

微細加工技術を用いたべん毛モーターのダイナミズム解析の研究

戸倉 紘

指導教員 鷺津正夫教授

1. はじめに

サルモネラ菌などのバクテリアは菌体表面にあるべん毛と呼ばれる太さ 20nm 程度の器官をスクリューのように回転させて泳動している[1]。サルモネラ菌はグラム陰性バクテリアの一種でその細胞膜は外側から外膜、ペプチドグリカン層、内膜の 3 種類からなる。細胞膜の中で環境の浸透圧の変化に耐える構造がペプチドグリカン層である。べん毛はこの細胞膜に埋め込まれているべん毛モーターによって駆動されている。べん毛モーターは式 (1) で与えられる細胞膜内外の pH 差と電位差によって決まるプロトンポテンシャル $\Delta\psi$ を運動エネルギーに変換する分子機械であり、生物界でも数少ない回転機構である[2]。しかしながら、その回転メカニズムはまだ明らかになっていない。

$$\Delta\psi = \Delta\phi + \frac{k_B T}{e} \ln \left[\frac{[H^+]_{out}}{[H^+]_{in}} \right] \quad (1)$$

ただし、 $\Delta\phi$: 電位差, k_B : ボルツマン定数, T : 温度, e : 電荷素量,
[H⁺] : 水素イオン濃度, in, out はそれぞれ細胞の内と外を表す

べん毛モーターの回転メカニズム解明にはその特性を計測することが有効である。しかし、菌体そのものが直径約 1/2 μm , 長さ約 2 μm と小さいことから特性測定のための実験が容易ではない。

これまでに、プロトンポテンシャルの値とべん毛モーターの回転速度の関係を明らかにするために数多くの実験がなされてきた。マイクロピペットにバクテリアを吸引固定してパルス電圧を印加し、べん毛をレーザー暗視野顕微鏡で観察することで印加電圧と回転数との関係を調べた実験や細胞外溶液の pH を変化させてべん毛モーターの回転速度やトルクの変化を調べた実験などが報告されている。しかしながら、これらの実験法では細胞膜間の電位差や細胞内の pH を正確に制御できないため、正確なプロトンポテンシャルを得られておらずべん毛モーターの回転特性を議論するデータとして十分とは言い難い。

細胞膜内外の電位差や pH を独立にリアルタイムで制御したり、細胞内外に薬剤を自由に供給したりできればべん毛モーターの定常および過渡特性が測定でき、そのメカニズムの解明に貢献することが期待される。このような背景から、細胞膜内外に電圧を印加し、べん毛モーターの特性測定を行うためのマイクロデバイスの開発を行った。

2. べん毛モーターの特性解析

2.1 特性解析の原理

バクテリアのべん毛モーターのプロトンポテンシャルと回転の関係を明らかにするためには、バクテリアのべん毛が観察できる状態

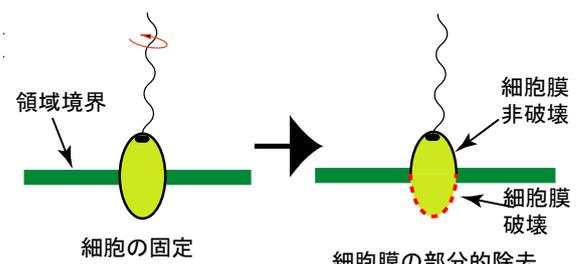


Fig.1 Schematic of bacterial motor analysis

で、細胞膜内外に電圧印加や溶液置換ができることが必要である。本研究では、Fig.1のように細菌の菌体を領域境界である絶縁物の薄膜に作製した微細オリフィスに固定する。その後、菌体の細胞膜のうち薄膜下にある部分を浸透圧ショックにより破壊する。具体的には菌体を EDTA の入った細胞膜内よりも低浸透圧な溶液に懸濁する。EDTA を外膜に作用させることで外膜を物質が透過できるようになる。次にペプチドグリカン層を除去する酵素リゾチーム（卵白由来，和光純薬）を作用させることでペプチドグリカン層が溶解し、残りの細胞膜も浸透圧ショックにより破壊される。細胞膜の破壊によって細胞膜内側の環境を制御可能になる。この状態でプロトンポテンシャルを変化させれば、そのときのべん毛の回転速度を計測することができ、プロトンポテンシャルとべん毛モーターの回転速度の関係が明らかにすることができる。

