

電気化学オンチップ遺伝子工学：オンチップ培養とその評価

彼谷 高敏, 珠 玖 仁, 安川 智之, 末永 智一

1 はじめに

1967年に酵素の触媒作用を利用したバイオセンサーが発明されると¹⁾, 時を経ずして, 細胞や微生物をそのまま電極に固定化し, バイオデバイスとして利用する whole-cell センサーが提案された^{2)~4)}. 特に, 微生物は地球上のあらゆる環境に適応・生存しており, 耐熱性菌など極限環境下で生息する微生物の特殊な酵素触媒能や物質代謝作用に着目し, これを応用した高性能微生物センサーが開発されてきた。

筆者らは, 電気化学分析手法でありながら空間分解能を有する走査型電気化学顕微鏡 (scanning electrochemical microscopy: SECM)⁵⁾の特性を活かし, 一枚のチップ上で多検体・多項目測定を実現するセンシングシステムの開発を行ってきた。その過程で, コラーゲンゲル中に哺乳動物細胞や微生物を包埋固定化することで, 100 μm オーダーのディメンション内に各種細胞・微生物を生きたまま配列する技術を確認するに至った。

細胞や微生物が基板上で「生きている」ことの定義は幅広く, 着目する酵素が活性を維持している状態や呼吸活性, その他の各種代謝機能が保持されている状態から, 増殖分裂・遺伝子複製が可能な状態まで様々なケースが混在している。これまで報告されてきたグルタルアルデヒド等の架橋剤や機能性膜への強吸着を利用した微生物固定化法は, 細胞体へのダメージが確認されているものの, センサーとしての安定性に優れているだけでなく, 固定化操作が容易なことから, whole-cell センサー開発当初から積極的に採用されてきた経緯がある。

一方で, Ames 試験⁶⁾などに代表される, 微生物の増殖能や生死判定を指標とするバイオアッセイがあり, 栄養要求性変化や突然変異株の利用による環境ストレス因子スクリーニングが重要な役割を果たしてきた。また, 近年急速に発展した遺伝子組換え技術により, 既に実用レベルに達しているアッセイ法も数多く存在する⁷⁾。本稿では, 微生物チップに焦点を絞り, 増殖, 転写制御, 代謝調節機構をリアルタイムで追跡可能な, 電気化学デバイスの開発に関し紹介する。なお, 細胞チップを用いたバイオアッセイに関する総説が「分析化学」誌上に報告されているので, 哺乳動物細胞のチップ化に興味のある読者は参照していただきたい⁸⁾。

2 微生物チップの試作と薬物スクリーニングへの応用⁹⁾

大腸菌などの微生物は, グルタルアルデヒドで架橋固定化しても呼吸活性などを保持させることは可能であり, 薬剤スクリーニングなどに応用することができる。大腸菌懸濁液と 3.0

μg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) を混合してガラスキャピラリーに充填し, ポリスチレン基板上にスポットした後, 同所に 0.125% グルタルアルデヒド水溶液を再スポットすることにより, 細菌凝集体を作製した (図 1a)。

グルタルアルデヒドは, 酵素固定化の際に架橋剤として一般的に使用されるが, 細胞毒性が強いため固定化が可能な最小濃度で使用した。直径 40 μm, 厚さ 20 μm ほどの凝集体に含まれる大腸菌細胞数は, 体積換算において 100~1000 個程度となる。この大腸菌凝集体を対象に, PBS (100 mM KCl, 25 mM KH₂PO₄, 25 mM Na₂HPO₄, 100 mM D-(+)-glucose) 溶液中で SECM 測定を行った (図 2a)。探針である Pt マイクロ電極の電極電位を -0.50 V vs. Ag/AgCl に保持し, 大腸菌凝集体近傍の酸素還元電流をモニターした。大腸菌凝集体 10 μm 上方において探針を水平方向に走査した場合, 凝集体スポットの中心から ±40 μm の範囲で電流値の減少が観測された。ま

