

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18157

研究課題名(和文)人工細胞型微小インキュベーターの開発とその応用

研究課題名(英文) Synthesis of artificial cell-based incubators (microorganisms-containing artificial cells)

研究代表者

森田 雅宗 (MORITA, Masamune)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90708504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、世界で初めて、リポソーム(人工細胞)内での微生物培養に成功し、新規微生物培養器として人工細胞型インキュベーターの開発を行った。微生物を封入した均一サイズのリポソーム(人工細胞)をマイクロ流体デバイス技術により作製し、リポソーム(人工細胞)内に微生物をシングルセルレベルで封入した。光学顕微鏡下でシングルリポソーム(人工細胞)の観察を行うことで、微生物増殖のリアルタイムモニタリングに成功した。さらに、微生物封入リポソーム(人工細胞)を用いた応用実験を行うことで、その有用性を示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リポソーム(人工細胞)内での微生物培養という、材料科学分野におけるリポソームのさらなる可能性や、生物学・バイオ産業に貢献できる可能性を示すことができた。また、この成果は、微生物が宿主細胞に共生する「細胞内共生」という真核細胞の起源モデルにボトムアップ的手法によって迫り、新たな人工微生物(生命)の創生など生物学的テーマに貢献できる点で学術・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we present a new microorganism culture systems “artificial cell-based incubators”. The method is the first step toward culturing living cells inside artificial cell-like systems. By encapsulating microorganisms at the single-cell level inside liposomes (artificial cells) and observing the single liposomes (artificial cells) under an optical microscope, we succeeded in real-time monitoring of microbial growth. Furthermore, we succeeded in demonstrating its usefulness by conducting application experiments using liposomes (artificial cells) encapsulating microorganisms.

研究分野：生物学, 生物物理, ソフトマター材料科学

キーワード：リポソーム 人工細胞 人工細胞型インキュベーター 生細胞-人工細胞ハイブリッド 微生物培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

今日の生物(生命)科学・工学からバイオ産業の発展まで、微生物は欠くことのできない材料である。自然界には未だに知らない機能を有する微生物が数多く存在し、その99%は未だに培養することができずにいる。未知微生物の機能・有用物質の発見は、材料科学に限らず、合成生物学・微生物学・生物情報学や薬剤学など微生物を扱う様々な研究分野においても重要である。近年、微細加工技術の進展により、マイクロスケールの空間・ゲル・油中水滴を作製する技術が進展し、内部でシングルセルレベルで微生物の分離・培養・解析が可能となり注目されている。多種多様な微生物の機能解析・獲得に、ゲル・油中水滴だけでなく材料自体の技術的発展が必要である。リポソームは細胞膜の基本構造である脂質二分子膜で形成されたカプセルで、内部に薬剤を封入したドラッグデリバリーシステム(DDS)や、生体分子を封入しリアクタとして活用する人工細胞システムの開発など様々に利用されている。本研究では、このようなリポソームの特徴を活かし、新規の微生物培養器を人工細胞型インキュベーターと名付け、その開発と微生物を解析するための研究ツールとなる可能性について検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) 微生物を封入した均一サイズのリポソーム(人工細胞)をマイクロ流体デバイス技術により作製する技術・方法を開発する。(2) リポソーム(人工細胞)内に微生物をシングルセルレベルで封入し、光学顕微鏡下でシングルリポソーム(人工細胞)の観察を行い、微生物増殖のリアルタイムモニタリングを行う。さらに、(3) 微生物封入リポソーム(人工細胞)を用いた応用実験とアレイ化を試みる。以上から新規微生物培養器(人工細胞インキュベーター)の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 微生物を封入した均一サイズのリポソーム(人工細胞)の作製技術・方法の開発  
以前に開発したリポソーム(人工細胞)作製方法(Morita, *et al.*, *ChemBioChem* 2015)を用いて、微生物が封入された均一サイズかつサイズ制御が可能なりポソーム(人工細胞)の構築を行った。モデル微生物として、大腸菌、枯草菌、緑膿菌、環境(土壌)微生物を検討した。

(2) リポソーム(人工細胞)内微生物増殖のリアルタイムモニタリング方法の開発  
リポソーム(人工細胞)内で、一定温度下で、長時間の微生物の培養を顕微鏡下で行うシステム開発を行った。顕微鏡下でリポソーム(人工細胞)内の微生物をリアルタイムにモニタし、菌体密度を画像解析ソフトから計測した。

