

# 過酷環境でも良く育つ微生物の単離手法の創出

立命館大学 理工学部機械工学科

磯崎 瑛宏

## 1. はじめに

近年では、エネルギーの枯渇や地球温暖化、水質汚染など、地球規模の課題が散見されており、どれも簡単に解決できるような問題はない。工業的な努力も多数行われており、例えばエネルギー枯渇問題に対しては、太陽光発電を中心とした自然エネルギーを利用する研究が数多く行われている。特に、日本においてはペロブスカイト太陽電池<sup>1)</sup>など新規材料の太陽電池の開発にいち早く着手しており、大きな期待が寄せられている。このような背景の中、これらの問題を微生物で解決しようという研究も近年着目されている。例えば、藻類が体内で脂質を生成できる特性を生かして、その脂質をバイオ燃料として用いる研究<sup>2)</sup>や、藻類が重金属などを体内に吸収できる特性を生かして、重金属に汚染された水の浄化に藻類を利用する研究<sup>3-6)</sup>が行われている。このように、藻類を中心とした微生物の応用は大きな期待をもって研究が行われている。

上述のような微生物を工業的に応用する研究を実現するためには、藻類の増殖スピードが極めて需要である。例えば、エネルギー問題に応用する場合、藻類を培養するために使用するエネルギーや藻類からバイオ燃料を抽出するために使用するエネルギーを、藻類が生み出すバイオ燃料のエネルギー量が上回っていることが重要である。藻類は一般的に、最もよく育つ細胞密度や環境があるが、その環境を常に維持することは現実的に大変で、可能であれば、藻類にとって過酷な環境下においても増殖スピードを維持できるような藻類細胞を創出することが望ましい。

新たな機能や従来持っているような機能を高機能化させたような能力を持っている細胞を生み出す手法に、指向性進化法(Directed Evolution)<sup>7-8)</sup>という方法がある。2018年のノーベル化学賞を受賞した研究分野であり、自然界の淘汰モデルを模倣する形で、細胞やタンパク質や拡散などの機能を、事前に設定された目標に向かわせる形で進化させていく手法である。具体的に細胞のケースで説明する。細胞の集団に対して例えば化学的または電気的な手法で変異を導入する。そのことにより、細胞の修復過程でDNAのコピーエラーが生じ、異なるDNAを有する細胞が多数生成される。その中で最も目標に近い細胞を選び抜き、その細胞を増殖させる。さらにその細胞に変異を与える。このことにより、その細胞の機能を起点にさらに複数のDNAを有する細胞集団を作り出せる。このようなサイクルを何回も繰り返すことにより、最終的には目標に到達するような極めて性能の良い細胞を作り出すことができる。このような手法が指向性進化法と呼ばれ、生物学では古くから使われている。この手法を本研究課題に応用しようとするとき、過酷な環境をどのように作り出すか、また、過酷な環境を生き抜くような細胞をどのように選び出すか、ということが大きな課題である。これを解決するために、我々は、液滴マイクロ流路デバイスを用いることを考えた。

上述の背景を受けて、本研究は、過酷な環境でも増殖可能な微生物を安価かつ高速に分類する手法を創出することを目的とする。具体的には、1ナノリットル以下の微細液滴の中に微生物を封入し、細胞が液滴内で分裂するにつれて変化する液滴の比重を上手く利用して、分裂し

た細胞を数多く含む液滴を簡単に分離するシステムの構築を目指す。微小液滴は栄養分も少なく、微生物にとって過酷な環境である。従って、微小液滴内で良く増殖できる微生物は、過酷環境に強いと言うこともできる。本研究では特に藻類に着目して研究を進める。具体的には、図1に示すように、指向性進化法における選抜において、上述の液滴を用いた選抜法を開発する。さらに将来的には、選抜された細胞を解析し、バイオ燃料への応用や食品への応用を行い、SDGsの2番と7番に貢献することを目指す。

