

研究報告書

「バクテリア再構成法の開発」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 田端 和仁

1. 研究のねらい

本研究はマイクロデバイス中でバクテリアを再構成する技術開発を行う。

バクテリアを自由に再構成できるようになれば、バクテリアと言う生命システムが、個々の細胞機能を統合し、どのように生物と呼べる状態を作り上げているかを理解できるかもしれない。そこで私は、マイクロデバイス中でバクテリアを再構成する方法を開発する。バクテリアを再構成するにあたり、バクテリアそのものを一度破壊し、その破砕液を用いてバクテリアを再生させることを試みる。この方法だと、直前まで生きていたバクテリアの構成成分が全て残っているという利点がある。しかしながら、この破砕液をリポソームなどに閉じこめたとしても、そこからバクテリアが再生することはない。この原因として、細胞質タンパク質濃度の低下と細胞膜状態の喪失という 2 つの状態変化が原因ではないかと考えた。そこで、これら 2 つの状態を保ちつつ、バクテリアを破砕する方法を考案した。すなわち、バクテリアの中身を微小な容器の中に放出させ、その容器内でゲノムなどの分子と混合し、再び脂質二重膜(細胞膜)に覆われた状態の細胞を生み出す方法である。そこで、その容器をマイクロ加工によって作成する。その形状は、マイクロ流路内に設置された数マイクロメートルの大きさの容器で、脂質二重膜によってフタができるようになっている。この脂質二重膜にバクテリアプロトプラストを融合させ、バクテリアの細胞質成分を容器内へ放出させる。また、同時にバクテリア膜成分も脂質二重膜に導入される。こうすると、バクテリアの構成成分すべてが容器内に保持されることになる。この状態で、容器内の酵素活性や、ATP の生産レベル、脂質二重膜を介した物質取り込み活性を指標にして、容器内での生命活動がどの程度安定であるかを調べる。さらに、GFP を発現するプラスミドと一緒に容器内に閉じ込め、容器内での遺伝子発現についても検討する。また、容器や流路の形状についても検討を行う。ここでできあがったチャンバーとバクテリアプロトプラストの融合物(Hybrid cell)はバクテリアの構成成分をすべて内包している。つまり、細胞の条件をすべて備えたチャンバーである。このチャンバーが培養によって、分裂し増殖するかを確認する。

2. 研究成果

(1)概要

研究の結果、微小チャンバーアレイに脂質二重膜を作成する方法の開発に成功した(ALBiC)。さらに、大腸菌のプロトプラストと、ALBiC の融合にも成功した。また、この状態で培養を継続すると融合細胞が成長して体積を増加させ、分裂するような現象も確認できた。このことから、微小チャンバー内でのバクテリアの再成が可能であることを強く示唆している。また、チャンバー内にあらかじめ β -galactosidase をコードしたプラスミドを導入し、大腸菌を融合させたところ、プラスミドからのタンパク質発現が確認できた。また、その酵素活性から合成された酵素分子の数を見積もったところ、数十分子の酵素が合成されていることが分かった。こ

これらの結果は、バクテリアがマイクロデバイスと融合しているという状態においても、生合成活性を維持できることを示している。

(2) 詳細

① バクテリア再構成のためのデバイス開発(達成)(増額あり)

デバイスの形状や材質に関して検討を行った。デバイス上面を覆うフッ素樹脂の材質に関して、検討を行ったところ、488nm の励起光で自家蛍光が発生することが分かった。そのため、本樹脂の開発企業と自家蛍光に関して検討を行ったところ、樹脂に含まれるシラノール基が原因であることが分かった。そのため、それを含まないフッ素樹脂に変えたところ、自家蛍光が大幅に減少し、解析をより精度高く行うことができるようになった。一方、デバイスの形状に関しては、直径 5 μm 以下のチャンバーで、直径が安定しないという問題点があった。これは、フォトマスクにパターンされた円形が光の干渉パターンを生むため、パターンの大きさより大きく露光され、形状が安定しないことが原因であった。そこで、露光機に水銀用の g 線フィルターを導入し、露光時間 7 秒で直径 3 μm や 4 μm のデバイスを安定して作成できるようになった。また、微小容器に脂質二重膜でフタをする方法の開発に取り組んだ。微小容器上に脂質二重膜を作成する方法は、従来より知られている張り合わせ法を転用し、微小容器デバイス上を buffer、脂質を溶かした溶媒、培地の順に流すことで作成した。この作成された脂質膜でフタをされた微小容器を ALBiC (Arrayed Lipid Bilayer Chamber) と名付けた(図 1)。さらに、本チャンバーの脂質膜が膜タンパク質を再構成して機能するかを確認した。具体的には、 α -ヘモライシンを ALBiC 上に再構成し、ポア形成がおきればチャンバー内部の蛍光色素が漏出して蛍光強度の減少が生じる。その結果、全てのチャンバーにおいて蛍光強度の減少が確認できたため、ALBiC の脂質二重膜は膜タンパク質を再構成して機能を発揮できることが分かった。(論文 1 参照)

