

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01284

研究課題名（和文）難培養細菌の特性移植のためのマイクロ流路システムの開発

研究課題名（英文）Development of microfluidic system for transplantation of characteristics of hardily culturable bacteria

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低ダメージ細胞融合技術と融合細菌での特性発現・強化する技術を開発した。低ダメージ細胞融合技術としては、マイクロメートル間隔の対向電極を用いて、プロトプラスト化した細菌を低電圧パルス波で融合した。発現形質のランダム性を低減するため、プロトプラストサイズのくびれを作製し、単一プロトプラストをチャンバに導入できた。融合細菌の特性発現と強化する技術として、異なる淘汰圧を印加するための直列抵抗ヒータや抗生物質濃度勾配形成流路を実装したチャンバを開発した。液滴を均一分割し、分割した液滴を一つずつ輸送する技術を開発した。それらを統合して、特性発現と強化するための一連の操作を実現することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低ダメージ細胞融合技術は細胞に大きな分子やゲノムを導入できる技術であり、細菌の遺伝子改変技術を飛躍させる可能性がある。その際、これまでの細胞融合は大量の細胞同士で行っており、得られる形質がランダムであったが、異種細胞の細胞数を制御することで、そのランダム性を大幅に低減できる。融合細胞の特性発現と強化の技術は、刺激に合わせて形質発現する可能性を高めるため、ランダムな形質発現のために諦められていた形質を融合細胞に付与できる可能性が出てくる。バイオテックにおいて遺伝子操作は不可欠であり、本研究の成果はそれに対して大きな影響を与える可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：We developed microfluidic devices for cell fusion of bacteria with low damages and for expressing or strengthening characteristics of fused bacteria. As for the cell fusion device, we developed microscaled gap opposing electrodes to reduce the voltage to induce cell fusion, and a single bacterium-sized narrow gap to transport a single bacterium to reduce the randomness of gene expression. As for expressing and strengthening characteristics, we developed techniques to control and apply different stresses of temperature by serially connected heater and concentration of antibacterial drug by gradient generator. For the cyclic operation of expressing and strengthening fused bacterial characteristics, we also achieved equal division of a droplet by a geometrical design, and sequential microfluidic transfer of equally divided droplets.

研究分野：マイクロ流体

キーワード：細胞融合 マイクロギャップ 細菌数制御 一括細胞淘汰 繰り返し

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人類は様々な物質生産を細菌に頼っており、環境から取得した細菌が生産する物質からペニシリンやイベルメクチンなどノーベル賞級の化合物を発見してきた。しかし、現在、活用できている細菌は全体の1%未満といわれ、その潜在能力は計り知れない。細菌の極一部しか活用できない理由は、培養法を確立することが非常に難しく、培養できないためである。難培養細菌の培養法確立なしでその特性を活用するには、難培養細菌の特性を易培養細菌に導入することが考えられる。特性を細菌に導入するには遺伝子操作があるが、難培養細菌の特性を発現する遺伝子を特定することは非常に困難である。そこで、難培養細菌のゲノムを易培養細菌の中で発現させるためには細胞融合がある。難培養細菌を易培養細菌と細胞融合すること自体が困難であり、融合細胞は生存率が低く、特性発現がランダムであるという欠点がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞融合により細菌を掛け合わせることでゲノムスケールの遺伝子組み換えを実現し、難培養細菌の特性を易培養細菌に移植し、難培養細菌の特性を活用することである。

3. 研究の方法

本研究では、難培養細菌の特性移植デバイスで必要となる要素技術として、(A)難培養細菌と易培養細菌との低ダメージ細胞融合技術、(B)融合細菌での特性の発現・強化する技術、(C)それらをつなぐ細菌輸送技術を実施した。

(A) 難培養細菌と易培養細菌との低ダメージ細胞融合技術

細菌同士の細胞融合は、通常の哺乳類細胞と比較して難度が高い。その理由は、(1)細菌には細胞壁が存在しそのままでは融合できない、(2)細菌サイズが一桁小さいことによる融合に必要な電界が高い、(3)融合細胞が発現する形質がランダムであるためである。

(1)リゾチームを枯草菌に反応させ細胞壁を除去し、プロトプラストを形成した。また、難培養細菌のゲノムを細胞融合に用いるために、ゲノムを格納するための細菌サイズリポソーム形成にあたりダブルフォーカス構造のマイクロ流路を開発した。

(2)細菌(直径1 mmのプロトプラスト)の細胞融合に必要な電界は13 kV/mと理論的に決まっているため、印加パルス電圧を低減するため、細菌数個分の電極間隔を有する対向電極を作成し、プロトプラストの融合を行った

(3)プロトプラストが素通りできない大きさのくびれ構造を有するマイクロ流路を作製した。圧力を印加することでくびれに単一プロトプラストを捕捉し、圧力を上昇することでプロトプラストが変形してくびれを通過させた。