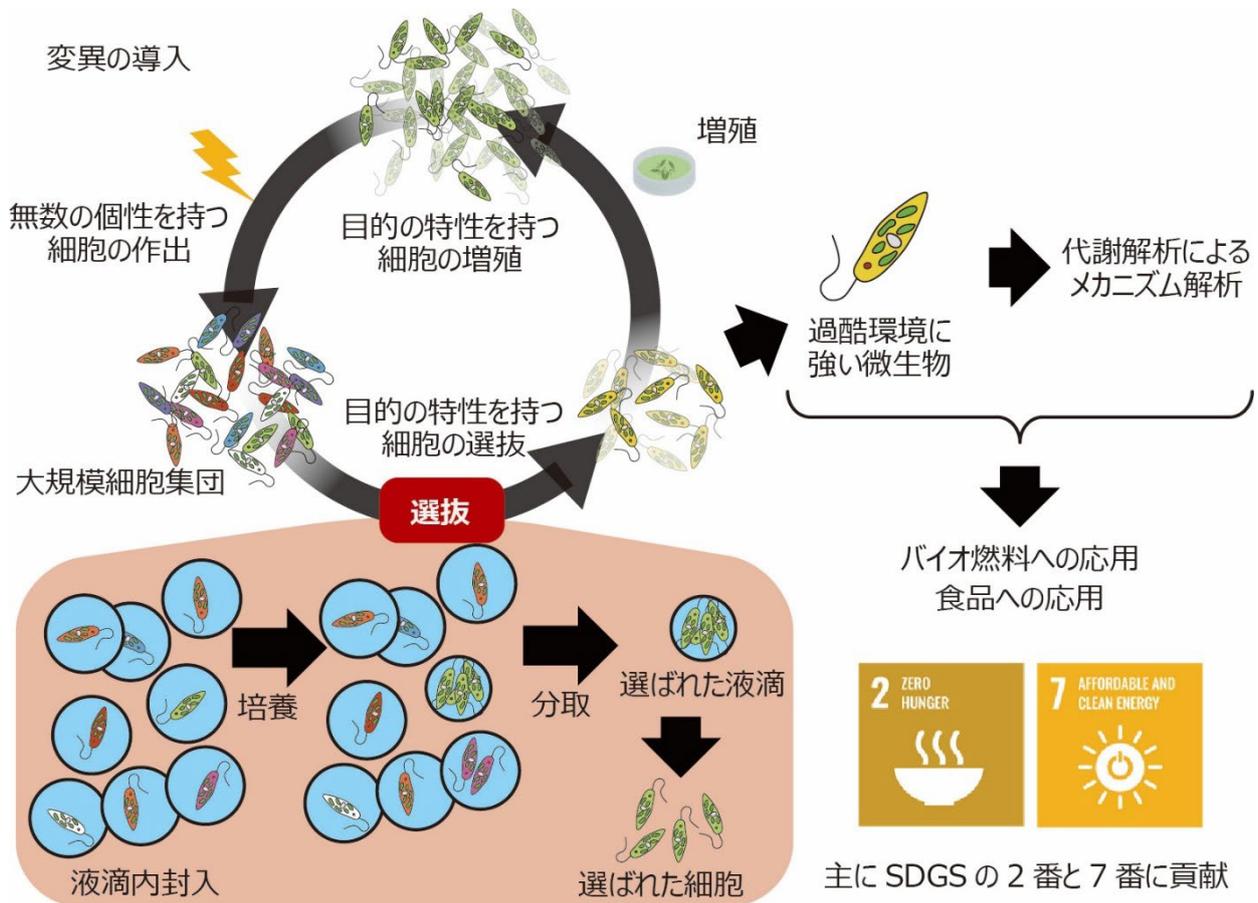


図1. 本研究の概要と本研究の成果を利用した将来構想

## 2. 液滴を用いた増殖藻類選抜の課題

液滴選抜機能を含む微小な液滴を取り扱うマイクロ流路技術（液滴マイクロ工学）は、2006年にアメリカのハーバード大学の Weitz グループから発表<sup>9)</sup>されて以来盛んに研究されて基礎技術は確立され、かつ応用展開も盛んに行われ、幅広い分野で大きな成果を挙げている<sup>10-12)</sup>。しかしながら、液滴マイクロ工学を用いるためには、高額な電気アンプや光学セットアップを必要とする液滴分取システムを構築する必要があるなど、マイクロ流路分野外の人には使いづらいものであった。この問題を解決するために、本研究では液滴内で細胞が分裂した際に液滴が小さくなることに着目して簡易的な液滴分取技術の開発を行うことを目的に研究を行った。

