

平成 2 6 年 5 月 2 8 日現在

機関番号 : 2 5 4 0 6

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 6 5 8 2 9 2

研究課題名 ( 和文 ) nano FRET - SNOMによるバクテリアべん毛の動的機能性評価システム

研究課題名 ( 英文 ) Development of Nano-FRET dynamic functional evaluation system for microbial

研究代表者

吉野 智之 ( YOSHINO, Tomoyuki )

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号 : 3 0 3 9 1 2 0 4

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 2,900,000 円、( 間接経費 ) 870,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : バクテリア (Salmonella typhimurium など) のべん毛の液中原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った。生きたままのべん毛が観察することができた。しかしながら、液中走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM) 観察は、べん毛が柔らかく、光プローブの改良が必要ながわかった。そのため、比較的硬い動物細胞で相互作用力測定を行った。その結果、非特異的吸着と特異的吸着を分けることができた。

これらから「動的機能性評価システム」構築の可能性があわかった。

研究成果の概要 ( 英文 ) : The bacteria (Salmonella typhimurium) were observed by atomic force microscopy (AFM) in liquid. Flagella of living bacteria were observed by AFM in liquid. However, the bacteria were not observed by near-field optical microscopy (SNOM) in liquid, because, flagella are very soft. The improvement of the optical probe is necessary. Therefore, hardly animal cell were observed by AFM in liquid for interaction force between receptor and ligands. Nonspecific adsorption force and specific adsorption force were measured respectively.

"Nano-FRET dynamic functional evaluation system" construction was possible.

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード : 顕微鏡技術 AFM SNOM バクテリア べん毛

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリアのべん毛モータはその発見以来 30 年たつが、いまだにその回転メカニズムは不明である。生きたままのバクテリアのべん毛回転計測はテザードセル法が使われている。しかしながら、テザードセルそのものの実態はわかっておらず、信憑性に欠ける論文も多い。最近、テザードセルの菌体がいつもガラス基板と接触していること、接触のしかたによってはべん毛モータが逆転することなどが明らかにされている。

一方、運動観察に使用される光学顕微鏡は分解能が低く、電子顕微鏡は化学固定された静的高分解能観察である。高さ方向の観察は、共焦点レーザー顕微鏡が用いられるが、高さ方向の分解能は約 200nm である。これらの顕微鏡のギャップを埋めるには、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) が優れている。また、SPM のひとつである走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM) は、近接場光を利用して蛍光色素の位置を光学限界 (200nm) を越えた分解能 (研究代表者のデータでは約 16nm) で観察できる。SPM の大きな欠点は、基板に結合した試料しか観察することができないことである。

### 2. 研究の目的

バクテリアべん毛の回転運動を観察するテザードセル法において、周りの環境によって回転方向が変化することが分かっている。しかしながら、べん毛と基板との相互作用はわかっていない。

そこで、本研究では、走査型プローブ顕微鏡のひとつである液中原子間力顕微鏡 (AFM) による基板とべん毛との相互作用の状態の把握を行った。また、走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM) による FRET 法を開発した後、通常の方法では不可能と言われている基板から浮いたべん毛の可視化を行い、べん毛と基板との相互作用を明らかにする。最終的には、バクテリア菌体を固定し、べん毛を自由に運動させた後、SNOM 光プローブの横振動測定を行い、べん毛の回転数やトルク等の測定できる「動的機能性評価システム」を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) サルモネラべん毛の野生型および変異体 (ストレート型) に対する基板上的の抗体の厚みや有無などの影響を液中原子間力顕微鏡観察 (AFM) で検討した。70% エタノールで清浄されたガラス基板と清浄されたガラス基板にポリ L リジン (PLL)、1% グルタルアルデヒド (GA) および H-i 抗体をコートしたものを観察用基板とした。

さらに、*Peanibacillus alvei* AuG6 のべん毛を通常の大気中観察用 AFM 探針で観察した。(2) 取り扱いが容易な *Bacillus subtilis* を観察試料とした。まず、生きたまま固定するための条件を検討した。ゼラチンをガラス基板に塗布した後、*Bacillus subtilis* を観察

