

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03762

研究課題名(和文) オンチップ時空間制御による光合成細胞の環境応答機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of environmental response of photosynthetic cells by on-chip spatiotemporal control

研究代表者

新井 史人(Arai, Fumihito)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：90221051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：藍藻の生体膜に発現しているイオン輸送体の一つである機械刺激受容性チャネル(メカノセンシティブチャネル：mechanosensitive channel, MscL)は、細胞の浸透圧調節および生体膜のテンションの調節に必須と考えられているが、細胞サイズが小さいことから、これまで、浸透圧変化に対する特性は不明な点が多い。本研究では、マイクロ流体チップ、ロボット、光ピンセットをオンチップで統合した新たなシステムを構築し、特定のイオン輸送体の有無によって現れる藍藻の機械特性の変化を実験的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大きさ2 μm 程度の小さな細胞の評価は困難であり、その機能の多くは未解明なままである。光合成細胞である藍藻は、外界の浸透圧が下がると細胞が破裂し、死に至ってしまう。このため、イオン輸送体を用いてイオン等を流出させることにより細胞内の浸透圧を下げ、それ以上の水の流入を防ぐ適応機構が備わっている。本研究により、細胞の浸透圧変化に対する物理指標の変化を定量的に評価する方法論が示され、藍藻の生体膜で機能する特定のイオン輸送体によって現れる藍藻の特性が明らかになった。提案手法は、他の実験系にも適用できるため、波及効果がある。

研究成果の概要(英文)：Mechanosensitive channel (MscL) is known as an ion channel of cyanobacteria. It is necessary for the regulation of osmotic pressure of cell and tension of the biomembrane. However, the mechanical property of whole cell for such osmoregulation is not well investigated. In this study, to overcome the difficulties caused by the small size of the cell, a measurement system is constructed. This system consists of a robot integrated microfluidic chip and an optical tweezers system. Using this system, change of the mechanical property of the cell caused by the absence of the MscL was clarified by the experiments.

研究分野：機械力学、ロボティクスおよびその関連分野

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 超精密計測 ナノバイオ 機械力学・制御 バイオ関連機器 マイクロ流体チップ 光ピンセット 藍藻

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は、環境変化などによる外部刺激によって、代謝の変化を伴いながら環境に適応する機能を有する。しかし、大きさ $2 \mu\text{m}$ 程度の小さな細胞の評価は困難であり、その機能の多くは未解明なままである。微生物は、外界の浸透圧が下がると細胞が破裂し、死に至ってしまう。このため、イオン輸送体を用いてイオン等を流出させることにより細胞内の浸透圧を下げ、それ以上の水の流入を防ぐ適応機構が備わっている。藍藻の生体膜には、イオン輸送体が発現している。例えば、イオン輸送体の一つである機械刺激受容性チャネル(メカノセンシティブチャネル: **mechanosensitive channel, MscL**)は、細胞の浸透圧調節および生体膜のテンションの調節に必須と考えられている。これまで、イオン輸送体 MscL の機能解析は十分に行われておらず、細胞の機械特性や容量変化へのイオン輸送体 MscL の影響を考察するためのデータは十分に示されていない。

2. 研究の目的

本研究は、マイクロ流体チップとロボットをオンチップで統合した新たなシステムを構築し、藍藻に対してオンチップで計測環境状態を時空間的に制御し、異なる環境刺激下における藍藻の動的機械特性計測を行う。また、オンチップで計測環境状態を時空間的に制御し、異なる環境刺激下における粘弾性の変化をみることで、藍藻の生体膜で機能するイオン輸送体 MscL による環境適応能力を調べることを目的とした。