### 3. 液滴内の細胞数と液滴の密度の試算

周りがオイルに囲まれた液滴内で細胞が増殖すると、液滴内の浸透圧が変化して液滴が収縮することが知られている。このとき、液滴内の要素のほとんどが細胞に締められることになり、液滴の密度が変化する。液滴の大きさがどの程度変化するか、細胞がどの程度の密度を有するか、は正確に計測できていない状況ではあるが、これらを仮定して液滴の密度がどの程度変化するかを計算した。図2に計算結果を示す。水の密度を  $998 \text{ kg/m}^3$  とし、計算している。細胞の密度は具体的に情報が無いので、水よりも5%重たいとして計算している。液滴内の細胞の数  $k$  が増えるほど液滴の密度が増える。また、液滴が小さくなると液滴内における細胞の締める割合が大きくなるため、密度があがる。さらに、液滴が小さくなると、細胞数の違いによる密度の違いも大きくなること明らかになった。本研究においては、このような違いを上手く利用して液滴内で多く細胞分裂が起こる細胞を同定してピックアップする。

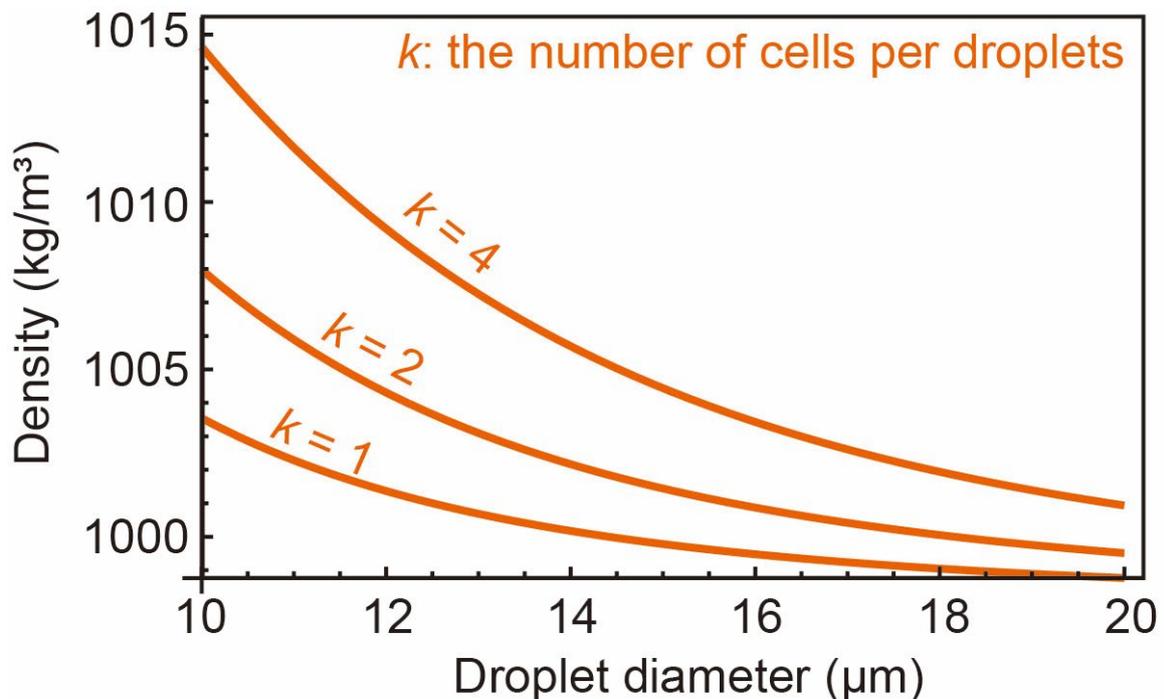


図2. 液滴の密度試算

### 4. 液滴選抜の原理

液滴選抜を行うにあたり、安価で高速に行える方法を提案する。具体的には、図3に示すように、シリンジ内に液滴とミネラルオイルとフッ素系オイルを封入して静置する。フッ素系オイルは水よりも重たく、ミネラルオイルは水よりも軽いため、図3に示す用に、液滴が集まる層がフッ素系オイルとミネラルオイルに挟まるように配置される。このとき、前章で仮説を立てたように、細胞分裂をした細胞を含む液滴は比重が大きくなり、下側に、細胞分裂をしていない細胞を含む液滴は中間に、細胞を含まない液滴は上側に集まる。従

って、フッ素系オイルと液滴層の界面に存在する液滴をピックアップすることで、液滴内で良く育つ細胞を選抜することが可能になる。

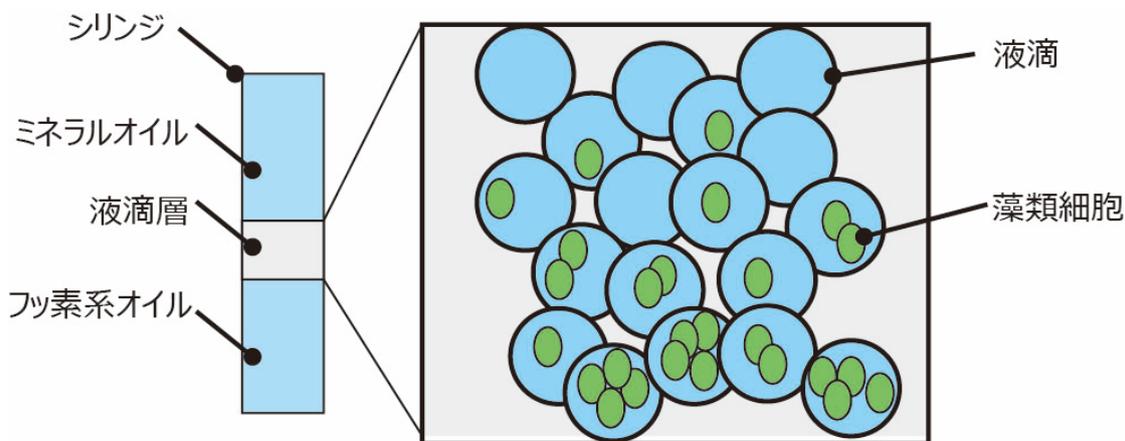


図 3. 液滴選択の概念図

