

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510139

研究課題名(和文) 難培養微生物用新規バルブレス一菌体分離・ゲノム増幅マイクロ流体チップの開発

研究課題名(英文) Development of a valveless microfluidic chip for single cell isolation and whole genome amplification of yet-cultured microbes

研究代表者

青木 弘良 (AOKI, Hiroyoshi)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号：50518636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の難培養微生物の解析のため、目視下での微生物単離技術を開発した。
 (1)目視分離のため、電気泳動や静水圧ポンプによる低流速フローフォーカシングを用いたマイクロ流路を開発した。これらポンプは、流路内で分離された微生物を目視確認できるように、従来の1/10以下の流速で送液できた。
 (2)さらに微生物の混入を防ぐため、単一微生物をアガロースに包埋して分離した。乾燥により、大腸菌、レーザー吸収剤、およびPVAを含むアガロースゲルをフィルム化後、レーザーマイクロダイセクションにより、一菌体を含むアガロース片を切り出し、単離した。単離された微生物はフィルム内で、染色体DNAを酵素増幅できた。

研究成果の概要(英文)：To analyze yet-cultured microbes (YCM) in the environment, device and technique were studied to manually isolate single cell.

(1) For manually isolation, a slow-flow focusing microchannel was developed using electrophoresis and hydrostatic pressure pumps. The pumps reduced the flow rates at less than 1/10 of conventional pump, enabling operator to recognize flowing cells.
 (2) To prevent contamination, single microbe was isolated by embedding in agarose. An agarose film was prepared from a gel containing E. coli, laser absorbent, and hydrophilic polymer (PVA) by drying. From the agarose film, a small piece (approx. 100 x 100 x 20 um) containing single cell was dissected by laser microdissection. After the piece was swelled in buffer by dissolving PVA, the E. coli genomic DNA was specifically amplified in the swelled agarose by Phi 29 DNA polymerase. Thus, the developed device and technology will provide unique tools for symbiotic genomics of specific environment-colonized YUM.

研究分野：複合新領域

キーワード：難培養微生物 アガロースフィルム 一菌体分離 全ゲノム増幅 レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

環境中に存在する微生物は、その99%以上が人為的に培養困難な、**難培養微生物 (Yet-Uncultured Microbe, YUM)**である。そのため自然界の大多数を占めるこれら微生物の機能や生態については、未知であった。

しかし近年環境試料より全ゲノム DNA を酵素増幅し(Whole Genome Amplification, WGA), 次世代シーケンサー(NGS)を用いて、微生物叢をゲノム情報から解析するメタゲノミクス研究により、様々な知見が得られるようになった。しかしこれらは集団のゲノム情報であり、シロアリ腸内に存在する原核生物共生細菌、実験動物感染症、および慢性炎症における緑膿菌によるバイオフィーム形成など、特異的な環境下における微生物間あるいは微生物-宿主細胞間相互作用など、個々の微生物に着目した一菌体レベルのゲノム解析研究は困難であった。

近年MEMS技術を用いた、一菌体分離・ゲノム増幅デバイスが報告された(Marcy Y, PLoS Genet, 2007)。これは微細なマイクロ流路内で自動的に微生物を単離するデバイスである。さらに本装置は微小空間内での酵素増幅により、従来の課題だった、増幅バイアスを抑制できた。しかし本装置は複雑な構造をもち、多段階の作製工程や、高い表面積に伴う、他の微生物やゲノム DNA の混入のリスクがあった。そのため簡便な構造で、コンタミを防止しつつ YUM を一菌体分離し、微小空間内で WGA を行う、デバイスや技術が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、環境中の YUM を一菌体レベルで解析するために、簡便な構造で YUM を単離し、微小空間内で酵素増幅を行うデバイスおよび技術の確立を図った。

最初に微細なナノファイバー(NF)フィルタを組み込んだ、マイクロ流体チップを研究した (Fig. 1)。本デバイスは、下記工程により、マイクロ流路内での一菌体分離と WGA 反応を行なう：