② 融合のためのバクテリア調製と ALBiC との融合(達成)

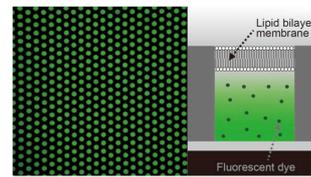


図 1 ALBiC 概略

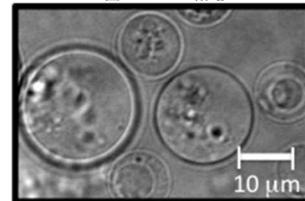


図 2 巨大化大腸菌

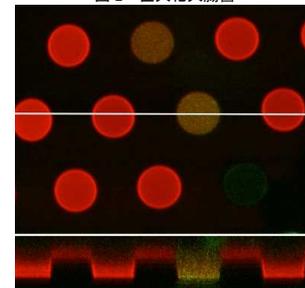


図 3 ALBiC と巨大化大腸菌の融合
巨大化大腸菌は GFP を発現しており、ALBiC 中には、蛍光色素(赤)を封入している。下段の図は上段の白線部分での Z 軸セクション。融合によって、緑と赤が混ざり、黄色に変化している。

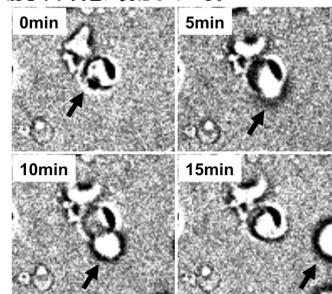


図 4 融合したチャンバーからのリボソーム様細胞の出芽
矢印部分が出芽してくるリボソーム様細胞。

ALBiC に融合させる大腸菌の調製を行った。大腸菌は、グラムネガティブ細菌であるため、ALBiC の脂質二重膜と融合させるためには、外膜とペプチドグリカン層を取り除く必要がある。また、ALBiC の容量も 20fL と大腸菌 1 匹の容量 (0.6fL) と比較しても 40 倍程度大きく、大腸菌細胞質のタンパク質濃度低下が起きてしまう。そこで、細胞壁合成阻害剤(アンピシリン)存在下で大腸菌を培養し、巨大化させることで、この問題を解決することとした。リゾチーム処理により、細胞壁を取り除いた大腸菌をアンピシリン存在下で培養すると、容易に直径 10 μ m 程度に巨大化する(図 2)。一方この巨大化大腸菌は通常の大腸菌と同様に分裂・増殖が可能か分からない。そこでこの巨大化大腸菌が元の大腸菌に戻れるのかを顕微鏡下で、観察を行い検証を行った。すると、球形の巨大が大腸菌から角状の菌が生えて大腸菌のような桿菌に戻ることが分かった。さらにこの菌を回収し、プレート上でコロニー形成を行ったところ、コロニーを観察することができた。このことから、巨大化大腸菌は元の大腸菌に戻り分裂増殖ができる生きたシステムであることが分かった。次に ALBiC と巨大化大腸菌を融合させる実験を行った。図 3 は実際の実験の顕微鏡画像である。巨大化大腸菌は、GFP を発現させているため、緑色の蛍光を発している。また、ALBiC 内部には、赤色の蛍光色素を導入している。このため、融合が生じると、その 2 色がマージされ黄色に見える。黄色に見える容器が見られることや、Z 方向の断面図でも容器内に 2 色が均一に分布していることから、ALBiC と巨大化大腸菌の融合が生じていることが分かる。

③融合細胞からの再生と分裂(ほぼ達成)

大腸菌と融合した ALBiC(融合細胞)の観察を継続すると、多くはないが図 4 に示すような、容器から飛び出して分裂するような現象が見られた。これは、融合細胞が大腸菌へ再生することを強く示唆している。

④融合細胞の状態計測(ほぼ達成)