## 5. 液滴選抜の原理検証実験

前章で説明した原理が動作するかどうかを確認するために、実験を行った。具体的には、液滴生成マイクロ流路デバイスを、シリコンゴム (PDMS) を用いて作製し、液滴を生成した。液滴の生成には液滴周辺のオイルはフッ素系オイル Novec 7300 に界面活性剤 Neat 008-FluoroSurfactant を 5%混ぜた溶液を用いて行った。このとき、クラミドモナス細胞 (*Chlamydomonas reinhardtii* cells) を母液に分散させておき、液滴内に封入されるようにした。生成した液滴は、フッ素系オイルと一緒にシリンジ内に集めた。その後、フッ素系オイルを適量残した状態で、ミネラルオイルを追加した。シリンジを静置して培養装置内で培養した。培養環境として、光量を  $120 \mu\text{mol photons/m}^2 \text{ per second}$  に調整し、14 時間点灯と 10 時間消灯のサイクルで昼の環境と夜の環境を再現した。このような培養環境で 15 日間培養した結果後の写真を図 4(a)に示す。ミネラルオイル層、液滴層、フッ素系オイル層がきれいに分かれていることが見て取れる。これに対して、図 4(b)に示すように、ガラス管を挿入して毛細管現象により液滴を吸い取る。ガラス管を挿入する位置を、ミネラルオイルと液滴層の界面付近になるように挿入すると (図 4(b-i))、細胞が含まれていない液滴がピックアップされることになり、フッ素系オイルと液滴層の界面付近になるように挿入すると (図 4(b-ii))、細胞分裂した細胞が含まれる液滴がピックアップされることになる。これを行った結果を図 4(c)に示す。細胞封入時には、液滴に細胞が一個以下しか入らないように条件を整えているので、15 日後の液滴内に、例えば液滴内に 4 つの細胞が入っているということは、2 回細胞分裂をしたことを意味している。細胞を採った位置が液滴層の下部のときは、上部の時と比較して 4 個の細胞が封入されている液滴の割合が多いことが分かる。このことは前章で述べた仮説が正しいことを示唆する結果となっている。

