

ながみね くにあき

氏名 長 峯 邦 明
 授与学位 博士 (学術)
 学位記番号 学術 (環) 博第 70 号
 学位授与年月日 平成 19 年 3 月 27 日
 学位授与の根拠法規 学位規則第 4 条第 1 項
 研究科, 専攻の名称 東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 環境科学専攻
 学位論文題目 単一微生物の遺伝子機能評価へ向けた電気化学マイクロデバイスの開発に関する研究
 指導教員 東北大学教授 末永 智一
 論文審査委員 主査 東北大学教授 末永 智一 東北大学教授 彼谷 邦光
 東北大学教授 中山 亨
 (工学研究科)

論文内容要旨

【第一章 序論】 本研究では、単一微生物の遺伝子機能の網羅的評価を目的とした電気化学マイクロデバイスの開発を行った。本デバイスは、寒天培養法に依存した環境中からの微生物の単離および機能評価の迅速・簡便化に有効である。単一微生物機能分析技術の向上は、これまで培養困難あるいは希少とされてきた微生物の機能解析を促進し、医薬、食品などへ応用可能な新たな生体材料の発見を可能にすると期待できる。以下、第二章および第三章では、微生物の遺伝子機能の電気化学的評価法を確立し、第四書から第六章では、単一微生物の遺伝子機能評価に向けたマイクロデバイスの開発を実施した。

【第二章 呼吸活性を指標とした微生物の代謝活性の電気化学的評価】 第二章では、呼吸活性を指標とした微生物の代謝系遺伝子発現の電気化学的評価法を確立した。

Figure 1(A)に微生物の異化反応経路の概略図を示す。一連の異化反応経路は多数の酵素より構成されており、還元型メディエータ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ を最終電子受容体とした基質の酸化反応を進行させる。 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の生成速度は基質異化反応全体の速度、および異化代謝酵素群の発現レベルを反映する。そこで細胞の生成した $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ を細胞外の電極上で酸化し、微生物の異化代謝系遺伝子群の発現レベルを電流応答として評価した。測定対象微生物には脱窒菌を用い、グ

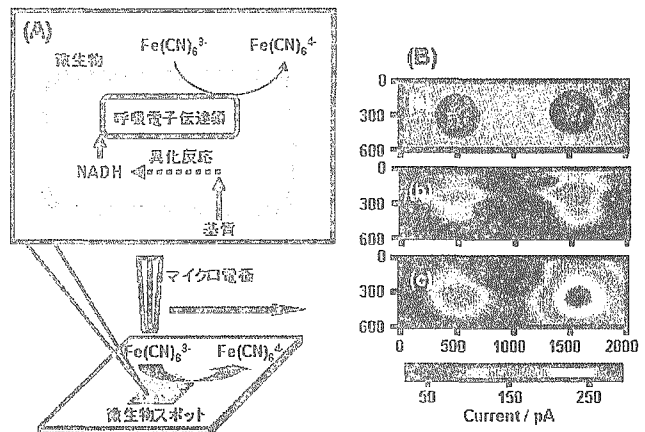


Figure 1. (A)微生物の異化反応経路の概略図。(B)グルコース代謝遺伝子群発現(右スポット)、非発現(左スポット)脱窒菌アレイの顕微鏡写真(a), および20 mM D-グルコース添加前(b), 後(c)の $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 濃度分布のSECMイメージ

ルコース代謝能の誘導的発現を評価した。脱窒菌はガラス基板上のマイクロウエルアレイに固定化し、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いた網羅的遺伝子機能評価を実施した。Figure 1(B)に、グルコース代謝遺伝子群非発現、および発現脱窒菌アレイに対する 20 mM グルコース添加前後の $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 濃度分布の SECM イメージを示す。グルコース添加に伴いグルコース代謝遺伝子群発現脱窒菌スポット近