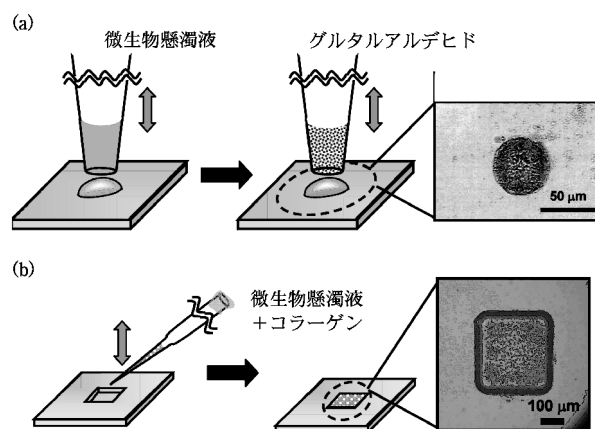


図 1 微生物チップの作製 (a) グルタルアルデヒド架橋法, (b) コラーゲンゲル包埋法

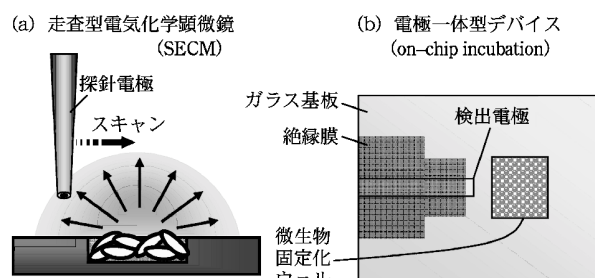


図 2 SECM と電極一体型デバイス

た、大腸菌凝集体を70% ethyl alcoholで処理すると、酸素還元電流低下領域は消滅し、殺菌効果もしくは膜構造の破壊による大腸菌呼吸活性の低下を電流応答として観測可能であることが確認できた。

さらに、大腸菌野生株 (JM109 株) と Ampicillin 耐性株 (JM109/Amp^r) を同一基板上にスポットし、ampicillin に対する薬剤耐性の違いを評価した。ampicillin 添加前では PBS 溶液中において二つのスポットにおける呼吸活性に違いは見られなかったのに対し、添加後は濃度依存的に呼吸活性の低下を観測できた。重要な点は、耐性株の呼吸活性低下が顕著になる ampicillin 濃度領域が、野生株の場合と比べて大幅に高濃度側にシフトしており、その差が各々の株に対し求められた最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の傾向とよく一致していることである。寒天培地上で MIC を求める場合には菌数 10⁶~10⁸ を要するのに対し、本法ではごく少数の菌体を対象とし、かつ迅速な判定が可能となる。

3 コラーゲンゲルを用いた微生物チップの作製とバイオセンシング

コラーゲンは、人体を構成するタンパク質の40%を占め、生体適合性の観点からも、細胞や微生物を固定化する担体として最適の材料と考えられる。氷水中にて微生物懸濁液、コラーゲン type I (新田ゼラチン)、10倍濃度 PBS(-)buffer 溶液を2:8:1の割合で混合し、ガラスキャピラリーに充填し、あらかじめウェットエッチングにより作製したマイクロウェル (容積5nl) に微生物-コラーゲンゲル混合溶液を満たした (図1b)。37°C, pH 6.8 の PBS buffer をマイクロウェル上部から滴下することによりコラーゲンを瞬時にゲル化させ、マイクロウェル内部のコラーゲンゲル中に微生物を包埋的に固定化した。コラーゲンゲル内部の大腸菌を生死判定蛍光プローブ {生細胞染色蛍光色素 Calcein-AM (同仁化学), 死細胞染色蛍光色素 Propidium Iodide (同仁化学)} により蛍光観察したところ、コラーゲンゲル内に包埋固定された大腸菌の多くは Calcein 特有の緑色蛍光を示しただけでなく、ゲル内部において緩慢な運動も観察され、大腸菌が極めて理想的な状態で固定化されてい

