

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18993

研究課題名（和文）微小液滴内に格納した微生物のX線誘起遺伝子操作法の開発

研究課題名（英文）Gene Manipulation of Microorganism inside droplets caused by evolution process

研究代表者

石田 忠（Ishida, Tadashi）

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：80517607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：突然変異 自然淘汰 繁殖といった進化の各ステップをマイクロ流路機能として再現し、それらを直列に接続することで、微生物に進化の過程を与え、特定の方向性をもって形質を変化させるためのマイクロ流路技術を開発した。突然変異には変異原として紫外線を用いることが効果的であることを調べた。自然淘汰においては、今回は淘汰圧として熱を選択し、並列したチャンバに対して直列で各チャンバ位置の抵抗が異なるマイクロヒータを設置することで異なる温度のチャンバを実現した。これを用いて一度に複数の温度化において大腸菌の遊走能の違いを調べることができた。繁殖に関しては、淘汰の直前に行うことが望ましいことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のマイクロ流路デバイス開発において、大腸菌に熱耐性を与えるために必要となる進化の要素機能の開発を行った。今回開発した要素機能を接続し、複数回のサイクルを回すことで、大腸菌に熱耐性を与えることが可能となると考える。大腸菌の有機物生産において、発熱に対して有機物生産効率が低下することを防ぐための冷却コストが有機物価格を引き上げる一つの原因となっているため、高温でも有機物生産効率が低下しない大腸菌を作り出すことは重要である。今回、熱耐性を獲得できれば、他のパラメータに対しても進化サイクルを回すことが可能となるため、多岐にわたる選択圧を選ぶことで、様々なパラメータに対する高耐性大腸菌を作り出せる。

研究成果の概要（英文）：We developed microfluidic functions to apply steps of evolution to microorganisms for the resistance against a specific parameter, by mimicking evolution: mutation, selection, and breeding. For the mutation, we select irradiation of ultraviolet light in terms of efficiency. For the selection, we select heat this case to improve the production of organic chemicals. Serially connected resistive microheater is equipped in the parallel microchambers, resulting in the culture conditions at different temperatures. With this microchambers, we achieved to find the threshold temperature of *E. coli* activity at once. For breeding, cell culture should be performed just before the selection function. By assembling these functions, we can achieve a microfluidic device to promote evolution of microorganisms and bring their potential performance against selection pressures.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：温度勾配チャンバ 直列式マイクロヒータ 淘汰

1. 研究開始当初の背景

生物に対し短時間で希望する形質を与える方法として、遺伝子組換え法が挙げられる。しかし、遺伝子組換え法は「自然には発生しなかったであろう個体」を生み出していることから、生態系への影響が懸念される。このため遺伝子組換え体の産業利用(有用物質生産等)は厳しく制限され、事実上不可能である。自然に起こりうるやり方で希望する形質を与える方法として、異種交配(品種改良)や突然変異が挙げられる。しかし、現状では短時間で効率よく希望する形質を持つ「自然にも発生したであろう個体」を作り出すことができない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで培ってきたマイクロ流路技術と細胞培養技術を融合・発展させ、進化論で定義される「突然変異 自然淘汰 繁殖」といった進化ステップをデバイス上で実現する。微生物を微小液滴に格納し、デバイス内で循環させることで、進化のサイクルを回す。これにより微生物に対して、生物の進化プロセスを高速に経験させることによる形質転換法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、進化ステップである突然変異、自然淘汰、繁殖という各ステップをマイクロ流路技術で実現し、それらを接続することにより、生物の進化プロセスの高速化を図る(図1)。そのため、突然変異ステップ、淘汰ステップ、繁殖ステップといった進化デバイスの実現に不可欠な要素技術についてそれぞれ検討する。さらに、これらのステップ間を接続する流路において、微生物の輸送方法についても検討する。

突然変異ステップ: 変異源として考えられるものは、X線、紫外線、薬物(EMS)であり、この中から効率的に突然変異を誘引できる変異源を選定する。

淘汰ステップ: 淘汰圧として扱いやすい温度を対象とする。並列したチャンバに対し、異なる抵抗値をチャンバ範囲に持つ直列抵抗をヒータとして実装し、並列したチャンバにおいて異なる温度を実現する。