計測対象とする細胞として、藍藻の野生株(正常株)とイオン輸送体 MscL を欠損した遺伝子改変株(欠損株)とした。異なる環境刺激下における粘弾性の変化から、藍藻の生体膜で機能するイオン輸送体による環境適応能力に関して、物理指標を定量的に評価する方法を提案し、有効性を実証する。また、これにより、イオン輸送体によって現れる藍藻の特性を実験的に明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マイクロ流体チップ(以下、チップ)を用いて、オンチップで計測環境状態を時空間的に制御し、藍藻の動的機械特性計測を実現するための実験装置を構築する。
- (2) AFM を用いた計測系も並行して進め、チップによる計測と AFM による計測の結果を比較する。
- (3) 並行して、マイクロ流体チップ内の局所領域に藍藻を固定して、気液界面の移動による溶液置換のシステムを構築する。溶液置換を高速に行うことで、藍藻に浸透圧刺激を与えた前後の細胞サイズの変化を高速ビジョンで計測する。
- (4) 実験では、藍藻のイオン輸送体 MscL 欠損株を計測対象とする。藍藻の生体膜で機能する輸送体および細胞体積調節蛋白質の遺伝子の不活化株を、相同的遺伝子組換え技術によって作成する。チップによる計測系、AFM、気液界面の移動による計測系を用いて、正常株と欠損株を比較することで、イオン輸送体 MscL の特性を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 計測技術および環境制御技術の理論的、実験的な実現可能性について検証するため、マイクロ流体チップ(以下、チップ)を用いて、オンチップで計測環境状態を時空間的に制御し、藍藻の動的機械特性計測を実現するための実験装置を設計して、システムを構築した。このシステムは、計測対象の細胞を、マイクロ流体チップ内の流路を連続的に流して計測点に搬送し、力計測するものである。チップ内部に力センサプローブを組み込み、力センサを駆動する圧電アクチュエータを外部にセットし、チップ内部のプローブを駆動して藍藻の

力計測を行った。計測対象の藍藻は光ピンセットによって、計測点であるプローブ間に位置決めできるようにした。力計測系と溶液置換系を改良した新しいチップをデザインし、環境制御系および粘弾性計測系を実装した。

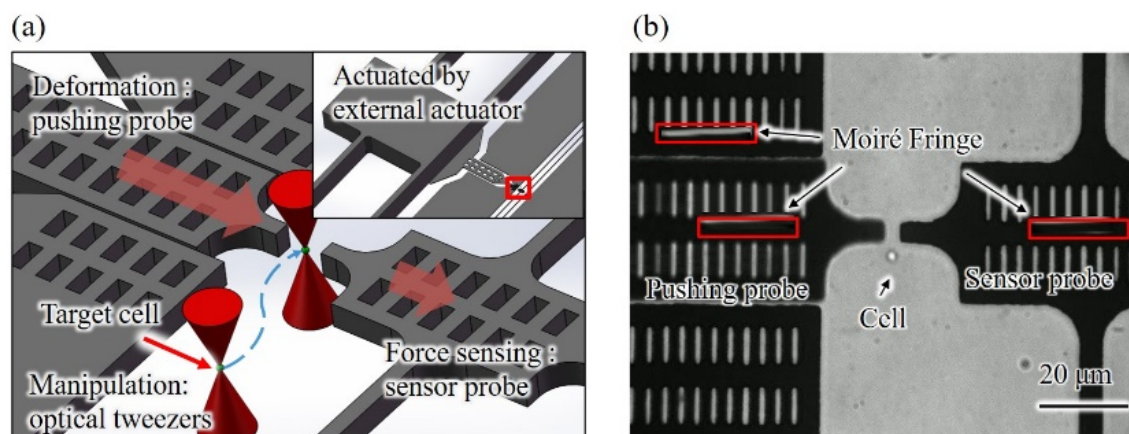


Figure 1 (a) Principle of the chip measurement method, (b) figure of the experiment.

光ピンセットと組み合わせた、シリコンとガラスで構成されたオープンチップを設計した。チップ測定法の原理を図 1(a)に示す。細胞を光ピンセットで測定位置に移動し、押し込みプローブとセンサープローブの間で細胞を圧縮する。2つのプローブの変位を記録することで、圧縮時の力曲線を得ることができた。得られた力曲線をヘルツ接触モデルでフィッティングし、単一細胞のヤング率を算出した。チップの力センサのバネ定数は 0.0326 N/m である (PDMS ビーズを用いて校正)。変位測定の安定性が $4.7 \text{ nm}(3\sigma)$ であるサンプリングモアレ縞法と組み合わせることで、単一の藍藻のヤング率を測定するのに十分な感度が得られた。図 1(b)に細胞の実験図を示す。

また、溶液交換による単一細胞の測定を実現するために、複数の流路を持つ密閉型チップを設計した (図 2 (a))。2種類の異なる溶液を層流で流すことで、測定領域に安定した液液