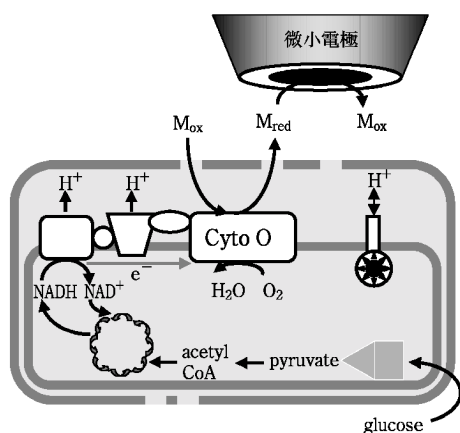
ることを確認した。

呼吸電子伝達鎖から電子を奪う電子メディエータとしてフェロシアン化物イオン [Fe(CN)₆]³⁻を用い、電極電位を 0.60 V vs. Ag/AgCl に保持することにより、微生物内で還元生成するフェロシアン化物イオン [Fe(CN)₆]⁴⁻の酸化電流をモニターした (図3a)。大腸菌 (K12 株) チップに対して測定溶液 {PBS(-)buffer} 中に含まれる D-(+)-glucose 濃度を变化させたところ、濃度依存的にフェロシアン化物イオンの生成量が増加することが確認でき、グルコースセンサーとして機能することを示した¹⁰⁾。また、PBS(-)buffer 中では大腸菌を継続的に増殖させることは困難であるが、大腸菌培養用培地 (nutrient liquid medium, ニッスイ) 中 37°C で静置培養すると、遅滞期 (lag phase), 対数増殖期 (log phase), 環境変動適応期を経て定常期 (stationary phase) へ至る大腸菌の増殖過程をチップ上で電気化学的に追跡することも可能になった¹¹⁾。

現在我々は、培養操作が可能な微生物チップをプラットフォームとし、諸々の遺伝子工学工程を連続的に実現する“on chip gene engineering”を目標に掲げている。DNA シークエンサーをはじめとする電気泳動工程や PCR のサーマルサイクリング工程がチップ上で実現され、市販化に向けた改良が急ピッチで展開されている昨今においても、遺伝子工学上の基本操作である微生物培養操作を基板上で再構築し、目的株の分離などに応用した研究例は極めて少ない。

lac オペロンは Jacob-Monod のオペロン説の起点となった、歴史的に極めて重要な発現系である。誘導物質 (例えば isopropyl-β-D(-)thiogalactoside: IPTG) を加えると、プロモーター領域に結合している lacI がはずれて lacY, lacZ が転写される。とりわけ、lacZ は現在分子生物学の分野で最も重要な、最も手軽に使われるレポーター=ベータ・ガラクトシダーゼ (βGAL) をコードしている。元来、βGAL は、ELISA の標識酵素として、p-aminophenyl-β-D-galactopyranoside (PAPG) を酵素基質とする電気化学検出系が 1980 年代から知られていた。しかし、組換え微生物のレポーターの検出系として電気化学検出が報告されたのは最近である⁷⁾¹²⁾¹³⁾。

(a) 呼吸活性評価系



(b) βGAL 活性評価系

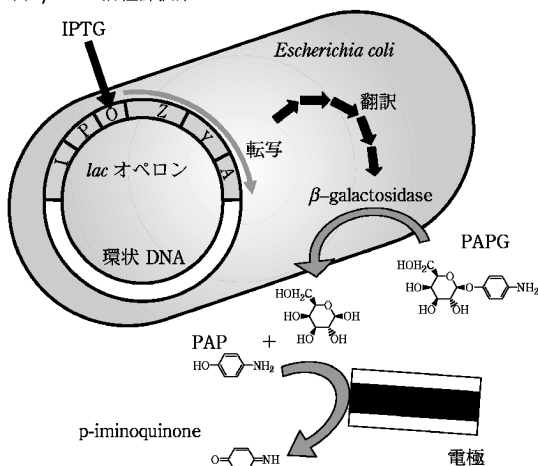


図3 呼吸活性およびβGAL 活性評価系

微細加工や微小体積検出にかけては、電気化学センサーチップの手軽さは他の光学的手法と比較しても優位であるといえる。 β GALは基質PAPGを酵素触媒的に加水分解反応し

-aminophenol (PAP)を生成する。探針電極の電位を0.30 V vs. Ag/AgClに保持することにより、 β GAL活性をPAP酸化電流としてモニターした(図3b)。まず、IPTG添加、非添加の液体培地で、37°C、15時間培養した大腸菌(K12株)を対象に、 β GAL発現誘導を電気化学計測により確認した。2.0 mg/ml PAPG存在下における大腸菌-コラーゲンゲルスポット近傍をSECMにより画像化したところ、IPTG添加培地で培養した大腸菌ではPAP酸化電流の著しい増加が観測されたのに対し、IPTG非添加培地で培養した大腸菌に対する酸化電流の増加はわずかであった。このわずかな電流増加は基礎合成により大腸菌が有する β GAL活性によるものと思われる。