繁殖ステップ: 効率的観点から各チャンバ内での大腸菌の培養は、淘汰前に行うこととする。チャンバ内の微生物の培養は過去の研究で条件を求めているため、それを用いる。

各ステップ間の輸送方法: 突然変異、淘汰、繁殖チャンバの間の移動に関して、大腸菌の走化性を用いる方法と流れを用いる方法を検討する。

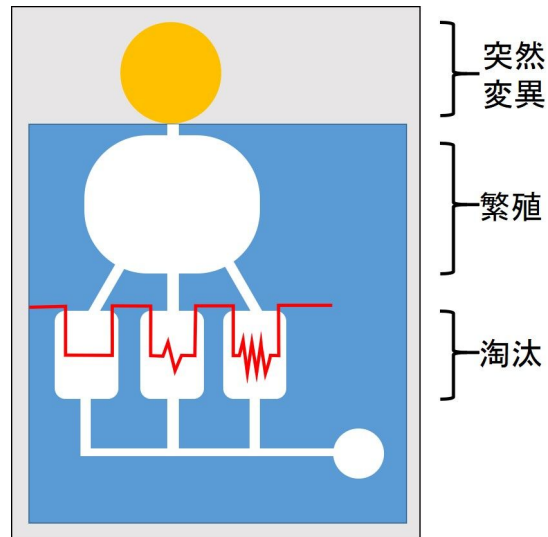


図1 進化のステップを実装したデバイスの概略図。

4. 研究成果

本研究の要素技術として、突然変異、淘汰、各ステップ間の輸送について検討を行った。繁殖については、これまでに培ったマイクロ流路内での培養技術を使えるため、今回は検討しなかった。

突然変異: 変異源として考えられる、X線、紫外線、EMSについて、過去の文献から効率的に変異体を得るための変異源を特定した。その結果、X線は十分な変異体数を得るには生存率が10万分の1と低く、対象外となった。紫外線とEMSは生存率が10分の1から2分の1程度であり、変異体数も同等であった。そこで、扱いが最も容易かつ多くの条件が報告されている紫外線を変異源として用いることにした(図2)。

淘汰: マイクロチャンバ内を均一に加熱するためのマイクロヒータの開

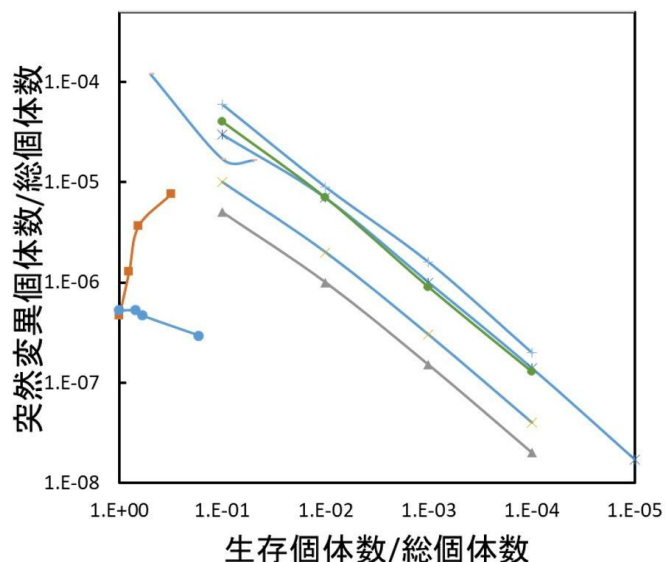


図2 紫外線を用いた大腸菌の突然変異における変異と死亡の割合。

発を行った。マイクロチャンバの中央を横断する直線タイプとチャンバを囲むような矩形タイプを設計・製作し、両者を比較した。中心温度は差がなかったが、面内の均一性において矩形タイプの方が3倍均一温度面積が広がった(図3)。この均一温度面積に合わせてマイクロチャンバを設計し、マイクロチャンバ内の温度を均一にすることに成功した。また、ヒータ近傍にマイクロ温度センサを配置することで、実験中のチャンバ内の温度を計測可能とした。

さらに、この矩形タイプのマイクロヒータを3つ直列に接続し、矩形部の抵抗値を徐々に高くすることで、10度程度温度差を有する並列マイクロチャンバを実現することに成功した。これを用いて、野生株の大腸菌を3つのチャンバに導入して、その遊走速度から活性度を求めた。大腸菌の平均遊走速度が20 $\mu\text{m/s}$ と報告されていることから、遊走速度が20 $\mu\text{m/s}$ 以上の割合を指標とした。このデバイスを用いて48から51の間に活性限界温度があることを見出すことに成功した(図4)。