融合細胞のタンパク質合成を GFP の蛍光強度を指標にして計測し、ATP のような化合物を ALBiC 内にあらかじめ導入することや、初期タンパク質濃度が高いほど、よりタンパク質合成能が高くなることを見いだした(図 5)。また、融合細胞内の ATP 濃度状態やタンパク質濃度(論文 2)、膜電位などを計測するシステムの立ち上げに取り組み、ATP 濃度状態や膜電位の計測はほぼ可能となった。

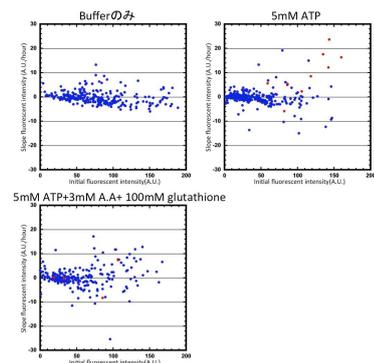


図 5 ALBiC 内の buffer 条件変化による、GFP 合成速度分布の変化

横軸は融合直後のチャンパー蛍光強度、縦軸は蛍光強度変化の傾き。各点は融合したチャンパー1つに対応する。ATP の添加によって、GFP 合成速度が増加するチャンパーが増える。

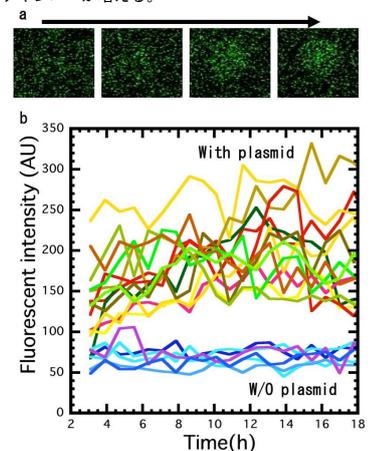


図 6 ALBiC 内に閉じこめた DNA からの GFP 発現
a: ALBiC 蛍光画像。時間とともに蛍光が増加する。b: 各チャンパーの蛍光強度変化。プラスミドを入れたもののみ融合後に蛍光強度が上昇する。

⑤ALBiC 内への遺伝子導入(延長課題)(ほぼ達成)

ALBiC 内にあらかじめ GFP をコードするプラスミドを導入し、融合細胞化すると、プラスミドからの GFP 発現が起こることを見いだした。(図 6)。また、 β galactosidase をコードしたプラスミドにおいても同様の実験を行ったところ、その発現が確認された。また、融合細胞内で合成された酵素分子数を見積もったところ、平均で 25 分子の酵素が合成されていることが分かった。本酵素は 4 量体のタンパク質であるためモノマー換算では 100 分子が合成されたことになる。これ以外にも、プラスチックビーズ(300nm)を融合させることに成功している。今後は、ゲノムレベルの大型 DNA の導入を行うが、現在では 200kb のプラスミド調整に成功しており、今後どの導入実験に取り組む予定である。

3. 今後の展開

本研究により、人工物であるマイクロチャンバーから、バクテリアを再生できる可能性があることを示すことができた。このことは、マイクロチャンバー内にあらかじめ物を仕込んでおけばそれをバクテリア内に取り込ませることが可能であるということを示唆している。実際に、プラスミド DNA を閉じこめておけばそこからタンパク質を発現させることができることも示している。そうすると、バクテリアのゲノム DNA をチャンバー内に導入することで、元々持っていたゲノムと交換することができるゲノム入れ替え法への発展が期待される。そのためには、現在再生頻度が極端に低いため、これを向上させるための改善が必要となる。また、融合細胞内の状態をモニターして再生頻度との相関を調べる必要があると考えられる。さらには再生してきたバクテリアを解析し、コロニー形成能やゲノムシーケンスを行う必要もある。このように、バクテリアを再構成すると言う全く成功するかどうか分からない状態から可能性があることを示すことができた。よって、今後もさらなる研究を行う必要がある。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本課題は、大挑戦型として実施された。研究テーマとしても、誰もが不可能であると考えたバクテリアの再構成を掲げ、萌芽的要素を強く含んだ大挑戦らしいテーマであったと考える。また、本提案が成功すれば、教科書に載るような研究になるばかりでなく、望みの機能を持ったバクテリアを自在に創る研究への発展が見込まれ、世界の産業構造を大きく書き換える研究の基礎となることが期待される。延長期間を含め、6 年度にわたる研究において、デバイスの開発からバクテリアの再生までの研究に取り組み、おおむね当初の目的は達成できたと考えている。しかしながら、未だバクテリア再生に関わる論文発表には至っておらず、早急に論文発表を行う必要がある。また、研究開発開始後、デバイス開発に関わる内容にて、研究費の増額を受けた。これにより、現在利用している形のデバイス開発に成功したが、その過程において、デバイス材料開発企業との協力関係構築にも成功し、現在においてもその関係は継続されている。研究費の増額によって、研究の進展のみならず産業界との結びつきができたことが非常に助かっている。これらデバイスを利用してバクテリアの再生に道筋を付けることが