傍において酸化電流の増加が計測された。これより電流応答がグルコース代謝系遺伝子群の発現レベルを反映していることが示唆された。

メディエータの還元反応は細胞膜に存在する呼吸鎖において進行するため、メディエータの細胞表層構造透過性は電流応答に大きく反映される。グラム陰性菌の脱窒菌と細胞表層構造の異なるグラム陽性菌、黄色ブドウ球菌を対象とした場合、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 酸化電流応答がほとんど計測されなかった。細胞壁を除去したプロトプラストにおける $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 酸化電流応答を計測した結果、黄色ブドウ球菌では細胞膜が $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ の透過障壁となっていることが示された。対象微生物の細胞表層構造を考慮し、適切なメディエータ、あるいは測定環境を選択することで、本測定法は様々な微生物の代謝系遺伝子機能評価へ応用可能と考える。

【第三章 レポーター遺伝子を利用した微生物の遺伝子機能の電気化学的評価】 第三章では、 β -galactosidase(β -Gal)をレポーターとした(1)遺伝子の転写レベルでの制御、(2)翻訳後のタンパク質の発現状態、および(3)タンパク質間相互作用の電気化学的評価を行い、外部環境に応じた微生物の表現型制御を遺伝子、タンパク質レベルで評価した。また微生物培養システムおよび電気化学計測システムを1チップに集積化し、培養過程における遺伝子機能の動的挙動を経時的に計測した。

(1) 変異原に対する SOS 応答プロモーター活性化の電気化学計測：SOS 応答性 *umu* プロモーター下流に *lacZ* 遺伝子が挿入された組換えサルモネラ菌を対象に、変異原存在下における *umu* プロモーターの活性化を、 β -Gal 発現誘導を指標に評価した。 β -Gal 活性は、基質 *p*-aminophenyl- β -D-galactopyranoside(PAPG)の加水分解反応により生成する *p*-aminophenol(PAP)を電極上で酸化することで、酸化電流応答として計測した(Figure 2(A)). PAP 酸化電流応答は変異原の種類および濃度依存的に変化したことから、*umu* プロモーターの活性化を電気化学的に評価可能であることが示された。また集積化チップを用い、変異原暴露環境下で培養した組換えサルモネラ菌における PAP 酸化電流の経時計測を行った結果、変異原暴露 20 分後に *umu* プロモーターが活性化されることが示された。この応答速度は過去の文献とほぼ一致しく、本測定系の妥当性が示された。

(2) 組換えタンパク質発現状態の電気化学的モニタリング：目的タンパク質に融合した β -Gal 活性は、宿主大腸菌内の目的タンパク質の可溶性発現分量を反映する(Figure 2(A)). モデルタンパク質として、可溶性として発現しやすい maltose binding protein (MBP)を用いた。また MBP のアミノ酸残基を置換することで不溶性発現を誘導し、野生型との発現状態の比較を行った。Figure 2(B)に、western blotting により確認した野生型および変異型 MBP 発現画分を示す。変異型 MBP は、ほぼ全て不溶性発現していることが確認された。Figure 2(C)に β -Gal 活性の SECM イメージを示す。野生型 MBP 発現大腸菌では β -Gal 活性が計測されたのに対し、変異型 MBP 発現大腸菌ではほとんど電流応答が得られなかった。以上より β -Gal 活性が組換えタンパク質の発現状態を反映することが示された。集積化チップを用いた培養過程にお

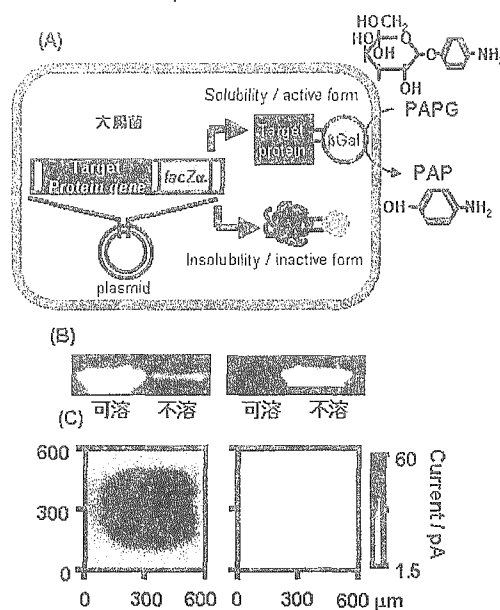


Figure 2. (A)組換えタンパク質発現状態評価法の概略図。(B)Western blotting により確認した野生型および変異型MBP発現画分。(C) β -Gal活性のSECMイメージ。