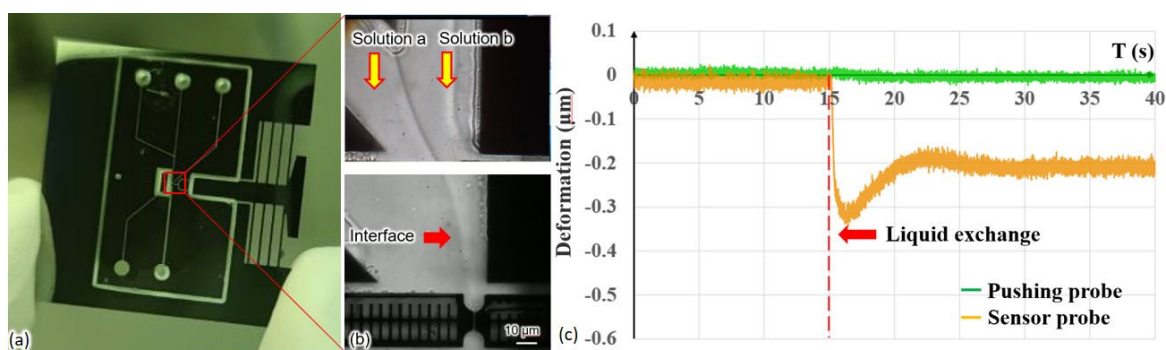


Figure 2 (a) View of the fabricated microfluidic chip, (b) interface of two different liquid, and (c) the movement of sensor, pushing probe before and after the liquid exchange.

界面を形成することができた (図 2 (b) 参照)。この界面は、溶液の注入圧力を制御することで移動させることが可能である。このチップは、高速かつ連続的な溶液交換を実現し、異なる浸透圧濃度における細胞のヤング率を同時に測定することができる (図 2 (c))。浸透圧刺激が細胞に与えた影響は、溶液交換時の細胞の変形の変化によって明らかにすることができた。

(2) AFM を用いた計測系も並行して進め、チップによる計測と AFM による計測の結果を比較した。同様の結果が認められたことから、提案した計測手法の有効性を示した。

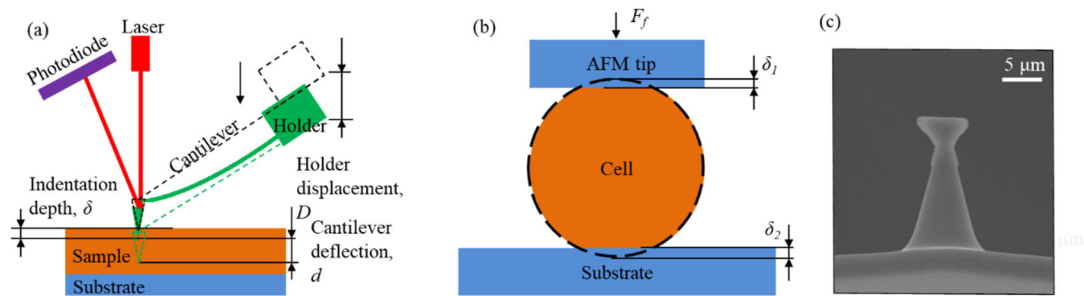


Figure 3 (a) Schematic diagram of stiffness measurement using a sharp AFM tip, (b) Schematic diagram of stiffness measurement using a flat AFM tip. (c) An SEM photograph of the flat AFM tip

従来の先端の尖ったカンチレバー(以下, シャープチップ)を用いた AFM 測定(図 3(a))では, 形状パラメータの誤差や, 実際の状況が理論上の接触モデルと適合せず, 誤差が生じる可能性が考えられた. この問題を解決するために, 図 3 (b) および (c) に示すように, 表面積が細胞よりも大きくなるように先端が平らに設計されたカンチレバー(以下, フラットチップ)を使用した. シャープチップを用いて測定した PDMS ビーズのヤング率は $2.08 \pm 0.95 \text{ MPa}$ で, 実測値 $1.45 \pm 0.06 \text{ MPa}$ (市販の引張試験機による測定) とは異なる値を示した. 一方, フラットチップで測定した結果は $1.49 \pm 0.27 \text{ MPa}$ で, スチューデントの t 検定では有意な差は示されなかった. AFM を用いたチップ法の信頼性を確認するために, AFM を用いた研究が広く行われている, イースト菌を対象細胞として選定した. イースト菌は Conavalin A (以下, ConA) を用いてガラス基板の上に固定化した. 10 個のイースト菌を AFM とチップの二通りの手法で測定したところ, ヤング率はそれぞれ $5.09 \pm 1.51 \text{ MPa}$ と $4.54 \pm 0.81 \text{ MPa}$ であった. スチューデントの t 検定では, 有意な差は示されず, チップ法の信頼性が確認できた.