直前に遠心した試料を滴下した。さらに、液中走査型光プローブ顕微鏡観察 (SNOM) を行った。

(3) 「動的機能性評価システム」を構築するため、相互作用力検出を検討した。生きたままの細胞膜上の受容体 (LOX-1) と変性 LDL で修飾したプローブで行った。なお、相互作用力阻害物質候補として、グアバ茶抽出物およびはぶそう茶抽出物を使用し、それぞれ培養液に添加した。

### 4. 研究成果

(1) 観察試料の最も良い作製方法は、観察を行う直前に遠心した試料を滴下する方法だった。*Salmonella typhimurium* の液中 AFM 観察では、ストレート型べん毛は、べん毛の重なるの上下がわかった (図 1)。

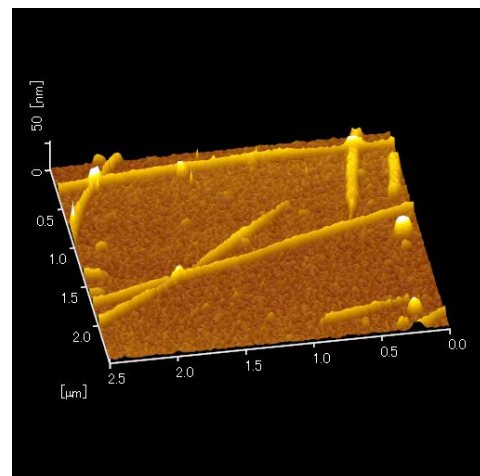


図 1 *Salmonella typhimurium* のストレートべん毛

野生型べん毛では、基板に固定されている部分は観察が容易であったが、浮いている部分は形状が明確ではなく、AFM のエラー信号から推察できる程度だった。しっかり基板に固定されていないべん毛は液中 AFM 観察中に動いてしまうことがわかった (図 2)。

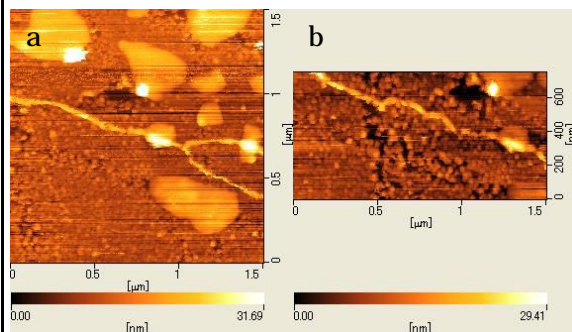


図 2 *Salmonella typhimurium* の野生型べん毛

a; 1 回目の観察, b; 2 回目の観察

さらに、べん毛がなくフックのみを構築する変異体を観察した結果、細胞膜上のフック構造(約 50 nm)を観察することができた(図 3)。

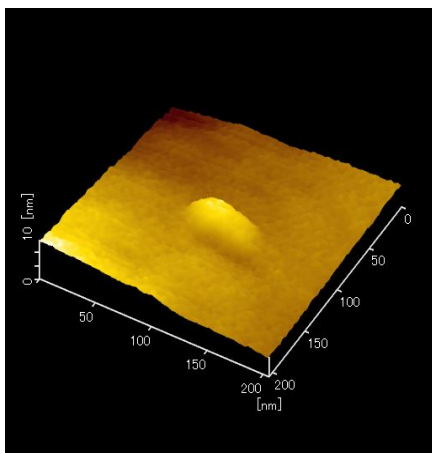


図 3 *Salmonella typhimurium* のフック構造

また、*Peanibacillus alvei* AuG6 のべん毛を通常の大気中観察用 AFM 探針で観察するとフックの周りにらせん状の構造が取り巻いている様子が初めて観察された(図 4)。