- (a) シース流を用いたフローフォーカシングによる微生物の分離。
- (b) 目的微生物の目視確認後、バルブ操作による NF 上への微生物の補足。
- (c) アルカリ、中和、WGA 試薬の送液による、ゲノム DNA の酵素増幅。

NF 上での WGA により、複数のバルブや反応槽による、流路の複雑化の回避が期待できる。そこで最初に送液系を開発した後、分離用 NF フィルタを研究した。

また YUM の解析では、実験環境中の微生物や DNA のコンタミネーション防止が重要である。これまでコンタミ防止に、アガロースビーズ内で培養した微生物を、蛍光セルソ

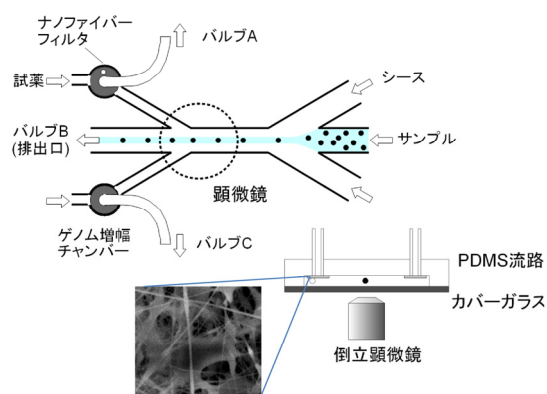


Fig. 1 ナノファイバーを用いたバルブレス一菌体分離・ゲノム増幅マイクロ流体チップ構想図

ーター(FACS)で分離し、アガロース溶解後 WGA によりゲノム解析した例が報告された(Dichosa AE, Nat. Protocol, 2014)。しかしこの場合局在性などの位置情報が失われる課題があった。

今回の目的では、目的環境中に局在する数-10菌体程度の微生物の、確実な分離回収を行なう。そこで微生物試料を包埋するアガロースゲルを乾燥させ、強度を向上させた透明なアガロースフィルムを作製し、一菌体を含むフィルム片をレーザーマイクロダイセクション(LMD)で、非接触的に分離する技術の確立を図った。さらにフィルムを再膨潤させたアガロースゲル内での WGA も試みた。

3. 研究の方法

(1)NF を用いたバルブレス一菌体分離・ゲノム増幅マイクロ流体チップの開発

①マイクロ流路内における、目視下での微生物単離のための、低速フローフォーカシング送液系の確立

最初に三分岐構造をもつ、射出成形シリコン製マイクロ流路 (26 × 76 × 1 mm, 流路断面 50 × 50 μm) をスライドガラスに貼り合わせた後、シリンジポンプを接続し、蛍光倒立顕微鏡(Leica, DMIRE2)上に設置した。流路内に、蛍光ビーズ(Sigma, φ 1 μm)を送液して動画を撮影し、動画よりマイクロ流路内での蛍光ビーズの流速を求めた。さらに水平に設置したマイクロ流路において、電気泳動(排出口: +, 注入口: -, 6V)および静水圧(注入口: 50 μL, 排出口: 0 μL)での流速を同様に測定した。測定データの可視化には、ImageJ (NIH) と同 Color FootPrint マクロ (<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hiratsuka/index.php/>)を使用した。

②分離用 NF フィルタの作製

エレクトロスプレーデポジション(ESD)法を用いて、ポリビニルブチラール(PVB, 66 kDa, 積水化学)から分離用 NF の作製を試みた。2.5% PVB-EtOH を、ESD 装置(フェー

エンス)で静電噴霧してNFを作製した後、金をスパッタし、走査電子顕微鏡(SEM, Keyence, VE-7800)で繊維径と孔径を測定した。同様に濾紙上にNFをESDし、水滴を滴下した際の安定性について調べた。

