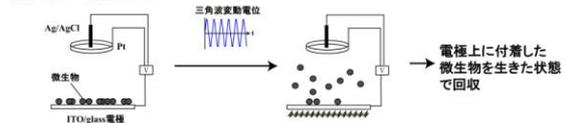


図1 微生物の電極上での吸着剥離法

4. 研究成果

図2は各種定電位を24時間、PBS中、室温の条件で印加したときの、電極表面上における大腸菌の分布パターンを示したものである。四角い部分がガラス基板、その周りがITO電極をそれぞれ示している。

大腸菌は、+0.4Vの電位印加条件ではほとんど電極表面上に付着せず、-0.4Vの電位印加条件で、ITO電極表面上に選択的に付着することが明らかとなった。

図2右上の写真は、60°Cの70%エタノールで1時間、固定処理した大腸菌を電極表面上に付着させようとしたときのものである。-0.4Vの定電位を24時間印加しても、死んだ大腸菌は電極表面上には付着しないことが確認された。

-0.4Vの電位印加で電極表面上に付着させた大腸菌を、走査型電子顕微鏡で観察した結果、大腸菌は繊維状物質を電極表面上に伸ばして付着していることが確認された。

*Escherichia coli* (JCM1649)

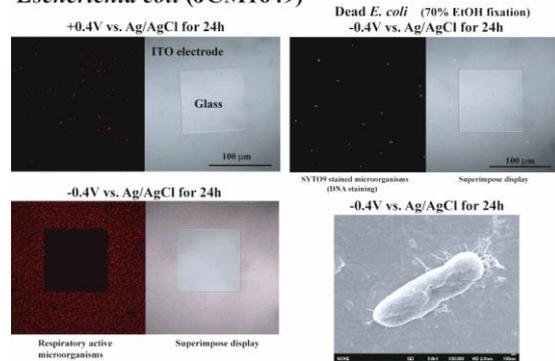


図2 大腸菌の電極上への付着

図3は、+0.6Vから-0.6Vまでの各種定電位を24時間印加したときの、電極表面上における大腸菌の分布パターンをしらべたものである。

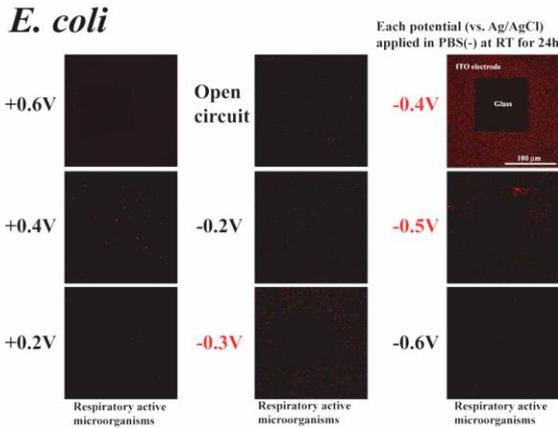


図3 各電位印加条件での大腸菌の付着

大腸菌は $-0.3\text{ V}$ から $-0.5\text{ V}$ までの電位印加条件で電極表面上に付着し、 $-0.4\text{ V}$ で最も多く付着することが確認された。

上述した範囲以外の電位印加条件では、電位印加しない条件と比べ、大腸菌の付着密度に差が見られなかった。

続いて、枯草菌や、バチルスハロデュランス、シュワネラバイオラセア、コクリアロゼア、シュワネラオネイデンシスについても、定電位印加による電極基板上への付着の影響を調べた(図4)。その結果、シュワネラバイオラセアでは人工海水中で $-0.3\text{ V}$ 、それ以外の微生物は大腸菌と同様PBS中で $-0.4\text{ V}$ の定電位を印加した電極上に強く引き寄せられることが明らかとなった。