上記の要求を達成するため、領域境界の役割を果たす絶縁物の薄膜であるオリフィスプレートは、微細オリフィスをもつ。その直径は約 $1\mu\text{m}$ とし、細菌は通ることが出来るが、電界や溶液が領域境界から漏れ出すのを防ぐために細菌固定後は隙間を小さくする必要がある。またそのままでは、細菌は微細オリフィスを通過して領域境界を越えてしまうのでストッパーの役割をする構造が必要となる。

細菌の菌体の長さは約 $2\mu\text{m}$ なのでそのままでは、微細オリフィスに細菌を固定し、細胞膜を部分的に破壊するためにはオリフィスプレートを非常に薄くする必要がある。そのような薄膜を得ることは困難であるので、細胞の分裂を阻害する抗生物質 cephalexin (ICN Biomedicals, inc) を用いることで伸長化を行い、 $20\mu\text{m}$ 以上に伸長化した多核の細菌を得ることで数 μm の薄膜をオリフィスプレートとして使用できるようにしている。

2.2 SiO₂ 薄膜を用いた従来のオリフィスプレート

本研究室では過去に宮本がシリコンの支持構造をもつ厚さ $1.5\mu\text{m}$ の SiO₂ 薄膜を異方性エッチングにより作製し、フェムト秒レーザーでこの SiO₂ 薄膜をアブレーションすることにより直径約 $1\mu\text{m}$ の微細オリフィスを作製した。べん毛の可視化のために蛍光色素 Alexa Fluor 532 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen) を用いていた。ストッパーとして SiO₂ 薄膜に親水性ポリテトラフルオロエチレン製のメンブレンフィルタ (JAWP01300, MILLIPORE) を接着し、さらに微細オリフィスにレーザー照射することで接着剤（フォトレジスト）をアブレーションするとともにメンブレンフィルタを数 μm 掘り込んだ。蛍光観察の際に妨害となる可能性のある接着剤やメンブレンフィルタの自家蛍光を遮断するために SiO₂ 薄膜と接着剤の間にアルミニウムを蒸着している。

このように作製したオリフィスプレートをチャンバーと組み合わせシリンジポンプで吸引することで、伸長化した細菌の一部がメンブレンフィルタに入り込んだ状態で固定することに成功した。また、リゾチームにより細胞膜を部分的に破壊し電圧を印加する

ことで、プロトンポテンシャルに連動したべん毛モーターの回転の on, off を観察している。この方法では作製時の 2 度のレーザー照射の位置が合わなければ接着剤が除去されない、蛍光防止のアルミニウムが除去されてしまいべん毛の蛍光観察が困難になるという問題があった。

3. オリフィス付フィルタの作製

3.1 従来方法の問題点と改良

従来の方法ではレーザー照射位置を合わせるのが困難でありデバイス作製時の歩留まりが悪く、実験結果の再現が出来ないでいた。1 個のデバイスが複数の微細オリフィスを持つことが出来ればバクテリアを固定できる可能性が高まるが、この歩留まりの悪さから複数の微細オリフィスを作製することが困難であった。

本研究では SiO₂ 薄膜を用いたデバイスの持つこれらの弱点を克服し、容易に作製可能なデバイスで大量並列固定を行うために、有機薄膜を用いたオリフィスプレートの開発を行った。具体的には孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルタ (JHWP01300, MILLIPORE) に有機薄膜であるパリレン (poly - monochloro-para-xylylene) を約 2 μ m の厚さで成膜し、メンブレンフィルタ表面の孔をふさぎ領域境界とした、蛍光防止のため油性インク (マッキーケア極細, ゼブラ) を塗布後にレーザー (波長: 355nm) を照射することにより直径約 2 μ m の微細オリフィスを複数もつオリフィスプレートを作製した。