(2) LMDによるアガロースフィルムからの一菌体分離と、フィルム内ゲノムDNAのWGA

①アガロースフィルムへの、レーザー吸収剤添加によるLMDの改善

0–50 mM 2-Hydroxy-4-methoxybenzo-phenone-5-sulfonic acid (HMBS, TCI)–5% Sea Plaque GTG アガロース(Lonza)–Milli-Q 65 μ Lをパラフィルム上に滴下後、パラフィルムを重層して室温、終夜ゲル化した(約 ϕ 18 mm)。これを真空乾燥によりフィルム化した後、LMD装置(Leica, ASLMD)による切断性を調べた。

②アガロースフィルムからの一菌体分離と、フィルム内ゲノムDNAのWGA

pUC19を導入した *E. coli* DH5 α を、LB/amp 2 mLで終夜培養し、PBSで3回洗浄した。0.1M リン酸バッファ (pH 8.5)–5% NaCl–0.5 mM EDTA 400 μ Lに再懸濁後、*E. coli* 200 μ Lに、終濃度 20 μ M Calcein-AM (Life Technologies)を添加し、37 $^{\circ}$ C、1 h 生細胞染色した。

次にPETフィルム上に、シリコーンスペーサー(0.5 mm 厚)とカバーガラス(18 mm 角)を設置して、型を作製した。これに10,000倍希釈染色 *E. coli*–10 mM HMBS–8 mM NaOH (pH 7)–2% アガロース 50 μ Lを流し込み、室温、1 h ゲル化した。ゲルは、カバーガラスとスペーサーを外した後、約60 $^{\circ}$ Cに加熱しながら、約10 min 真空乾燥し、フィルム化した。

スライドガラス上に中央部に穴(5-mm 角)を設けた0.5 mm 厚シリコーンシートと、アガロースフィルムを設置し、*E. coli* 一菌体を含むアガロース片(約30–50 μ m 角)をLMDで切出し、スライドガラス上に落下させて回収し、観察した。

次に *E. coli* を添加した10 mM HMBS–8 mM NaOH–2% アガロース–1/10 TE 120 μ Lを型に流し込み、ゲル化後、37 $^{\circ}$ C、15 h 乾燥して、フィルム化した。フィルムの透明部分より、一菌体を含むアガロース片をLMDにより切出し、ポリエチレンナフタレートフィルム(帝人デュポン)上に回収した。フィルム片は、滅菌水 20 μ Lで、4 $^{\circ}$ C、1 h 脱塩後、REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen)の付属試薬を用いて、アルカリ溶菌、中和を行った後、 ϕ 29 DNAポリメラーゼによる、WGAを行った。アルカリおよび中和試薬への浸漬時間は1 h、WGAは30 $^{\circ}$ C、終夜反応した。反応後、滅菌水で3回洗浄し、増幅DNAを1,000倍希釈SYBR Green I(Life

Technologies)で4 $^{\circ}$ C、1 h 染色後、Olympus IX71 蛍光倒立顕微鏡にて観察した。

③SEMによるアガロースフィルムとゲルの孔径測定

(2)②と同様に、型に2% アガロース–1/10 TE 120 μ Lを流し込んでゲルを作製し、ゲルを37 $^{\circ}$ C、5 h 乾燥させフィルム化した。これらのアガロースフィルムとゲルは、順次30%、50%、70%、90% EtOH–Milli-Q、および99.5% EtOHに室温、1 h 以上、1回(99.5% EtOHは3回)ずつ浸漬し、エタノール置換した。次に順次30%、50%、70%、90% *t*-BuOH–EtOH、および100% *t*-BuOHに同様に1回ずつ(100% *t*-BuOHは3回)置換した。アガロースフィルムとゲルは、*t*-BuOH 1 mLに浸漬した後、–20 $^{\circ}$ C、1 h 凍結し、2 h 真空乾燥した。これら試料上にオスミウムを2.5 nm コーティングした後、SEM(JEOL, JSM-6330F)にて観察し、アガロース繊維により形成される孔径を、ImageJにて測定した。