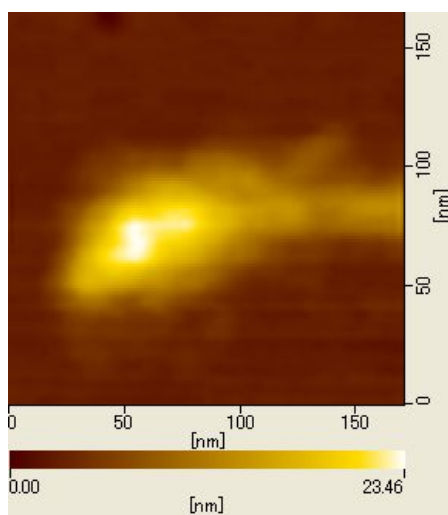


図 4 *Peanibacillus alvei* AuG6 のべん毛

(2)ゼラチン基板に接着しているものと接せず浮遊したり、部分的にだけ接着し一部動いているものがあった。それらの中から接着している *Bacillus subtilis* 栄養体を選択して AFM 観察を行った。栄養体は表面がとても柔らかく、強い力をプローブにかけて観察しようとする、プローブが表面構造を引きずってしまい観察ができなかった。一方、非常に弱い力で観察した場合 *Bacillus subtilis* 表面の上の部分のみ観察でき、基板にはプローブが届かず基板を AFM で観察することはできなかった(図 5)。

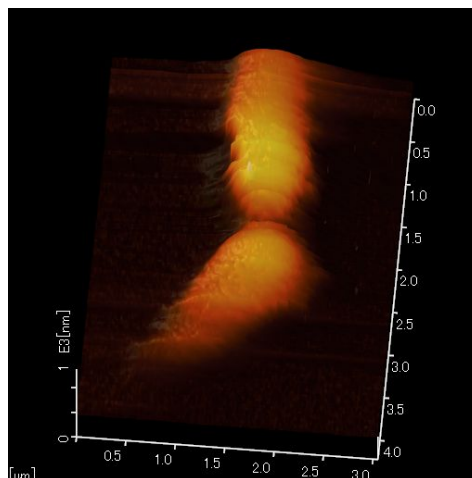


図 5 *Bacillus subtilis* の栄養体

SNOM 光プローブで、488nm の近接場光を作り、それによって *Bacillus subtilis* (Alexa488) を励起させた。しかしながら、蛍光の取得は難しく安定して観察できなかった。また、光プローブと *Bacillus subtilis* との相互作用力検出も難しかった。これらは、光プローブのパネ定数が大きく、ゼラチン固定の生きたままの *Bacillus subtilis* には不相当であるためだと考えられる。

(3)非特異的吸着は 10 pN 以下、特異的吸着は 20 pN 以上であることがわかった(図 6)。また、グアバ茶抽出物およびはぶそう茶抽出物は、非特異的吸着の相互作用が増すことから、相互作用力阻害物質として働くことがわかった。

これらから、「動的機能性評価システム」構築の可能性があることがわかった。

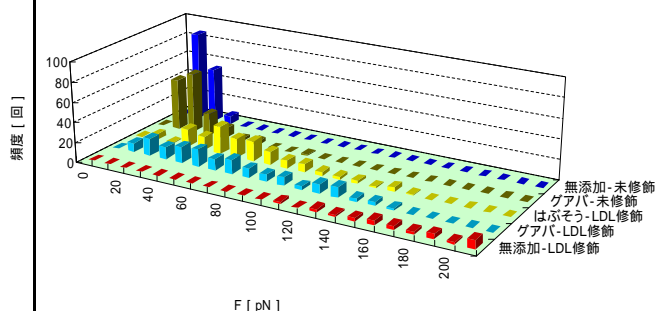


図 6 相互作用力測定

## 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

S. Sugiyama, T. Yoshino, T. Hirose, T. Ohtani, Scanning, 34, (2012), 186-190, Karyotyping of barley chromosomes by a new fluorescence banding technique combined

with scanning probe microscopy, DOI:  
10.1002/sca.20287

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉野 智之 (YOSHINO, Tomoyuki)  
県立広島大学・生命環境学部・准教授  
研究者番号：30391204

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：