3.2 オリフィス付フィルタによるバクテリアの固定

パリレンを用いたオリフィスプレートをチャンバーと組み合わせて用いバクテリアの吸引固定を行った (Fig.2)。その結果、Fig.3 のように伸長化したバクテリアを微細オリフィスに固定することに成功した。また固定されたバクテリアに生えているべん毛の蛍光観察にも成功した。

4. 細胞膜の部分的破壊の確認

次に固定したバクテリアにおける細胞膜破壊の確認を行った。細胞膜の破壊を確認するために細胞膜不透過で DNA と結合することにより強く蛍光する蛍光色素 YO-PRO-1 (Invitrogen) をリゾチームとともにチャンバーに入れてバクテリアの吸引固定を行った。このとき、べん毛の染色に Alexa 532 を用いると YO-PRO-1 の蛍光と区別することが困難な場合があったので、べん毛は YO-PRO-1 と励起波長の重なりがより少ない Alexa Fluor 594 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen) を用いた。固定したバクテリアに pH7 でリゾチームを作用させたが、細胞膜の破壊を観察することが困難であった。そこでリゾチームの濃度を 10mg/ml に高め、溶液をリゾチームの活性がより高まる pH8 にしたところ

Fig.4 のように微細オリフィスに吸引固定された菌体が YO-PRO-1 の蛍光を発していることが観察され、細胞膜が破壊されたことが確認された。ただし、この状態でのべん毛の観察は出来ておらずリゾチームが菌体全体に効いてしまっている可能性がある。

5. 結論

本研究では、バクテリアのべん毛モーターのプロトンポテンシャルと回転の関係を明らかにするために、パリレンを用いたオリフィスプレートの開発を行った。得られた結果は、以下に要約される。

- 1) メンブレンフィルタにパリレンを蒸着しレーザーで穿孔することで歩留まりよく作製可能な直径約 $2\mu\text{m}$ の微細オリフィスを複数個持つオリフィスプレートを開発した。
 - 2) 上記手法を用いて、伸長化したバクテリアの吸引固定、および固定したバクテリアに生えるべん毛の蛍光観察に成功した。
 - 3) 酵素を用いることで固定したバクテリアの細胞膜を破壊することに成功した。
- ただし、リゾチームが効きすぎてしまうため細胞膜を破壊した状態でのべん毛の蛍光観察には成功しておらず、べん毛モーターの特性解析を行うためにバクテリア固定後にリゾチームをチャンバーに導入することができる実験系を構築する必要がある。

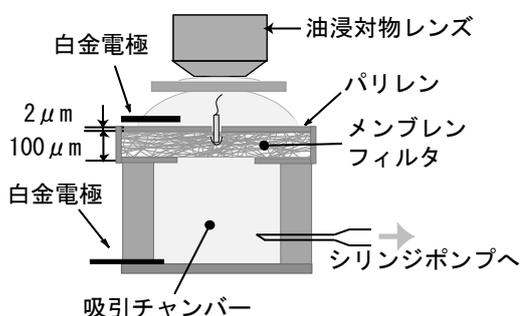


Fig.2 Experimental Setup

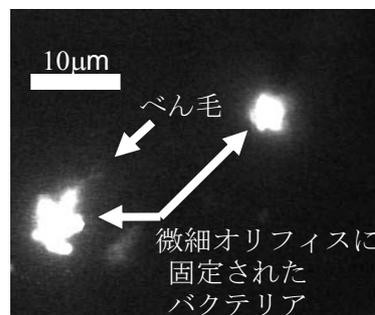


Fig.3 Immobilized bacteria with flagella



Fig.4 A bursted bacterium

参考文献

- [1] Berg, H. C. and Anderson, R. A., "Bacteria swim by rotating their flagellar filaments", *Nature*, Vol.245, No.5425, 1973, pp.380-382.
- [2] Glagolev, A. N. and Skulachev, V. P., "The proton pump is a molecular engine of motile bacteria", *Nature*, Vol.272, No.5650, 1978 pp.280-282.