できた。この結果によって、研究期間の延長と増額が認められた。延長期間においては融合細胞内への巨大分子導入法の開発に取り組み、通常ではバクテリア内に入れることができない 300nmのビーズの導入や、プラスミド DNA を導入してそこからのタンパク質発現にも成功した。これは、今後行うゲノム DNA 導入につながる成果である。現在でも引き続き研究を行っており、導入するゲノムの調整やどのように導入するかの研究を進めている。このように、全く何もなかったところから 6 年度の間にバクテリアの再生ができる可能性を示すことができた。これは新しい研究分野の創成に関わる成果であると考え、大挑戦らしい研究成果であるとする。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

バクテリア再構成のためのデバイス開発に取り組み、微小容器に脂質二重膜でフタをする独自の技術を開発した。さらに、この微小容器を用いて、巨大化大腸菌の融合に成功していることは評価できる。合成生物学のゴードンリサーチ会議において、本成果の発表を行っている。今後は、脂質二重膜については、脂質の組成と膜の安定性、また、ATP 合成酵素など活性の関係を調べる、巨大化大腸菌の融合のメカニズムの解明など、現象の背景となる原理への展開も望まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, **K.V. Tabata**, L. Yamauchi, S.H. Kim, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Suga, H. Noji., Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow Single Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity. *Nature Communications*. 2014 Jul 24;5:4519.
2. Yaginuma H, Kawai S, **Tabata KV**, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Noji H, Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci Rep*. 2014 Oct 6;4:6522.
3. Muraoka T, Endo T, **Tabata KV**, Noji H, Nagatoishi S, Tsumoto K, Li R, Kinbara K. Reversible ion transportation switch by a ligand-gated synthetic supramolecular ion channel. *J Am Chem Soc*. 2014 Nov 5;136(44):15584-95
4. Watanabe R, **Tabata KV**, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H. Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force. *Nat Commun*. 2013;4:1631

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発明者: 田端 和仁、野地 博行
発明の名称: チャンバー細胞生成方法
出願人: 国立大学法人東京大学
出願日: 2013/10/21



出願番号：特願 2013-218556

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演と海外発表

1. 2013 IEEE 26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) 20-24 Jan. 2013. H. Wakioka, S. Yamamoto, K.V. Tabata and M. Sugiyama, Attoliter order droplet formation using nanochannels and enzyme reaction inside a droplet.
2. EBEC2014・ポルトガル(リスボン), 2014年7月, Kazuito V. Tabata, Direct observation of CWD bacteria reproduction
3. Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis ・ケニヤ(ナイロビ), 2014年9月9日, Kazuito V. Tabata, ANALYSIS OF A SINGLE CELL FUSED MICRODEVICE (招待講演)
4. 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, San Antonio, Texas, USA, October 26-30, 2014, Kazuito V. Tabata, PREPARATION AND ANALYSIS OF BACTERIA HYBRID CHAMBER CELLS
5. Emergence in Chemical Systems 4.0, University of Alaska Anchorage, June 22-27, 2015, Kazuito V. Tabata, HYBRID CELL ~SINGLE CELL BACTERIUM FUSED MICRODEVICE~
6. Gordon research conferences Synthetic Biology, Sunday River, Newry, ME, June 28 - July 3, 2015, Kazuito V. Tabata, Reconstitution of a cell in femto litter sized microchamber array.
7. EBEC2016・(第19回)・イタリア・Riva del Garda, 2016年7月2日~7日, Kazuito V. Tabata, Reconstitution of a cell in femto litter sized microchamber array.

一般科学誌掲載

1. Newton 別冊 やさしく分かる生命の科学 ニュートンプレス, 2014年7月, 田端和仁, 無生物の部品をくみ上げて、生きた細胞は作れるか?