④収縮保護剤のスクリーニング

(2)②と同様に作製した2% アガロース–1/10 TE ゲルを、保護剤を添加した、50 mM HMBS–37 mM NaOH–1/10 TE 2 mLに、4 $^{\circ}$ C、終夜浸漬した。保護剤には、40% トレハロース(Wako)、40% PEG 6,000(Wako)、5% アルギン酸Na(Sigma, 15–20 cP)、10% ポリビニルアルコール 500(PVA, Wako)、20% ポリビニルピロリドン K-25(PVP, Wako)、あるいは非添加条件(コントロール)を用いた。ゲルは、Milli-Qで3回洗浄後、シリコーンシート上に移し、37 $^{\circ}$ C、8 h 乾燥によりフィルム化した。アルギン酸の場合は、洗浄後、0.5 M CaCl₂に浸漬させてアルギン酸をゲル化し、さらにMilli-Qで軽く洗浄してから、同様に乾燥させた。

コントロール、PVA、PVP–アガロースフィルムは、LMDにより約100 μ m 角を切り出した後、顕微鏡で側面の厚みを測定し、Milli-QあるいはTEに浸漬して、10 min 膨潤後、同様に側面の厚みを測定した。

⑤膨潤アガロースゲル内でのWGA

(2)②および④と同様に作製した、*E. coli* 添加アガロースフィルムおよびPVA–アガロースフィルムより、LMDにより一菌体を含む、約100 μ m 角の切片を切り出した。これらは(2)②と同様にゲノムDNAのWGAを行い、増幅DNAを検出した。

4. 研究成果

(1)①最初シリンジポンプによる送液を試みたところ、マイクロ流路は孔径が小さいため配管抵抗が高く、シリンジ送液圧が配管抵抗を上回った時に高速に送液され(約3,000 μ m/s 以上)、目視での蛍光ビーズの識別は困

難だった。またポンプ停止後も残圧でしばらく送液が続き、圧力が低下すると、送液と停止を繰り返し、不安定だった。

そこで一定の低速で送液するために、電気泳動(Fig. 2)と、静水圧による送液を試みたところ、それぞれ $238 \pm 31 \mu\text{m/s}$, $308 \pm 67 \mu\text{m/s}$ と、シリンジポンプの約 1/10 の、目視識別可能な流速で送液できた。

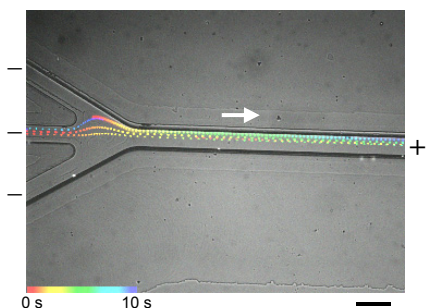


Fig. 2 電気泳動による低速フローフォーカシング

10 s 間における蛍光ビーズの軌跡をカラー表示。
矢印：送液方向。Bar: 100 μm .

②DNA 分離用に、PVB を用いた NF フィルタを検討した。PVB は非蛍光性のため、フィルタ上 DNA の蛍光観察を阻害せず、DNA 精製時のエタノール洗浄で容易に除去できる。

そこで PVB を ESD したところ、繊維径 $78.7 \pm 19.9 \text{ nm}$ 、孔径約 300 nm の NF 多孔膜が得られた (Fig. 3)。しかし微細なため物理強度が低く、液滴を滴下し攪拌すると NF 膜の破損が見られた。