る MBP 発現状態のリアルタイムモニタリングを達成し、タンパク質の折り畳み過程の動的挙動の評価に成功した。

(3) 酵母 Two-hybrid 法を利用したタンパク質間相互作用の電気化学的評価：女性ホルモン 17β -estradiol 依存的な核内ホルモン受容体 α (HR α)–転写制御タンパク質間相互作用を、酵母 Two-hybrid 法を利用して評価した。 17β -estradiol の HR α への結合を引き金とした両タンパク質間の相互作用により、 β -Gal の発現が誘導される。 β -Gal 活性は、SECM を用い PAP の酸化電流応答として計測した。 17β -estradiol 濃度依存的な電流応答の増加が計測され、タンパク質間相互作用の電気化学的評価が可能であることが示された。

【第四章 マイクロウエルアレイを用いた単一微生物の遺伝子機能評価】 第四章では、数細胞を捕捉可能なサイズのマイクロウエルアレイを構築し、単一微生物のアレイ化、および β -Gal 発現評価を実施した。Figure 3(A)にマイクロウエルアレイを用いた単一微生物のアレイ化法および β -Gal 活性計測法を示す。

アレイ基板上に β -Gal の蛍光基質 Fluorescein-di- β -D-galactopyranoside (FDG)を含む微生物懸濁液を滴下し、平板 PDMS で挟み込むことで単一微生物をウェル内に捕捉した。FDG の加水分解生成物、Fluorescein はウェル内に蓄積するため、その蛍光強度から微生物の β -Gal 活性を評価した。Figure 3(B,C)に、第三章(3)で使用した β -gal 発現酵母をパターンしたマイクロウエルアレイの光学および蛍光顕微鏡写真を示す。各ウェル下方の数字は捕捉酵母数を表し、数細胞から十数細胞が捕捉されていることが確認された。各ウェルの形状を反映した蛍光が観測され、マイクロウエルアレイを用いた酵母の β -Gal 活性の網羅的評価が可能であることが示された。また単一酵母が捕捉されたウェル(四角点線)においても十分な蛍光が観測され、本デバイスの単一微生物遺伝子機能評価への有効性が示された。

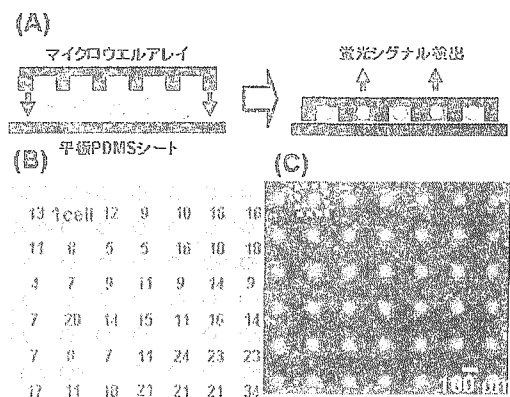


Figure 3. (A)マイクロウエルアレイを用いた単一微生物アレイ化および β -Gal 発現評価法。 β -Gal 発現酵母をパターンしたマイクロウエルアレイの光学(B)、および蛍光顕微鏡写真(C)。

【第五章 マイクロウエルアレイ・微小流路デバイスを用いた微生物への遺伝子導入および遺伝子機能評価】 第五章では、微生物の遺伝子組換え操作のデバイス化を目的とし、シリコンウェルおよび Poly(dimethylsiloxane)(PDMS)微小流路チャネルより構成される三次元空間を利用した大腸菌への遺伝子導入法を考案した。シリコンウェルに固定化されたプラスミド DNA に対し、PDMS 流路を用いてコラーゲンタイプ I、CaCl₂、大腸菌コンピテントセルの混合溶液を暴露することで遺伝子導入を行った(Figure 4(A))。