電極基板上に付着した各種微生物を走査電子顕微鏡で観察すると、大腸菌と同様、繊維状物質を電極表面上に伸ばして付着していることが確認された。

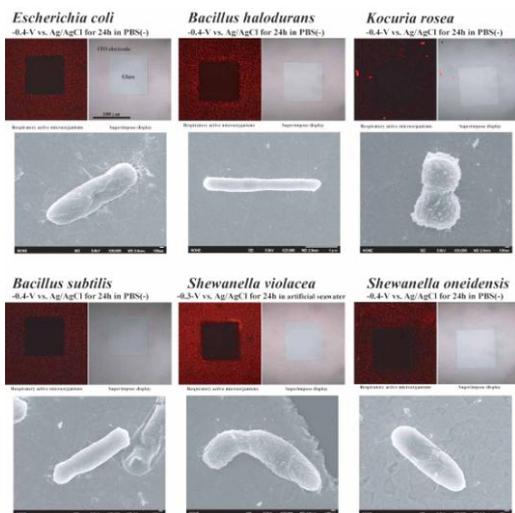


図4 各種微生物の電極上への付着

図2から図4でそれぞれ示した、電極上に付着した微生物は、セルスクレイパーで2-3回ひっかいても電極上から剥がすことができなかった。そこで、次に電気を利用した微生物の剥離回収法について検討した。

著者は高周波変動電位を印加することによって、電極上のタンパク質を剥離したり、動物細胞を剥離回収後、継代培養することにも成功している。そこで、電極表面上に付着した微生物も、高周波変動電位を印加することによって、生きた状態で剥離回収できるか検討した。

図5は、 $-0.4\text{ V}$ の定電位を24時間印加することで、グラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌である枯草菌を電極表面上にそれぞれ付着させた後、 $\pm 10\text{ mV}$ 、 $9\text{ MHz}$ の三角波変動電位をさらに1時間印加することで、電極上の微生物を剥離回収した時の結果をしめしたものである。

大腸菌と枯草菌、ともに三角波変動電位を1時間印加することで、電極上に付着した微生物を99%以上、剥離することに成功した。

変動電位印加後の菌体の生存率は、BacLight染色から大腸菌では93%、枯草菌では40%であることを明らかとした。

三角波変動電位印加前後の上清をそれぞれ回収し、変動電位印加によって剥離した生菌の回収率を測定した結果、大腸菌で80%、枯草菌で54%と、グラム陰性菌である大腸菌の方が生存率および生菌回収率が良いことが明らかとなった。

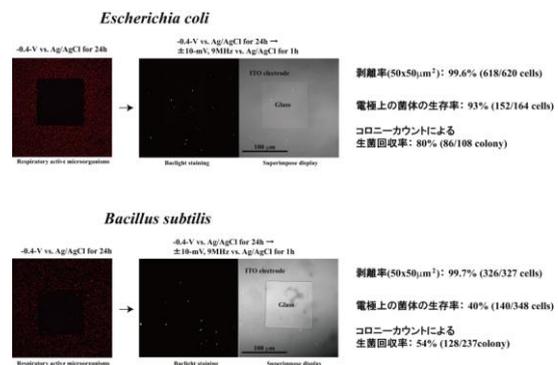


図5 変動電位印加による大腸菌および枯草菌の剥離率と生存率

図6にJAMSTEDCの庭園土壌サンプルから微生物を回収した時の結果を示した。

PBS中に分散させた庭園土壌サンプルを室温で24時間、 $-0.4\text{ V}$ の定電位を印加した結果、土壌中の微生物を電極表面上に誘引、付着させることに成功した(図6)。

