

微細凹凸構造を用いたテザードセルによるべん毛モーターの特性測定

機械工学専攻 修士2年 尾山 拓未

1. 研究背景

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器官をスクリューのように回転させて泳動する[1]. そのべん毛を回転させているのが細胞膜に埋め込まれているべん毛モーターである(図1). べん毛モーターは細胞膜内外の電位差と pH 差の和で定義されるプロトン駆動力により回転する分子機械である. 直径 40 nm 程度と現在製造できるモーターと比較して 4 桁以上も小さく, マイクロマシンの動力源や DDS (Drug Delivery System) などへの応用が期待される. しかしながらその回転メカニズムはまだ十分に理解されていない. べん毛モーターの回転特性が測定できれば, そのメカニズムの解明に大きく貢献することが期待される. 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.

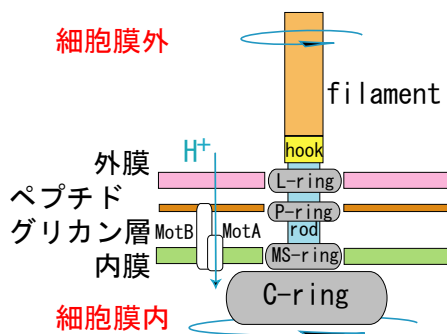
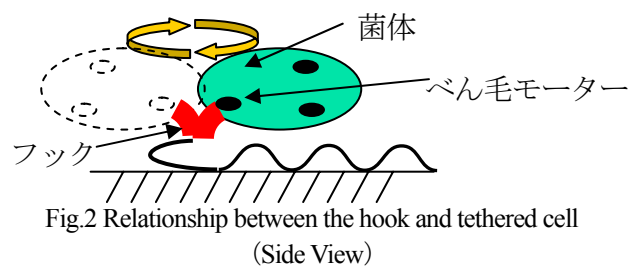


Fig.1 Structure of Flagellar motor



べん毛モーターの回転の様子を観察する方法にテザードセル法がある(図2). これは, べん毛が 1 本だけ固定されたために, モーターの反力で菌体が回転するようになった状態を観察する方法で, べん毛モーターの回転を菌体の回転として観察することができる. サルモネラ菌のべん毛モーターは最大 300 rps で回転するといわれている.

しかし, 菌体が長いこととフックが柔軟性を持つことから, テザードセル中に菌体が基板に接触し, 回転が落ちているとの報告がされている. [2]

本研究室では, 2008 年度卒業の田中氏の卒業研究により, モーター部に YFP (Yellow Fluorescent Protein) を発現させた菌体を用いて凹凸構造上でのテザードセルの観察に成功している. しかしながら, 蛍光観察を伴うため, 高速度での撮影が難しいことや, テザードセルをする菌体が少ないことなどが問題として挙げられている.

2. 研究目的

本研究では, テザードセル中に接触しないような凹凸構造を作製し, 高速度カメラで菌体の回転速度を測定することで, べん毛モーターの $T-\omega$ 特性を明らかにすることを目的としている.

3. 微細凹凸構造の作製

電子線描画装置を用い, 3.5 μm 四方のパターンをアレイ状に配置したマスクを用いて, PDMS (Polydimethylsiloxane) による微細凹凸構造を作製した.

手順は以下のとおりである.

1. マスクに, ネガレジスト ZPN をスピコート (1800rpm 30 秒).
2. 90 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒ベイク.
3. 紫外線を 15 秒露光.
4. 110 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒ベイク.
5. NMD-3 で 90 秒現像.
6. スペーサを置き PDMS を流す.
7. 150 $^{\circ}\text{C}$ 120 秒ベイク.

得られた微細凹凸構造を図 3 に示す.

凸部のピッチ 6 μm , 凸部の幅 3.5 μm , 高さ 4.5 μm の凹凸構造が作製された.

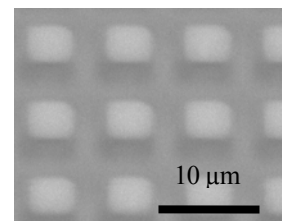


Fig.3 PDMS Micro fabricated device

4. Protein A を用いた抗体固定

基板上へべん毛を固定するには、べん毛抗体(anti-FLIC)を使用するのが一般的である。この抗体は Y 型をしており、べん毛を吸着させるためには、図 4 のように抗原結合部位を上に向ける必要がある。しかしながら従来手法では、抗体を塗布するだけであり、抗原結合部位が上を向いているか否かについては言及していない。本研究では、抗体のエフェクター部位に結合する Protein A というたんぱく質を基板上に塗布することで、Protein A と抗体を結合させ、抗原結合部位が上を向いて、よりべん毛を吸着させるのではないかと考え、実験を行った。

手順は以下のとおりである。

Protein A (66.7 nmol/l, 5 μ l) を塗布した後、10 分静置し付着していない Protein A を洗い流す。その後、べん毛抗体 anti-Flic (66.7 nmol/l, 5 μ l) を塗布した後、同様に洗浄し培養した菌体を滴下したところ、図 5 (b) のように、べん毛が固定された菌体が多数確認された。図 5 (a) は比較のため、Protein A の代わりに PBS(Phosphate Buffered Saline)を入れたものである。

べん毛抗体が上を向くことで、べん毛への吸着がしやすくなり、べん毛が固定されたと考えられる。

この状態からべん毛除去を行ったところ、図 6 のように、多数のテザードセルが確認できた。

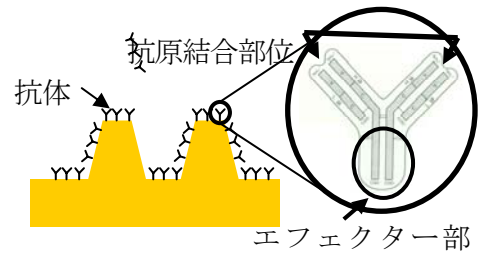


Fig.4 Ideal placement of the antibody
(出展 免疫学の基礎 東京化学同人)