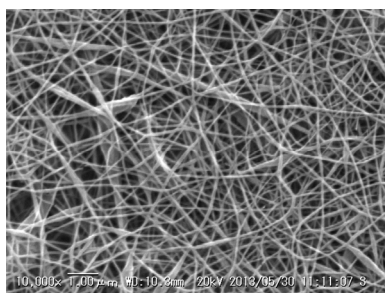


Fig. 3 PVB ナノファイバーフィルタ

一般に DNA 0.5–1.5 kb 以上を分離する限外濾過膜(MWCO 100K)は、約 30–90 nm の孔径をもつ (www.pall.com)。PVB NF 膜は数 μm 径の菌体保持は可能であるが、数 10 kb 以下のゲノム DNA 断片は、透過する可能性がある。そのため DNA 分離には、NF 間架橋による孔径の縮小や、より繊維径が大きく、高強度のフィルターによる NF の挟み込みによる保護、が必要である。

(2)①繊維間架橋と多層化による、DNA 分離用 NF フィルタの作製は、フィルタの厚みの増大を伴うため、微細な流路への組み込みが困難になる恐れがある。また実験環境中のコンタミネーションを防ぐため、アガロースフ

ィルム内への微生物の包埋と、LMD による切断方法も検討した。

微生物を包埋したアガロースフィルム of 切断には、UV レーザーを用いた市販の LMD 装置を使用した。アガロースは UV 透過性が高く、そのままではレーザー照射による切断 (アブレーション) は困難である。そこで水溶性 UV 吸収剤である HMBS をアガロースに添加して、加工性を検討した。その結果 10 mM 以上の添加により、アガロースフィルムを切断できた。

またゲルにレーザーを照射した場合、レーザーによって溶解したアガロースが冷却とともに再度ゲル化するため、切断は困難である。しかしアガロースフィルムの場合、レーザー照射によって生じるアガロース微粉末は互いに付着しないため、切断できた。

②アガロースフィルム内に包埋した *E. coli* をモデル微生物とし、実際に一菌体を含むアガロースフィルム片の切出しを試みた。その結果、簡便に一菌体を含むアガロース片を切出し、スライドガラス上に回収できた (Fig. 4)。しかし単離した菌体を WGA したところ、DNA は増幅されなかった (Fig. 5)。

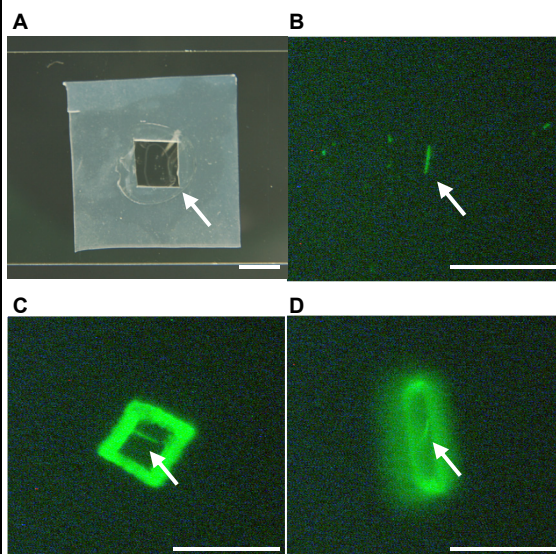


Fig. 4 一菌体を含むアガロースフィルム片の、LMD による単離

- スライドガラス上に、シリコンシートを介して設置したアガロースフィルム。LMD で切断したアガロース片は、下のスライドガラス上に落下、回収。
- アガロースフィルム内 *E. coli* の蛍光画像。
- LMD で単離した、一菌体を含むアガロースフィルム片 (約 30 μm 角 \times 12 μm 厚) の上面蛍光画像。
- 別の一菌体アガロースフィルム片 (約 50 μm 角 \times 12 μm 厚) の側面蛍光画像。

矢印：アガロースフィルム (A) および *E. coli* (B–D)。

Bars: 5 mm (A) and 50 μm (B–D)。

③増幅しない原因を探るため、アガロースフィルムとゲルの孔径を SEM で測定した。アガロースゲルは約 $95.3 \pm 39.5 \text{ nm}$ の多孔性を示すのに対し、アガロースフィルムは乾燥によりアガロース繊維が互いに密着し、約 6.2

±2.5 nm の孔径を示した (Fig. 5). この密着性により, 高い透明性を示す一方, フィルム内での酵素増幅は困難であると考えられた.