(3) 微生物封入リポソーム(人工細胞)を用いた応用実験とアレイ化  
顕微鏡での観察を可能にするために、ガラス基盤上にリポソーム(人工細胞)を固定化することで、アレイ化する方法を構築した。また、リポソーム(人工細胞)内の微生物の薬剤スクリーニングに関する応用研究を行った。

### 4. 研究成果

(1) 微生物を封入した均一サイズのリポソーム(人工細胞)の作製技術・方法の開発  
我々が有しているマイクロデバイスで界面透過法をベースとしたリポソーム(人工細胞)作製方法によって、直径10-30  $\mu\text{m}$ 程度の大きさを有するリポソーム(人工細胞)に微生物を封入することに成功した(Morita\*, *et al.*, *ChemistryOpen* 2018)。また、使用する微生物の細胞数を調整することで、リポソーム(人工細胞)に大腸菌、枯草菌、緑膿菌等の微生物をシングルセルレベルで封入することに成功し、リポソーム(人工細胞)内への微生物の封入数の制御にも成功した(Morita\*, *et al.*, *JoVE* 2019)。しかし、本手法では、作製されるリポソーム(人工細胞)の個数が $10^2$ - $10^3$ 個程度のオーダーでしか作製されず、現在、これを $10^6$ 個程度のオーダーで作製できるデバイス開発を進めている。また、リポソームの脂質の組成などを入れ替えることで物質の選択性を付与したり、様々な生体分子を利用することで、リポソームに人工細胞らしさのエッセンスを取り入れた研究を進めている。

(2) リポソーム(人工細胞)内微生物増殖のリアルタイムモニタリング方法の開発  
作製した微生物封入リポソーム(人工細胞)を、顕微鏡下で、37  $^{\circ}\text{C}$ の培養条件で長時間・物理的に安定な状態で観察するために、観察スライドガラス基板上に脂質膜をコートする手法を考案した。通常ガラス基板上にリポソームを沈降させると、観察開始後24時間で20%程度しかリポソームは残存しないのに対し、脂質膜でコートしたガラス基板上では70%程度残存(3.5倍の向上)することが明らかとなり、本手法の優位性を明らかにした。また、単純に沈降させると熱対流によるブラウン運動により顕微鏡視野からリポソームが消えてしまい、長時間観察が困難であったが、コートした脂質膜上にリポソームを固定化することで何日経過しても観察可能であることを確認した。この手法を用いて、大腸菌の培養を行い、48時間程度の連続観察に成功、リポソーム内で菌体密度の高い状態まで培養することに成功した。リアルタイム観察によりリポソーム内での菌体密度解析をImageJを用いて行い、5時間程度で増殖が平衡に達していることを明らかにし、計70個以上のリポソーム内での微生物増殖度を解析することに成功した(Morita\*, *et al.*, *ChemistryOpen* 2018、特許出願)。さらには、シングルセルからの高密度培養にも成功し、リポソームが微生物増殖のための器として機能することを示した(Morita\*, *et al.*, *JoVE* 2019)。

### (3) 微生物封入リボソーム(人工細胞)を用いた応用実験とアレイ化

微生物封入リボソーム(人工細胞)を用いた応用実験として、一つに薬剤スクリーニング実験を試みた。抗生物質の一つであるアンピシリンを微生物封入リボソーム(人工細胞)外部から添加すると、アンピシリンはリボソーム(人工細胞)膜を自然透過するので、内部の微生物の成長・増殖を阻害する。しかし、内部の微生物がアンピシリン耐性を有している場合、アンピシリンの有無に限らず成長・増殖する様子を捉えることができた。またリボソームに人工的な穴が存在することでも微生物の増殖を仔魚できるデータの取得にも成功し、今後、抗生物質耐性スクリーニングに使えることを示すことができた。また、微生物封入リボソーム(人工細胞)のアレイ化のために、上記成果(2)でも示した、リボソーム(人工細胞)の固定化法と $10^6$ オーダーでのリボソーム(人工細胞)を作製する手法開発の研究を進めている。この他に、大量の微生物の解析を行う系の構築のために、油中水滴内での環境微生物の培養と解析を行った。