(B) 融合細菌での特性の発現・強化する技術

融合細胞において難培養細菌の特性を発現させるためには、(1)特性がないと死滅するストレスを融合細胞に印加し、(2)生き残った融合細胞を培養することで特性を発現させ、(3)それを繰り返すことで特性を強化することが必要である。

(1)特性がないと死滅するストレスとして、今回は熱と抗生物質濃度を試みた。熱に関しては、並列チャンバにジュール熱型のマイクロヒータを実装し、チャンバ内の培養液をチャンバ毎に異なる温度を形成した。その際、チャンバ内の温度分布を均一にするヒーター形状を模索した。抗生物質濃度に関しては、マイクロ流路の合流分岐を繰り返す濃度勾配生成流路とマイクロチャンバを立体的接続して、チャンバ毎に異なる抗生物質濃度を形成した。

(2)マイクロ流路開口付近に、一定量の液滴を形成する技術を開発した。親水性パターンを用いて液滴をマイクロ流路海溝付近に導入し、切り離すことで液滴サイズを調整した。

(3)マイクロ流路を分岐して液滴を均一分割して、並列チャンバに導入し、並列チャンバから液滴を順番に開口付近まで送り返す技術を開発する。マイクロ流路の分岐部分において、液滴の先端形状を幾何的な当分点を配置することで、液滴を均等分割する。並列チャンバから液滴を順番に送り返すために、チャンバと圧力チャンバの接続流路断面の大きさを調整し、液滴ごとに押し出す力を調節した。

(1)-(3)を統合することで、液滴輸送、融合細胞へのストレス印加、培養を繰り返すことを試みる。

(C) 細菌輸送技術

流路内に親水性勾配を形成することで、親水性勾配上を液滴が親水性側に向けて動かした。親水性勾配は親水性表面に三角形の疎水性パターンを形成した。

4. 研究成果

(A) 難培養細菌と易培養細菌との低ダメージ細胞融合技術

(1)リゾチームを枯草菌に反応させ細胞壁を除去し、プロトプラストを形成した。長さ5 mm 幅1

mm の枯草菌が、直径 $1\ \mu\text{m}$ のプロトプラストを得ることができた。また、マイクロ流路技術で開口 $1\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ のダブルフローフォーカス構造を作製し(図1)、オクタノールを油相として用いることで、リポソームを形成した(図2)。しかし、得られたリポソームは直径 $6\ \mu\text{m}$ であり、細胞融合を用いるには大きいものであった。

(2) 細菌(直径 $1\ \mu\text{m}$ のプロトプラスト)の細胞融合における印加パルス電圧を低減するため、電極間隔を $5\ \mu\text{m}$ とし、電界集中を起こすために尖らせた対向電極を作製した。誘電泳動によりプロトプラストを接触させ、パルス電圧を印加して融合した(図3)。電圧 $17.5\ \text{V}$ で細菌の融合が実現し、これまで報告のある電圧に対し $1/5$ 程度に下げることができた。

(3) プロトプラストが素通りできない大きさのくびれ構造を有するマイクロ流路を作製した。くびれ開口は $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ であった。くびれを介して圧力差 $35\ \text{kPa}$ を印加した際に、くびれに1個のプロトプラストを捕捉できた。吸引圧力を上げて圧力差 $40\ \text{kPa}$ に到達したところで、プロトプラストが変形してくびれを通過させることができた(図4)。くびれ通過後のプロトプラストは15時間培養環境に置いたところ、細胞壁が再生した。両側にくびれを配置したチャンバにおいて、両側のくびれからそれぞれ1個のプロトプラストを導入することができた。

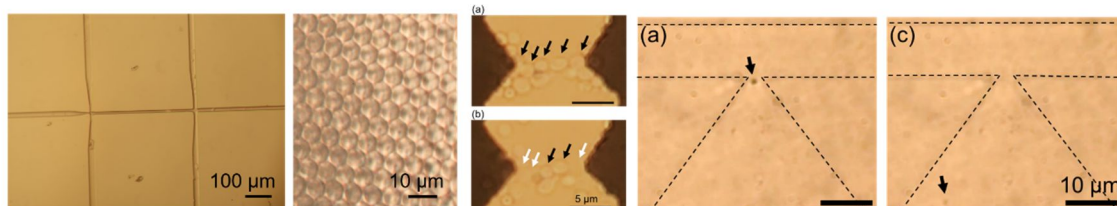


図1 ダブルフローフォーカス流路

図2 リポソーム

図3 細胞融合

図4 単一プロトプラスト導入

(B) 融合細菌での特性の発現・強化する技術

(1) 熱に関しては、並列チャンバにジュール熱型のマイクロヒータを実装した(図5)。配線幅 $800\ \mu\text{m}$ 、 $400\ \mu\text{m}$ 、 $270\ \mu\text{m}$ のヒータを直列に接続して、 $14\ \text{mA}$ の電流を流すことで、チャンバ温度を 52 、 56 、 63 にした。その中で大腸菌を培養したところ、活性率がそれぞれ 56% 、 21% 、 0% になった。大腸菌に一括して異なるストレスを与えることに成功した。さらにチャンバ内温度の均一度を上げるために、矩形ヒータから蛇行ヒータに形状を変えることで、 60% から 83% に向上した。抗生物質濃度については、マイクロ流路の分岐・合流1回行い、 $4.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ と $0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗生物質名の液を流路内で調整し、立体的にチャンバに導入した。この際、空圧バルブで開閉するタイミングを調整することで、チャンバ内に $24 \pm 1.4\ \text{nL}$ の液滴を形成した。