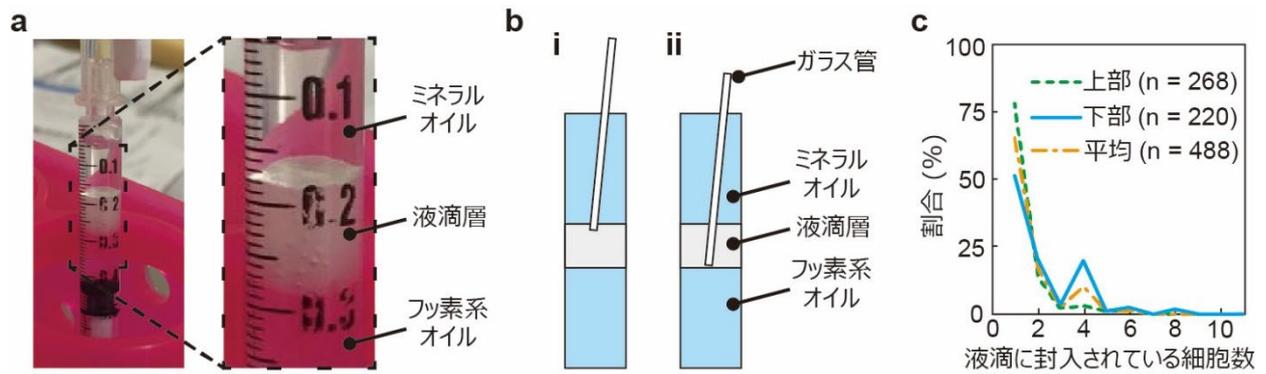


図 4. 液滴選択の原理検証実験。(a)シリンジ内の液滴の集まった層がミネラルオイルとフッ素系オイルで挟まれている様子。(b)シリンジ内の液滴をピックアップする方法。液滴層上部から液滴を吸い取るとき(i)と下部から吸い取るとき(ii)。(c)液滴内の細胞の個数分布。

図 4(c)で示した結果が、ガラス管による液滴採取段階での手技によるばらつきである可能性を排除するために、図 4(a)のシリンジを上下逆さまにするなどしてフッ素系オイルと液滴層を混ぜて液滴を分散させ、再度液滴をピックアップして観察を行った。図 5(a)に分散後の写真を示す。フッ素系オイル内に液滴が良く分散していることが分かる。フッ素系オイル内に液滴が分散し、ミネラルオイル側には分散していないのは、液滴表面にフッ素系オイルと良くなじむ界面活性剤を使用していたためである。このように液滴が分散された状態から、図 4(b)に示すものと同じような形で液滴をピックアップして個数分布を計測した。結果を図 5(b)に示す。上部、下部に関わらず同じような個数分布になっていることが確認できた。このことは図 4(c)の結果が手技によるばらつきの結果ではなく、前章の仮説が正しいことを示唆する結果であることを裏付ける結果と言える。