(3) (1), (2) と並行し, マイクロ流体チップ内の局所領域に藍藻を固定して, 気液界面の移動による溶液置換のシステムを構築した. 溶液置換を高速に行うことで, 藍藻に浸透圧刺激を与えた前後の細胞サイズの変化を高速ビジョンで計測できるシステムを構築した(図 4 (a)).

接着タンパク質 Cell-Tak を予め流路内に製膜することで, 細胞を流路底面に固定した. 高速溶液置換を行うために, まず流路底面と $5 \mu\text{m}$ の隙間を有するピラーを作製することで液体架橋力が作用する局所環境に表面張力が異なる領域を形成した. 気液界面の二層流体制御を行うことで局所的に表面張力が支配的な溶液環境を除いて空気で満たされる領域を形成した. この状態において, 生成される液滴は 10 pL 程と極微量であり, 流路内が空気で満たされた流路抵抗が低減された状態で, 高速な溶液導入が可能となった. このマイクロ流体チップを用いて細胞周囲の局所溶液環境を高速置換することで浸透圧刺激を与え, 細胞サイズの変化を高速ビジョンで計測し, 提案した評価系の妥当性を示した.

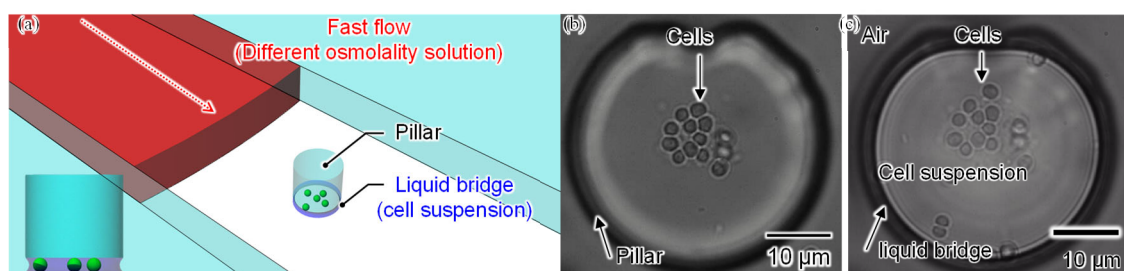


Figure 4 (a) Principle of high-speed solution replacement, (b) figure of the cells trapped between the pillar and the bottom of microchannel, (c) figure of the formed liquid bridge.

(4) 藍藻の生体膜で機能する輸送体および細胞体積調節蛋白質の遺伝子の不活化株を、相同的遺伝子組換え技術によって作成した。実験では、藍藻のイオン輸送体 MscL 欠損株を計測対象とした。また、他の細胞でも比較実験ができるようにイースト菌についてもサンプルを準備した。

AFM を用いた計測系とチップによる計測系を用いて、異なる浸透圧環境下での単一藍藻の機械的特性を計測した。藍藻のイオン輸送体 MscL 欠損株では、正常株と比較して、通常より高浸透圧条件下において、細胞内部からの溶液の流出によって剛性が下がり、逆に低浸透圧条件下において、細胞内部への溶液の流入によって剛性が上がることが計測された。

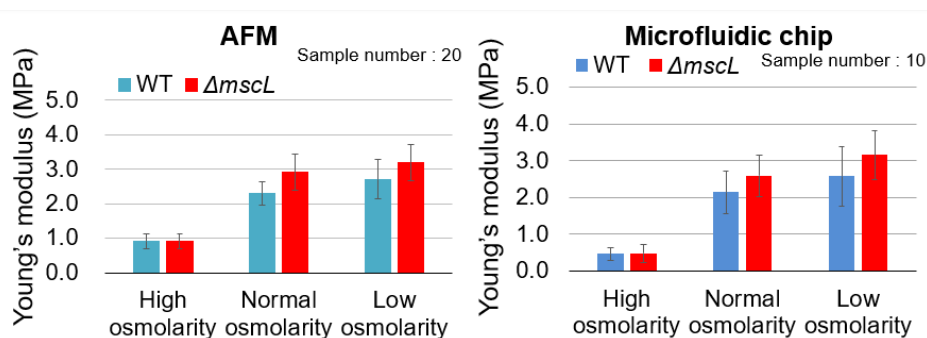


Figure 5 Young's modulus of cyanobacteria measured by flat AFM tip and microfluidic chip