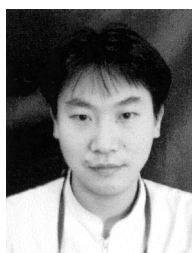
さらに、ごく少数の大腸菌を対象として、IPTG-*lac*系における β GAL発現誘導のリアルタイム電気化学計測を検討した¹⁴⁾。発現誘導過程をリアルタイムで追跡するにあたり、検出電極をチップ上に集積化した電気化学デバイスを構築した(図2b)。電極は20 μ m幅の白金バンド電極で、微生物固定化ウェルの端から30 μ mの位置に設計されている。このデバイスを液体培地中に設置し、インキュベーター内37°Cで β GAL発現をオンラインで計測することができた。IPTG添加後 β GAL活性が検出されるまで20分程度を要し、その後5時間近く応答電流は増加し続けた。通常、対数増殖期のIPTG-*lac*系における β GAL発現開始に要する時間は3分程度とされるが、培養条件にも依存すると考えられる。筆者らはチップ上での形質転換¹⁵⁾や環境汚染物質スクリーニング¹⁶⁾も検討している。

文 献

- 1) S. J. Updike, G. P. Hicks : *Nature*, **214**, 986 (1967).
- 2) S. F. D'Souza : *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 337 (2001); N. S. Hobson, I. Tothill, A. P. F. Turner : *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 455 (1996); S. Nishikawa, S. Sakai, I. Karube, T. Matsunaga, S. Suzuki : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 814 (1982).
- 3) K. Takayama, T. Kurosaki, T. Ikeda : *J. Electroanal. Chem.*, **356**, 295 (1993); T. Ikeda, T. Kurosaki, K. Takayama, K. Kano, K. Miki : *Anal. Chem.*, **68**, 192 (1996); 加納健司, 池田篤治 : *ぶんせき*, **2003**, 576.
- 4) P. Ertl, B. Unterladstaetter, K. Bayer, S. Mikkelsen : *Anal. Chem.*, **72**, 4949 (2000).
- 5) 青柳重夫 : *ぶんせき*, **2000**, 414; 平野 悠, 小谷松大祐, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一 : *Electrochemistry*, **72**, 137 (2004).
- 6) J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B. N. Ames : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135 (1975).
- 7) S. Daunert, G. Barrett, J. S. Feliciano, R. S. Shetty, S. Shrestha, W. Smith-Spencer : *Chem. Rev.*, **100**, 2705 (2000).
- 8) 鳥澤勇介, 珠玖 仁, 安川智之, 末永智一 : *分析化学*, **53**, 367 (2004).
- 9) T. Kaya, M. Nishizawa, T. Yasukawa, M. Nishiguchi, T. Onouchi, T. Matsue : *Biothech. Bioenerg.*, **76**, 391 (2001).
- 10) T. Kaya, K. Nagamine, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue : *Electrochemistry*, **71**, 436 (2001); T. Kaya, D. Numai, K. Nagamine, S. Aoyagi, H. Shiku, T. Matsue : *Analyst*, **129**, 529 (2004).
- 11) T. Kaya, K. Nagamine, N. Matsui, D. Oyamatsu, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue : *Lab Chip*, **3**, 320 (2003).
- 12) D. L. Scott, S. Ramanathan, W. Shi, B. P. Rosen, S. Daunert : *Anal. Chem.*, **69**, 16 (1997).
- 13) I. Biran, L. Kilmenity, R. H. Aronis, E. Z. Ron, J. Rishpon : *Microbiology*, **145**, 2129 (1999).
- 14) T. Kaya, K. Nagamine, N. Matsui, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue : *Chem. Comm.*, **2004**, 248.
- 15) K. Nagamine, T. Kaya, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue : in preparation.
- 16) N. Matsui, T. Kaya, K. Nagamine, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue : in preparation.

彼谷高敏 (Takatoshi KAYA)

富士レビオ㈱研究推進部 : 演出技術研究グループ (〒192-0031 東京都八王子市小宮町51)。東北大学大学院工学研究科修了。工学博士。◀現在の研究テーマ▶マイクロフルイディクスデバイスの開発。
E-mail : ts-kaya@fujirebio.co.jp



珠玖 仁 (Hitoshi SHIKU)

東北大学大学院環境科学研究科 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉07)。東北大学大学院工学研究科修了。工学博士。



安川智之 (Tomoyuki YASUKAWA)

東北大学大学院環境科学研究科 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字07)。東北大学大学院工学研究科修了。工学博士。



末永智一 (Tomokazu MATSUE)

東北大学大学院環境科学研究科 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉07)。東北大学大学院薬学研究科修了。薬学博士。
E-mail : matsue@bioinfo.che.tohoku.ac.jp