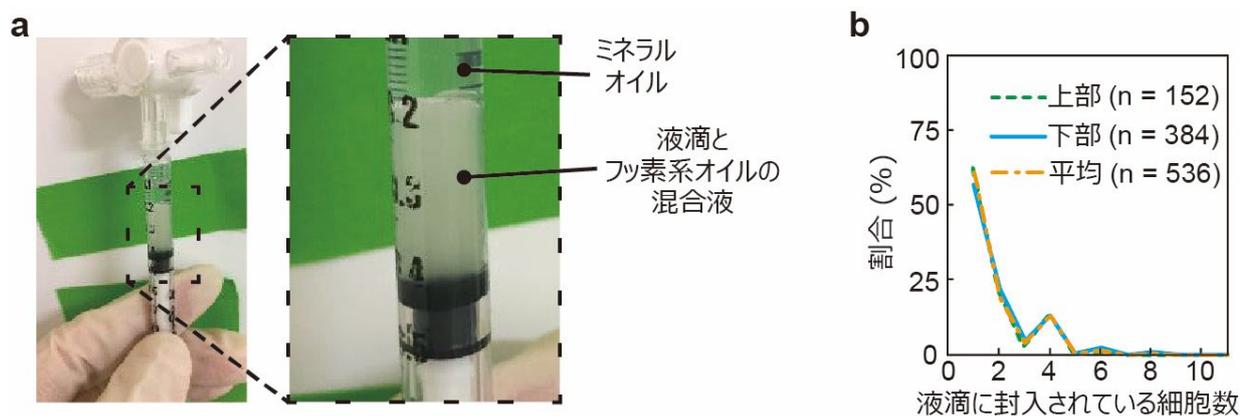


図 5. 液滴選択の原理検証実験の裏付け実験。(a)液滴層を攪拌するために上下に揺らしている様子と攪拌後の写真。(b)攪拌後の液滴内の細胞の個数分布。

## 6. 3D プリンターによる液滴生成デバイス作製の挑戦

更なる簡略化を目指し、3D プリンターで製作された液滴生成装置の作製を試みたが、3D プリンターの製作精度が足りず、失敗した。失敗した結果は報告書には見合わない可

能性もあるが、今後のさらなる検討の足掛かりとしての活用価値があると判断し、掲載する。

本研究では、アジリスタの3Dプリンターを用いてデバイス作製を試みた。図6に設計図および3Dプリンターで出力したデバイスの写真を載せる。外形としては上手く出力できているが、液滴生成部であるマイクロ流路部分の出力がうまくできなかった。これは3Dプリンターの出力精度と同程度の大きさである $60\mu\text{m}$ 程度のマイクロ流路の作製が求められるためであった。実験開始当初の見込みでは、出力精度よりも大き目の設計を行うことで、微細な穴をあけることができ、精度が悪くとも、液滴を生成できるデバイスが実現できると考えていた。このような見込みのもと、様々な大きさのマイクロ流路設計を行い、3Dプリンターによる出力を繰り返したが、どれも上手く作製することが出来なかった。以上より、出力精度がさらに高い3Dプリンターを用いなければ液滴生成デバイスは実現できないことが確認された。

