

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26630422

研究課題名(和文) 微小空間適応を利用したシアノバクテリアの葉緑体化への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to artificial transformation of cyanobacteria into chloroplasts by adaption inside microscaled space

研究代表者

石田 忠 (Ishida, Tadashi)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80517607

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)：本研究は、微小空間にシアノバクテリアを閉じ込めることにより、シアノバクテリアの分裂・肥大抑制を行い、そのシアノバクテリアが脂肪酸を放出することを確認するものである。シアノバクテリアの大きさと同じくらいのマイクロピラーアレイの間隙にシアノバクテリアを閉じ込めたところ、シアノバクテリアの分裂・肥大は停止したが、シアノバクテリアは死亡しないことが確認できた。脂肪酸の放出を確認するためには脂肪酸の検出手法の確立が不可欠であったため、遺伝子操作したシアノバクテリアが放出する脂肪酸であるパルミチン酸の検出において、質量分析装置を用いて培養液内の検出を行ったところパルミチン酸を検出可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The challenge of this research project is to achieve the transformation of cyanobacteria inside microscaled spaces into chloroplasts by environmental adaption. In order to achieve this project, we performed three things; (1) suppression of the growth and division of the cyanobacteria using a micro pillar array, (2) scale-up the micro pillar array, (3) detection of the fatty acid outside the cyanobacteria inside micro pillar array.

(1) We designed and fabricated a PDMS micro pillar array, which has micro pillars with gaps of 2 micrometers. The cyanobacteria were trapped at the gaps, resulting in the suppression of the growth and division of the cyanobacteria. (2) We increased the number of the micro pillars of the micro pillar array to increase the possibilities of the trapped cyanobacteria. The yield of the scaled-up micro pillar array is extremely low. (3) For the detection of the released fatty acid from cyanobacteria, we could detect fatty acid using mass spectroscopy.

研究分野：マイクロ工学

キーワード：シアノバクテリア 葉緑体 マイクロピラー バイオ燃料 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

植物は体内に葉緑体を持ち、光合成で栄養を作り出せる。これは植物細胞が葉緑体の祖先のシアノバクテリアを外敵から守り、シアノバクテリアが自身のバイオマスの何倍もの栄養を植物細胞に供給する共生関係にあるからである。しかし、シアノバクテリアは通常光合成で得た栄養の大半を分裂・肥大に消費している。この違いは、細胞という微小空間が一つの要因と考えられる。シアノバクテリアの分裂・肥大を止めると、体内の栄養、特に脂肪酸濃度が上昇し、それが界面活性剤として働くことで脂質二重層の細胞膜にダメージが入り、最悪死に至る。この系で繁殖に有利な条件は、脂肪酸を体外に放出することであり、環境適応で脂肪酸を放出するシアノバクテリアに転じる(葉緑体化)可能性があると考えた。

2. 研究の目的

微小空間に閉じ込めたシアノバクテリアが環境適応により脂肪酸を放出する個体が発生するかをスクリーニングにより調べる。

3. 研究の方法

2.の研究目的を達成するため、以下の(1)~(3)のアプローチを用いる。

(1) マイクロピラーアレイを用いたシアノバクテリアの分裂抑制

シアノバクテリアと同程度の大きさの空隙となるようにマイクロピラーを配置する。このマイクロピラーをアレイ状に配列することで複数のシアノバクテリアを同時に微小空間に格納することが可能となる。この微小空間においてシアノバクテリアを培養し、分裂の抑制を試みる。

(2) 脂肪酸の検出方法の確立

シアノバクテリアが体内に脂肪酸を溜め込んでいるか、体外に放出しているかを調べるため、脂肪酸の検出方法を確立する。脂肪

酸の固体の検出に用いられる染色法や分光法、微量物質の検出に用いられる質量分析法を検討した。染色法では、液中の脂肪酸を可視化する点と実験中に染色する点から、簡易なプロセスで染色が完了するためがあるためズダンブラックを用いることにする。分光法では、脂肪酸化合物の検出に用いられるラマン分光を検討する。ノンラベルの顕微分光を行うことで、シアノバクテリアとその周辺の脂肪酸を計測する。質量分析は微量物質の検出において広く用いられている手法であり、染色法や分光法で検出不可能な程微量な脂肪酸の検出が必要となった際に用いる。

(3) 多数のシアノバクテリア格納用マイクロピラーアレイの作製

微小空間に環境適応するシアノバクテリアは極めて少ないと考えられるため、一度に多数のシアノバクテリアを微小空間に充填できる、マイクロピラーアレイを作成する。これにより環境適応確率が低い変異体であっても検出することを目指す。

4. 研究成果

(1) マイクロピラーアレイを用いたシアノバクテリアの分裂抑制

マイクロピラーアレイを用いてシアノバクテリアの分裂・肥大を抑制できることを確認した。シアノバクテリアの大きさと同じくらいのサイズのマイクロピラーアレイ間隙にシアノバクテリアを閉じ込めたところ、シアノバクテリアの分裂・肥大は停止した。このとき、シアノバクテリアの色の観察から死亡していないことも確認できた。

(2) 脂肪酸の検出方法の確立

遺伝子操作したシアノバクテリアが放出する脂肪酸の主成分であるパルミチン酸の検出において、染色法、分光法、質量分析法を試みた。染色法においては、当初予定したズダンブラックはパルミチン酸を多少黒く染めることができたが、その細胞毒性

や感度の低さから、パルミチン酸の検出には不向きであった。また、中性脂肪に結合して蛍光を発する Nile Red は、グリセロール構造に結合することと PDMS のもつ自家蛍光と重なってしまうため、パルミチン酸の検出に不向きであった。分光法として、顕微ラマン分光を行ったが、パルミチン酸のスペクトルにおいてパルミチン酸由来のピークを確認できず、パルミチン酸の検出ができなかった。質量分析装置を用いてパルミチン酸の検出、脂肪酸放出株の培養液上澄みの検出を行ったところ両試料からパルミチン酸を検出することができた。

(3) 多数のシアノバクテリア格納用マイクロピラーアレイ

マイクロピラーアレイのスケールアップを試みたところピラー高さの歩留まりが悪く、多数のシアノバクテリアを微小空間に閉じ込めることが難しかった。今後プロセスを改善して歩留まりの高いマイクロピラーアレイを実現し、それを用いて多数のシアノバクテリアから微小空間に適応するシアノバクテリアのスクリーニングを行いたい。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

T. Ishida, R. Abe, T. Omata, N. Takatani, T. Omata, "Photosynthesizing Cyanobacteria inside Confined Space at Microscale," 25th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, pp. 343-344, Nagoya, Japan, Nov. 12, 2014.

阿部遼, 石田忠, 小俣透, 高谷信之, 小俣達男, 「光合成を行うシアノバクテリアのマイクロ空間内での挙動観察」, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014, 3P2-G07, 富山市総合体育館, 富山, 2014年5月29日.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www.olab.pms.titech.ac.jp/research/research_frame.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 忠 (ISHIDA, Tadashi)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教

研究者番号：80517607

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

林 智広 (HAYASHI, Tomohiro)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号：30401574

小俣 達男 (OMATA, Tatsuo)

名古屋大学・大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号： 50175270