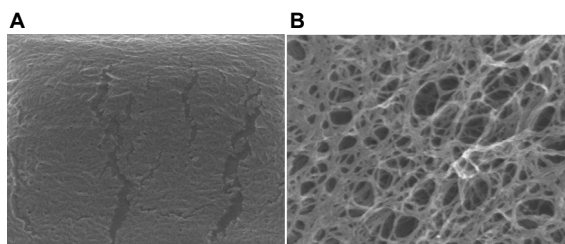


Fig. 5 アガロースフィルムおよびゲルの SEM 画像
A. アガロースフィルム. B. アガロースゲル. Bar: 500 nm.

④切り出したアガロースフィルムは, 水溶液中でほとんど膨潤しないため, 密着したアガロース繊維間に水素結合が形成され, 膨潤が阻害されたためと考えられた. そこで乾燥に伴う繊維間の水素結合を防ぐため, ゲルを親水性ポリマーに浸漬してから, 乾燥し, フィルム化した.

その結果, PVA, PVP への浸漬により, コントロールに比べ均一にアガロースゲルが乾燥した. また膨潤後の厚みは, コントロール $23 \pm 5 \mu\text{m}$ に比べ, PVA-, および PVP-アガロースフィルムは, それぞれ $219 \pm 7 \mu\text{m}$, および $200 \pm 13 \mu\text{m}$ と, 大幅に膨潤し, アガロース繊維間の孔径拡大が示唆された.

⑤単離した *E. coli* の膨潤ゲル内でのゲノム DNA の WGA を行った結果, 特異的で局所的なゲノム DNA の増幅が見られた (Fig. 5). ただしアガロース密度が高く, 微量しか増幅されなかったため, 今後ゲル濃度や PVA 濃度の最適化により, 膨潤後のアガロース孔径を更に拡大し, 増幅 DNA 量の増大を図る必要がある.

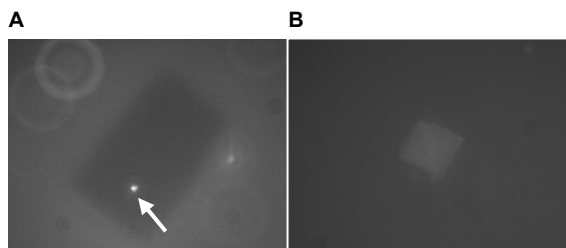


Fig. 6 再膨潤アガロースゲル内の WGA
A. WGA 後の, PVA 添加再膨潤アガロースゲル片の側面蛍光画像. 矢印: 増幅 DNA. B. 同様に WGA 後の, PVA 非添加アガロースフィルム片の下面蛍光画像. Bar: 50 μm .

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yutaka Yamagata, Hiroyoshi Aoki, “Development toward Single-cell Genome Analysis Device”, “Biology of Symbiosis” Kickoff Mini Symposium, Yokohama, RIKEN, May 14, 2014.
- ② 青木弘良, 山形豊 「難培養微生物の一菌体分離とゲノム解析のための, アガロースフィルムのレーザー加工の検討」 光量子工学研究領域シンポジウム (仙台情報・産業プラザ 5 階多目的ホール (アエル), 宮城県仙台市, 2014 年 11 月 25 日 - 11 月 25 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 組成物、その利用、及び当該組成物を製造するためのキット

発明者: 青木 弘良, 山形 豊

権利者: 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-98621

出願年月日: 平成 27 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 弘良 (AOKI, Hiroyoshi)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号: 5 0 5 1 8 6 3 6

(2) 研究分担者

池 郁生 (IKE, Fumio)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号: 4 0 1 8 3 1 5 7

新谷 政己 (SHINTANI, Masaki)

静岡大学・工学 (系) 研究科 (研究院)・准教授

研究者番号: 2 0 5 7 2 6 4 7