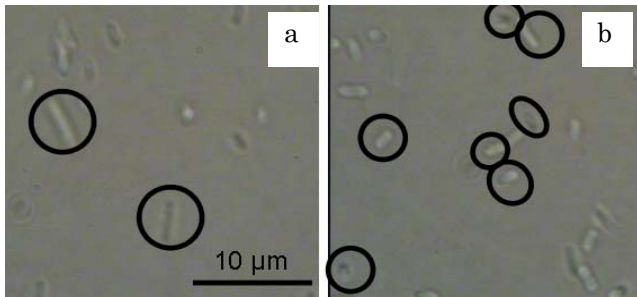


Fig.5 Flagellar antibody fixed using Protein A

a : PBS+Flagellar antibody

b : Protein A+Flagellar antibody

Cells in the circles are floating with their flagellar fixed on the glass.

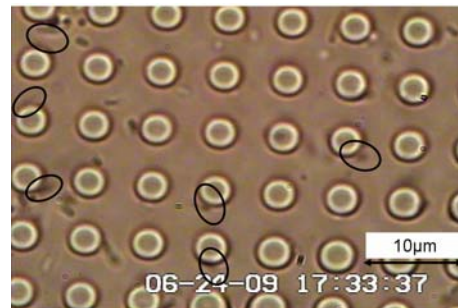


Fig.6 Tethered cell on micro fabricated device

Circles indicate tethered cells

5. 微細凹凸構造上でのテザードセル観察

これまでの結果で得られた凹凸構造上でテザードセル状態にあるバクテリアを観察した。凹凸構造上では、斜めか縦回転をするバクテリアが多く、正確な座標が取得できないため、1回転中のフレーム数を数えることで、回転数を計測した。また、比較のため、平面上でのテザードセルによる回転数も計測した。個々の菌体について、最大回転数を計算し、全ての菌体の平均、標準偏差、最大を計算した。サンプル数は平面上：9、凹凸上：12 である。

結果を表 1 に示す。

微細凹凸構造上で観察されたテザードセルは平面上で観察されたテザードセルよりも回転数が高いことがわかる。このことから、平面上で観察できるテザードセルは、回転が安定していても、表面からの影響を受けており、それによって回転数が落ちていることがわかる。

Table1 Comparison of rotation on flatted pattern and micro fabricated pattern.

	平均(Hz)	標準偏差	最大(Hz)
平面上	9.3	2.9	13.9
凹凸上	21.6	6.6	38.0

6. 粘性を変化させた時のテザードセル観察

特性を調べるためには、テザードセル状態の菌体に加わるトルクを変化させる必要がある。そのため、表面張力を利用した液置換を試みた。図7のようにPDMSとカバーガラスの隙間に、導入したい溶液を滴下すると、表面張力により、カバーガラス内に導入される。逆側からキムワイプなどで溶液を吸い出すと、観察中の液置換を行うことができる。これを用いて粘性を変化させる実験を行った。

まず、凹凸PDMS上でテザードセル状態の菌体を探し、粘性が既知の溶液に液置換をする(溶液A, $1\text{mPa}\cdot\text{s}$)。液置換が終わった後、回転を再計測し、液置換を行う。(溶液B $2\text{mPa}\cdot\text{s}$) その後再び溶液Aに液置換し、回転数を計測した。結果を表2に示す。

Table2 The number of revolutions change by the change of the viscosity.

	溶液 A ($1\text{mPa}\cdot\text{s}$)	溶液 B ($2\text{mPa}\cdot\text{s}$)	溶液 A ($1\text{mPa}\cdot\text{s}$)
グリセリン	9.8Hz	4.6Hz	8.8Hz
スクロース	26.3Hz	1.7Hz	23.8Hz
フィコール	7.6Hz	1.7Hz	5.7Hz

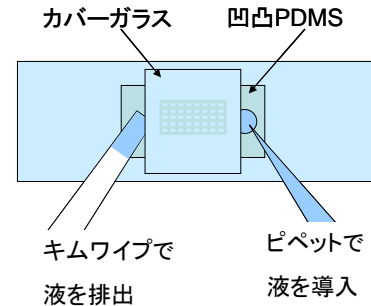


Fig.7 Fluid replacement method using liquid surface tension.

粘性を上げると、回転数が低下し、粘性を落とすと元に戻るといった結果が見られ、溶液の粘性を変化させることで、菌体にかかるトルクを変化させることが示された。

7. 結論

本研究では、テザードセル状態のバクテリアのべん毛モーター特性解析のための技術開発を行った。まず、PDMSを用いて微細な凹凸構造を作製した。微細凹凸構造上でテザードセルを起こすために、ProteinAを用いて、べん毛抗体の抗原結合部位を上に向けることで、多数のテザードセルが得られる事を示した。また、凹凸PDMS上で縦回転や斜め回転をする菌体が、平面上で水平回転をする菌体よりも回転数が高いことを示した。表面張力を用いて、菌体の環境中の溶液を液置換する方法を示した。またそれを利用して、溶液の粘性を変化させることで、菌体の回転数が変化することを示した。

8. 参考文献

- [1] H.C.Berg and R.A. Anderson, "Bacteria swim by rotating their flagellar filaments", Nature, Vol.245, No.5425, 1973, pp.380-382.
- [2] Hashimoto, M., Mashimo, T., Hirano, T., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I." Functional roles of the hook in a rotating tethered cell" J. Mol.Biol. Vol. 375, 2008 pp.367-375.