(2) 扇型の親水性パターンに水を導入すると、表面張力により扇型の中心部が決壊する。決壊した先に接続流路を通じて水を導入・吸引し、 $6 \times 10^7\ \mu\text{m}^3$ の水滴を再現性良く形成した(図6)。

(3) マイクロ流路の分岐部分において、 60 度で3つの流路に分岐する。 120 度に拡大部においてメニスカスは円弧上に広がる為、 60 度の角度のところに分岐構造を配置したところ、分割液滴の体積のばらつきが 6% 以下におさまった。一方、並列チャンバから液滴を順番に送り返すために、チャンバと圧力チャンバの接続流路断面の大きさを 25000 、 1250 、 $750\ \mu\text{m}^2$ とし、圧力チャンバ内の空気を徐々に圧縮していくと、断面積 $25000\ \mu\text{m}^2$ のチャンバの液滴から順に開口部に輸送された(図7)。

(1)-(3)を統合した。 $144\ \text{nL}$ の水滴を流路内で切り出し、均等分割し、流路内で抗生物質濃度の異なる液滴を融合し、順番に開口付近に輸送した。開口付近に輸送した液滴の中から特定の液滴のみを回収し、他の液滴は廃棄することにも成功した。

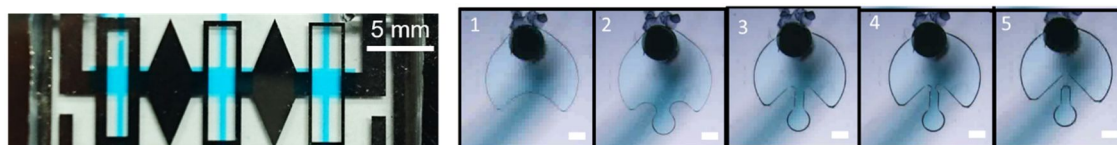


図5 温度勾配産連直列ヒータ

図6 親水性パターンによる液滴形成

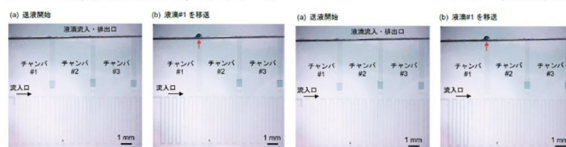


図7 液滴順次輸送技術

(C) 細菌輸送技術

二等辺三角形のフロロサーフ製の疎水性パターンを用いて SiO_2 表面に形成し、接触角勾配が $15^\circ/\text{mm}$ となった。 $300\ \text{nL}$ の水滴を滴下したところ、 $3.8\ \text{mm}/\text{s}$ で水滴が親水性側に移動した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木内翠, 石田忠
2. 発表標題 枯草菌の電氣的細胞融合の条件探索に向けた並列マイクロ対向電極の開発
3. 学会等名 CHEMINAS46
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木志雲, 石田忠
2. 発表標題 層間マイクロ貫通孔を通じた一定量液滴形成技術の開発
3. 学会等名 CHEMINAS46
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木内翠, 石田忠
2. 発表標題 マイクロ電極間の誘電泳動を用いた枯草菌プロトプラスト対の形成と電氣的細胞融合技術の開発
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木志雲, 石田忠
2. 発表標題 マイクロ流路の立体配置のための層間マイクロ貫通孔の開発
3. 学会等名 CHEMINAS45
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川田 斐斗, 石浦 史也, 石田 忠.
2. 発表標題 2 面開放型 Open microfluidics における水滴の濃縮, 蒸発防止, 混合機能の開発
3. 学会等名 第 38 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 聡、石田 忠
2. 発表標題 熱干渉抑制用貫通溝を用いた異温度均一並列マイクロチャンパの開発
3. 学会等名 電気学会バイオ・マイクロシステム研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 Microfluidic device for multiscale biology
3. 学会等名 Fall 2023 Seminar Series, Mechanical & Aerospace Engineering, Samueli School of Engineering, UCLA (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田 忠
2. 発表標題 細菌の高効率指向性進化のためのマイクロ流路技術の開発
3. 学会等名 令和5年 電気学会全国大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

小俣石田研究室HP
<http://www.bmm.mech.e.titech.ac.jp/>

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	金子 真也 (Kaneko Shinya) (10399694)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	

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
---------	---------