### (4) 本研究から派生した成果

本研究で、作製した微生物封入リボソーム(人工細胞)を用いて研究を進める過程で、リボソーム(人工細胞)1ヶ月程度持つものもあれば数時間程度で壊れてしまうものも存在し、その安定性にばらつきが生じていた。この原因を探るために、リボソーム自体の物理的特徴を調べる実験を施した。本手法で作製しているリボソームは、他の方法で作製されるリボソームと比べて膜の表面張力が強いものと弱いものが混在することを明らかにし、この違いが微生物封入リボソーム(人工細胞)の安定性に寄与していると考えた。現在この成果の論文投稿の準備を進めている。また、リボソームを人工細胞にするべく、微生物とコミュニケーションを行うハイブリッドシステムの構築に取り組んでいる。化学コミュニケーション(クオラムセンシング)を行うことができる人工細胞の構築を行い、その内部で微生物を培養するシステムの構築を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yusuke Sato, Masamune Morita, Yuki Suzuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Utilizing soft compartments/interfaces for the creation of artificial biosystems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1007/s12551-020-00647-y">https://doi.org/10.1007/s12551-020-00647-y</a>	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 -
1. 著者名 Masamune Morita, Kaoru Katoh, Naohiro Noda	4. 巻 48
2. 論文標題 Bacterial cell growth dynamics inside giant lipid vesicles for bottom-up synthetic biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. Biophys. J. Biophys.	6. 最初と最後の頁 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Masamune Morita, Kaoru Katoh, Naohiro Noda	4. 巻 7
2. 論文標題 Direct Observation of Bacterial Growth in Giant Unilamellar Vesicles: A Novel Tool for Bacterial Cultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemistryOpen	6. 最初と最後の頁 845-849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/open.201800126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masamune Morita, Yuri Ota, Kaoru Katoh, Naohiro Noda	4. 巻 146:e59555
2. 論文標題 Bacterial Cell Culture at the Single-Cell Level Inside Giant Vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59555	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 -

1. 著者名 Yuri Ota, Kanako Saito, Taeko Takagi, Satoko Matsukura, Masamune Morita, Satoshi Tsuneda, Naohiro Noda	4. 巻 14(4):e0214533
2. 論文標題 Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort) as a highthroughput screening method for environmental bacteria with various growth rates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masamune Morita, Kaoru Katoh, Naohiro Noda
2. 発表標題 Bacterial cell growth dynamics inside giant lipid vesicles for bottom-up synthetic biology
3. 学会等名 12th EBSA and 10th ICBP-IUPAP Biophysics congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masamune Morita, Kaoru Katoh, Naohiro Noda
2. 発表標題 Synthesis of artificial/living cell hybrid biosystems
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田雅宗, 加藤薫, 野田尚宏
2. 発表標題 リボソームを用いたシングルセルレベル培養技術の構築
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤加奈子, 大田悠里, 松倉智子, 高木妙子, 森田雅宗, 常田聡, 野田尚宏
2. 発表標題 Water-in-oilドロップレット内での環境微生物の培養とシングルドロップレットアイソレーション技術の開発
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田悠里, 斉藤加奈子, 松倉智子, 高木妙子, 森田雅宗, 常田聡, 野田尚宏
2. 発表標題 RNase活性を指標とした微生物増殖water-in-oilドロップレットの検出法 “FNAP-sort” の確立
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村山周平, 斉藤加奈子, 大田悠里, 松倉智子, 森田雅宗, 関口勇地, 常田聡, 野田尚宏
2. 発表標題 Water-in-oil ドロップレットを用いた腸内細菌培養手法の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田悠里, 斉藤加奈子, 松倉智子, 高木妙子, 森田雅宗, 常田聡, 野田尚宏
2. 発表標題 W/Oドロップレットを用いた環境微生物培養の基盤技術 “FNAP-sort” の開発
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田雅宗, 加藤薫, 野田尚宏
2. 発表標題 細胞サイズリボソーム(人工細胞)内での微生物培養
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会11.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田雅宗, 加藤薫, 野田尚宏
2. 発表標題 細胞内小器官型人工細胞を指向したジャイアントベシクル内微生物培養法の構築
3. 学会等名 第2回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 微生物を封入したベシクルを用いた微生物の培養方法	発明者 森田雅宗, 野田尚宏, 高木妙子, 大田悠里, 斉藤加奈子	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-195273	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----