AFM のフラットチップと流体チップを用いて、野生株 (以下, WT) と欠損株 (以下, Δ MscL) を、通常 (BG11)、低浸透圧 (BG11 : 水 = 1 : 9)、高浸透圧 (BG11 + 1mol/L ソルビトール) の 3 種類の浸透圧条件で測定した。その結果を図 5 に示す (サンプル数 = 10)。チップの結果は、MS チャネルの影響を明確に示している。高浸透圧では、WT と $\Delta mscL$ のヤング率は、それぞれ $0.46 \pm 0.17 \text{MPa}$, $0.47 \pm 0.25 \text{MPa}$ であり有意な差は示されなかった。通常の浸透圧では、 $\Delta mscL$ のヤング率 ($2.57 \pm 0.57 \text{MPa}$) は、WT のヤング率 ($2.14 \pm 0.57 \text{MPa}$) よりも有意に高かった。また、低浸透圧では、 $\Delta mscL$ のヤング率 ($3.16 \pm 0.66 \text{MPa}$) は WT のヤング率 ($2.59 \pm 0.82 \text{MPa}$) よりも有意に高かった。これらの結果から、通常の浸透圧と低浸透圧の溶液中では、MS チャネルを持たない細胞の方の剛性が高いことがわかった。AFM 法の結果は、チップ法とは若干異なる。しかし、その傾向はすべての実験条件で同じであった。この違いは、細胞の培養方法の違いや、測定システムの違いによる誤差が原因と考えられる。

また、気液界面の移動による溶液置換のシステムを用いて、同様な実験を行った。高浸透圧条件下において、藍藻のイオン輸送体 MscL 欠損株では、細胞内部からの溶液の流出によって細胞サイズが減少することが計測された。WT と Δ MscL の体積変化を時定数で評価し、それぞれ 12 ms, 5 ms であった。

これらの実験結果より、特定のイオン輸送体によって現れる藍藻の特性を実験的に明らかにする方法論を提案し、実験によって評価方法の妥当性を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Di Chang, Takahiro Hirate, Chihiro Uehara, Hisataka Maruyama, Nobuyuki Uozumi, and Fumihito Arai	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluating Young's modulus of single yeast cells based on compression using an atomic force microscope with a flat tip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 392 - 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S1431927620024903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Di Chang, Takahiro Hirate, Chihiro Uehara, Nobuyuki Uozumi and Fumihito Arai
2. 発表標題 Calibration process for the Young's modulus of a mechanically trapped microbead measured by atomic force microscopy
3. 学会等名 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子真悟, 解良康太, 魚住信之, 新井史人
2. 発表標題 液体架橋力を用いた局所溶液置換によるラン藻への浸透圧ショック
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦広峻, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 3次元ノズル形状の形成によるマイクロ狭窄流路における粒子供給性能の向上
3. 学会等名 第36回日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原 康, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 機械的指標に基づくセルソーティングシステムの提案
3. 学会等名 第36回日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉浦広峻, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 光学顕微鏡に統合化したレーザ干渉計による微小構造物の高速変位計測
3. 学会等名 第19回システムインテグレーション部門講演会 (SI2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Sugiura, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 3-D conical microchannel fabricated by wet etching using Ti/Au sacrificial layer
3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinya Sakuma, Yusuke Kasai, Fumihito Arai
2. 発表標題 High-speed On-chip Mixing Using On-demand Vortex Generation in Microstream
3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Di Chang, Shinya Sakuma, Chihiro Uehara, Nobuyuki Uozumi, Fumihito Arai
2. 発表標題 Mechanical Characterization of a Single Yeast Cell Using a Robot Integrated Microfluidic Chip
3. 学会等名 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Sugiura, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 Microscopic Laser Interferometry to Measure the Displacement of Micromechanical Objects
3. 学会等名 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子真悟, 解良康太, 魚住信之, 新井史人
2. 発表標題 浸透圧変化に対する単一細胞の動的形状変化の計測
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子真悟, 新井史人
2. 発表標題 マイクロ流体チップ内の局所溶液置換の高速化を目指した流路デザイン
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	魚住 信之 (Uozumi Nobuyuki) (40223515)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	
研究 分担者	丸山 央峰 (Maruyama Hisataka) (60377843)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------