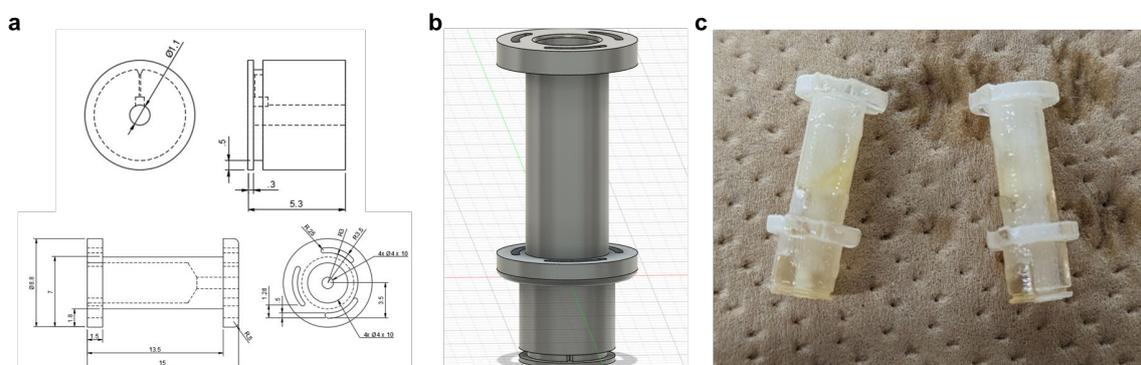


図6. 3Dプリンターによる液滴生成デバイスの試作。(a)CAD図面の2次元出力。(b)CAD図面の3次元出力。(c)3Dプリント出力したデバイス。

## 7. まとめ

本研究では、過酷環境でも良く育つ藻類細胞の選抜方法を構築することを目標とし、微小液滴を用いた手法を提案して、原理検証実験を行った。その結果、シリンジ内で液滴を静置させて重力により細胞分裂を伴った細胞が存在する液滴が下部に存在することが示され、さらにガラスキャピラリを用いることで、それらが選択的にピックアップできることを示唆する結果が出た。液滴生成プロセスはマイクロ流路デバイスを用いているため、これをさらに安価に行うことができるように、3Dプリンターによる液滴生成デバイスの試作を行ったが、これは失敗に終わってしまった。本研究で提案するプロセス全体を安価に行えるようにするために更なる研究開発が必要であるものの、最も重要な選抜の原理検証を終えることができたことで、今後、本研究は大きく発展するものと期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

## 参考文献

- 1) Abdurashid Mavlonov, Yoshihiro Hishikawa, Yu Kawano, Takayuki Negami, Akinobu Hayakawa, Sho Tsujimura, Takuro Okumura, Takashi Minemoto, “Perovskite solar cell modules: Understanding the device degradation via damp heat testing,” *Solar Energy* 286, p. 113174, 2025.
- 2) Georgianna, D. R. & Mayfield, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488, pp. 329–335, 2012.
- 3) M. Xu, J. Harmon, D. Yuan, S. Yan, C. Lei, K. Hiramatsu, Y. Zhou, M. H. Loo, T. Hasunuma, A. Isozaki, and K. Goda, “Morphological indicator for directed evolution of *Euglena gracilis* with a high heavy metal removal efficiency,” *Environmental Science and Technology* 55, pp. 7880-7889, 2021.
- 4) Leong, Y. K.; Chang, J.-S. “Bioremediation of Heavy Metals Using Microalgae: Recent Advances and Mechanisms,” *Bioresour. Technol.* 303, p. 122886, 2020.
- 5) Suresh Kumar, K.; Dahms, H.-U.; Won, E.-J.; Lee, J.-S.; Shin, K.-H. “Microalgae - A Promising Tool for Heavy Metal Remediation,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, pp. 329– 352, 2015.
- 6) Zeraatkar, A. K.; Ahmazadeh, H.; Talebi, A. F.; Moheimani, N. R.; McHenry, M. P. “Potential Use of Algae for Heavy Metal Bioremediation, a Critical Review,” *J. Environ. Manage.* 181, pp. 817– 831, 2016.
- 7) Lutz, S., “Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design,” *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, pp. 734–743, 2010.
- 8) Packer, M. S.; Liu, D. R., “Methods for the directed evolution of proteins,” *Nat. Rev. Genet.* 16, 379–394, 2015.
- 9) K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, D. A. Weitz, “Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices,” *Appl. Phys. Lett.* 88, p. 024104, 2006.
- 10) J.-C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, “Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): Efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity,” *Lab Chip* 9, pp. 1850–1858, 2009.
- 11) B. Kintsjes, C. Hein, M. F. Mohamed, M. Fischlechner, F. Courtois, C. Lainé, F. Hollfelder, “Picoliter cell lysate assays in microfluidic droplet compartments for directed enzyme evolution,” *Chem. Biol.* 19, pp. 1001–1009, 2012.
- 12) A. Isozaki, Y. Nakagawa, M. H. Loo, Y. Shibata, N. Tanaka, D. L. Setyaningrum, J.-W. Park, Y. Shirasaki, H. Mikami, D. Huang, H. Tsoi, C. T. Riche, T. Ota, H. Miwa, Y. Kanda, T. Ito, K. Yamada, O. Iwata, K. Suzuki, S. Ohnuki, Y. Ohya, Y. Kato, T. Hasunuma, S. Matsusaka, M. Yamagishi, M. Yazawa, S. Uemura, K. Nagasawa, H. Watarai, D. D. Carlo, and K. Goda, “Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput sorting of large-volume biological compartments,” *Science Advances* 6, eaba6712, 2020.