## Soil sample

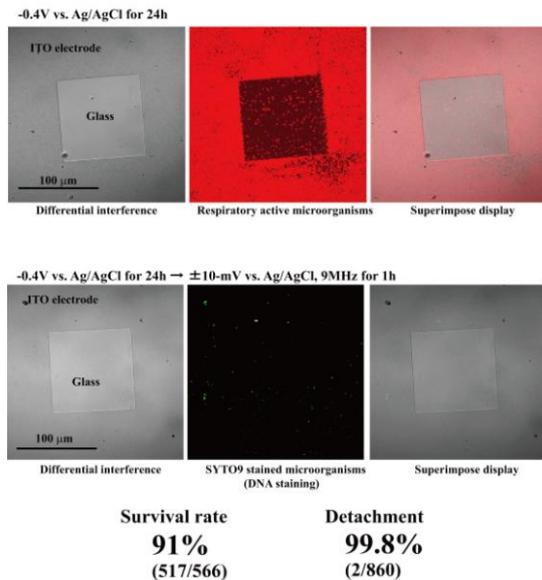


図6 高周波変動電位印加による電極上に付着した微生物の剥離回収

さらに±10 mV、9 MHzの三角波変動電位を1時間印加することで、電極上に付着した99%以上の土壌微生物を電極表面上から剥がすことにも成功した。三角波変動電位を1時間印加した後の電極上に残された微生物の生存率は91%であることを明らかにした(図6)。

相模湾初島沖の深海底泥サンプルから電気的に回収した微生物について、16S rRNA遺伝子による系統解析の結果を図7に示した。

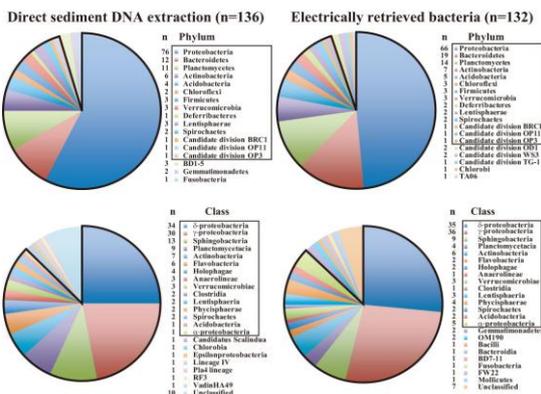


図7 相模湾初島沖の深海底泥サンプルから電気的に回収した微生物についての16S rRNA遺伝子による系統解析

人工海水中に分散させた深海底泥サンプルへ、4°Cにて24時間、-0.3Vの定電位を印加した結果、電気的に回収できた微生物には、図7のような18門、35綱の微生物が含まれることを明らかにした。これらの微生物のうち、太線で囲われた、96%の門および綱に属する微生物は、深海底泥サンプルから直接DNAを抽出したものと同一の門および綱に属することが明らかとなった。

び85%の綱に属する微生物は、深海底泥サンプルから直接DNAを抽出したものと同一の門および綱に属することが明らかとなった。

## 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 小山純弘、電気による細胞機能の機能制御法、日本鉄鋼協会シンポジウム(招待講演)、2012年2月10日、名古屋市名古屋駅前イノベーションハブ
- ② 小山純弘、深海生物の地上での研究法、日本大学文理学部化学科大学院特別講義(招待講演)、2011年12月9日、東京都世田谷区 日本大学
- ③ 小山純弘、物理刺激による細胞機能の工学的制御法、日本大学文理学部化学科大学院特別講義(招待講演)、2011年12月9日、東京都世田谷区 日本大学
- ④ 小山純弘、他8名、ITOパターン電極による生きた微生物の付着および剥離の電気制御、第12回極限環境生物学会年会、2011年11月28日、長崎県 長崎大学
- ⑤ 小山純弘、他8名、電極基板における生きた微生物の付着配置および剥離の制御、第63回日本生物工学会、2011年9月27日、東京都小金井市 東京農業大学
- ⑥ 小山純弘、深海生物の地上での研究について、芝信用金庫雪谷支店信友会 特別講演(招待講演)、2011年9月9日、東京都大田区 プラザアペア

## [産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 土壌微生物の調製方法およびその利用

発明者: 小山純弘、坪内泰志

権利者: 独立行政法人海洋研究開発機構

種類: 特許

番号: 特願2012-55306

出願年月日: 2012年3月13日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 純弘 (KOYAMA SUMIHIRO)

独立行政法人海洋研究開発機構

海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号: 50344297