各ステップ間の輸送: 突然変異ステップにおいて予想以上に死骸が多くなることが分かったため、死骸から生存個体を分離する技術が必要と考えた。そこで、大腸菌の走化性を用いれば、死骸はブラウン運動するのに対し、生存個体は誘引物質に引き寄せられて一方向に移動するはずである。アスパラギン酸を用いて大腸菌の走化性を確認したところ、アスパラギン酸の濃度勾配下において、勾配なしの環境の大腸菌の遊走に比べ、大腸菌の勾配方向への遊走が28倍となった(図5)。このことから、大腸菌の走化性を確認することができた。走化性を確認することは可能であったが、その遊走速度は低かったため、強制的な流れを用いて大腸菌のチャンバ間移動は行うことが好ましいことが分かった。

今後は、これらの各ステップをマイクロ流路で接続し、大腸菌懸濁液滴を輸送する。さらに、各ステップを繰り返す技術を開発し、淘汰圧に対して耐性を有する大腸菌を獲得することを目指す。

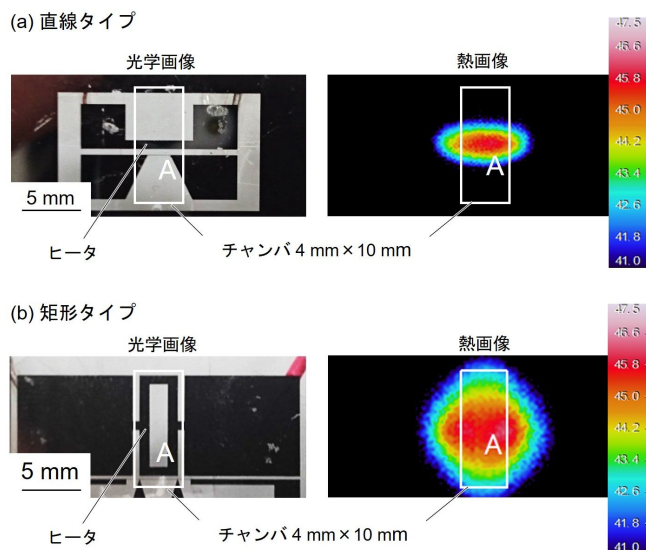


図3 直線タイプと矩形タイプのマイクロヒータを用いた加熱実験における温度分布の違い。(a)矩形タイプ、(b)直線タイプ。

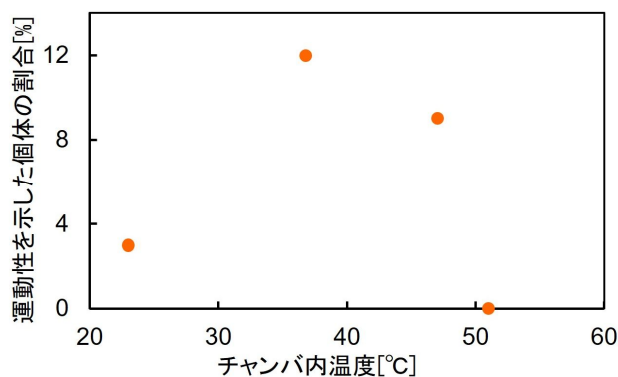


図4 各温度における大腸菌の活性度の比較。大腸菌の平均遊走速度以上の大腸菌は運動性を有すると判断した。

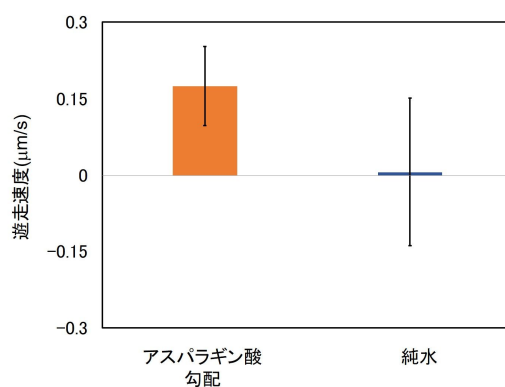


図5 大腸菌の走化性による遊走の比較。左: アスパラギン酸による走化性実験、右: 純水による遊走実験。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大坪 頌平、石田 忠
2. 発表標題 細菌の耐熱試験のための 熱ストレス印加デバイスの開発
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2019
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----