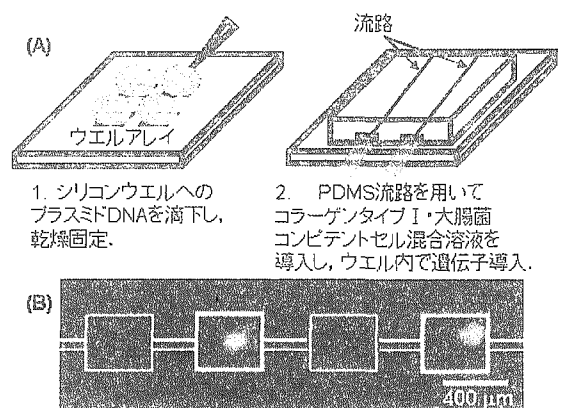


Figure 4. (A)遺伝子導入デバイス操作の概略図。(B)GFP発現プラスミドDNAを導入した組換え大腸菌アレイの蛍光顕微鏡写真。

遺伝子導入の確認は、プラスミド DNA にコードされたタンパク質の活性を検出することで行った。Figure 4(B)に、GFP 発現プラスミド DNA を導入した組換え大腸菌アレイの蛍光顕微鏡写真を示す。白

線で示した DNA 固定化ウエルにおいて蛍光イメージが観測されたことから、本デバイスを用いた大腸菌への遺伝子導入が可能であることが示された。また、ウエル内での遺伝子導入細胞数は、固定化 DNA 量に依存することを確認した。Figure 4(B)での固定化 DNA 量は、約 1 細胞への遺伝子導入が達成される条件であり、単一コロニーを示唆する蛍光イメージが確認された。以上より本デバイスを用いた単一組換え微生物アレイ構築への可能性が示唆された。

【第六章 電気化学微小流路デバイスを用いた単一微生物機能評価】 第六章では、微生物集団から

の単一細胞の分離・アレイ化、および電気化学的遺伝子機能評価を目的とした電気化学微小流路デバイスを開発した。測定対象には、第三章(3)で使用した組換え酵母を用い、 β -Gal 活性の流路内電気化学計測を実現した。Figure 5(a)に流路チャンネルの顕微鏡写真を示す。流路チャンネルは、細胞輸送用メインチャンネル、および電気化学計測を行う分析チャンバーから構成されている。チャンバー内に 2 つのマイクロ作用電極 (E1, E2)、メインチャンネルに電気泳動用グラウンド電極を配置した。流路チャンネル内の単一酵母の分離操作には、電気泳動力を利用した。細胞表面の負電荷と、正あるいは負電位を印加したチャンバー内作用電極 E1 間の静電相互作用により、単一酵母の分析チャンバーへの捕捉および開放を実現した(Figure 5(b-d))。Figure 6(A)に、分析チャンバーに捕捉した 5 細胞の β -Gal 発現酵母の PAP 酸化電流応答を示す。酵母を捕捉したチャンバーへ 7.4 mM PAPG 溶液を導入直後(a)、および 30 分後(b)に電流応答を計測し、30 分間の反応によりチャンバー内に蓄積した PAP を検出した。 β -Gal 発現酵母存在下、30 分の反応により PAP 酸化電流が増加した(A)。5 細胞をチャンバー外に解放し、再度 30 分間の反応前後の PAP 酸化電流応答を計測したところ、電流応答の増加が計測されなかった(C)。また β -Gal 非発現酵母 7 細胞を対象とした場合も同様に酸化電流の増加は計測されなかった(D)。以上より酸化電流の増加が酵母の β -Gal 活性を反映していることが示唆された。また、2 細胞の β -Gal 発現酵母に対しても有意な酸化電流の増加が計測され、本デバイスを用いた酵母の β -Gal 活性の高感度計測が達成された。

【第七章 総括】

本研究では、呼吸活性および β -Gal 活性を指標とした微生物の電気化学的遺伝子機能評価法を確立した。また、遺伝子操作、単一細胞操作、および電気化学計測システムを集積化したマイクロデバイスを開発し、単一微生物遺伝子機能評価への可能性を示した。本デバイスは、単一微生物機能解析の基盤技術となり得る。

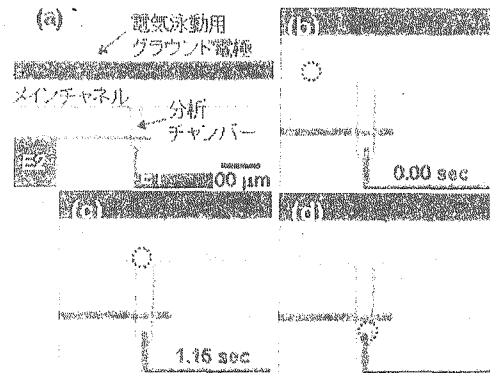


Figure 5 (a) 流路チャンネルの顕微鏡写真。(b-d)電気泳動による単一酵母の分析チャンバーへの捕捉。

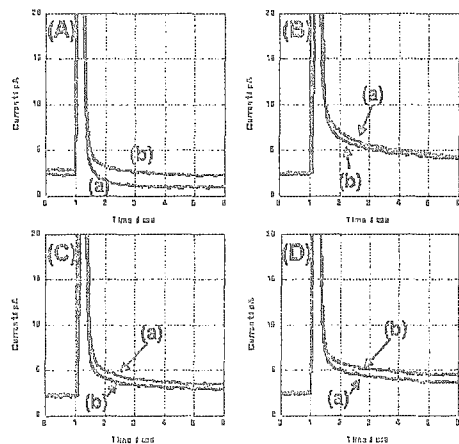


Figure 6 5 cells の β -Gal発現酵母の捕捉時(A)、およびそれらのチャンバー外への解放後(B)における、チャンバーへのPAPG導入直後(a)、30分後(b)のPAP酸化電流応答。7 cellsの β -Gal非発現酵母(C)、2 cellsの β -Gal発現酵母(D)に対するPAP酸化電流応答。

論文審査結果の要旨

第一章は序論であり、本論文の目的と意義について述べた。単一微生物の機能評価を行う目的を、微生物スクリーニング、クローン化微生物個体群の表現型の不均一性評価、および単一微生物センサーの構築について、それぞれ詳細に記載した。また、単一微生物機能評価に対する集積化マイクロデバイスの有効性、およびその結果得られる波及効果について記載した。

第二章では、メディエータを用いた電気化学的呼吸活性計測を利用し、微生物の基質異化代謝能、および代謝反応に関わる遺伝子発現制御の評価法を確立した。測定対象となる微生物スポットを基板上にアレイ化し、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) による網羅的代謝機能評価を実現した。

第三章では、レポータータンパク質 β -galactosidase を利用した遺伝子の転写レベルでの制御、翻訳後のタンパク質のフォールディング、およびタンパク質間相互作用の電気化学的評価法を確立した。また、微生物培養システム、および電気化学計測システムを1チップ上に一体化することで、培養過程における遺伝子機能の動的挙動の経時的モニタリングを達成した。

第四章では、単一微生物を分離・アレイ化したマイクロウエルアレイを構築した。ウエル内での単一微生物の培養、および遺伝子発現誘導を実現し、さらには単一微生物の発現した β -galactosidase 活性の高感度蛍光計測に成功した。これより、本デバイスの単一微生物遺伝子機能評価への有効性が示された。

第五章では、大腸菌への遺伝子導入を達成するマイクロウエル・微小流路融合デバイスを開発した。種々遺伝子を導入した組換え大腸菌アレイを構築し、SECM、および蛍光観測による網羅的遺伝子機能評価を実現した。本デバイスは大腸菌のみならず、様々な細胞種への遺伝子導入を可能にし、ゲノムスケールで遺伝子機能を解明するための基盤技術となり得ると考える。

第六章では、微生物集団の分離・アレイ化、および単一微生物遺伝子機能の網羅的電気化学計測を連続的に実行する電気化学微小流路デバイスを開発した。単一微生物操作には電気泳動力を利用し、電位制御による任意の位置への単一細胞誘導を達成した。また、数細胞の酵母を対象とした β -galactosidase 活性の高感度電気化学計測に成功し、単一微生物の網羅的遺伝子機能評価への可能性を示した。

第七章は総括であり、論文の第2章から第6章までを要約して示した。

以上、要するに、本論文は、単一微生物の遺伝子機能の電気化学的評価法の確立と、それら分析操作のマイクロデバイス化を実現したものであり、これらの一連の新規基盤技術は、環境生命化学、及びバイオセンサー工学の進展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（学術）の学位論文として合格と認める。