

平成 23 年度研究助成報告（兼、終了報告）

研究題名	酵母細胞と固体表面間の相互作用力の直接測定
研究期間	平成 22 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日
研究機関・所属 研究者名	京都大学・大学院工学研究科 化学工学専攻 新戸 浩幸

1. 平成 23 年度研究成果の概要

平成 22 年度は、酵母に対するナノ粒子・マイクロ粒子の相互作用力を検討するために、周辺技術の確立や予備検討を行った。

平成 23 年度は、酵母を種々の電解質濃度に置いた後、酵母の表面電位を測定すると共に、SEM による酵母表面の形態観察を行った。それらと並行して、酵母-ガラス板間の相互作用力の AFM 測定を行った。また、ナノ粒子が酵母菌体に及ぼす影響を検討した。

著者らは、動物細胞（赤血球、浮遊性細胞、接着性細胞）に対するナノ粒子・マイクロとの相互作用を、種々の手法を開発・駆使して、評価してきた。ここで培った評価手法を、酵母のような単細胞真核生物に適用することにより、粒子に対する酵母の付着現象を定量的に検討し、動物細胞の接着現象との差異を明らかにすることが、本研究の目標であった。しかし、下記のように、予想外に数々の困難に直面し、それらの解決に多くの時間を費やしたため、当初の予定通りには研究が進まなかった。本助成期間終了後も、この研究を継続して、当初の目標を達成する予定である。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

多くの工業分野において、製品への微生物の混入、バイオフィルムの形成などが問題となっている。特に食品製造業では、食品とその製造装置内面への細菌や酵母などの付着は、製品劣化、食中毒の発生、装置材料表面の脆化などの原因となる。これらの問題を根本的に解決するためには、固体表面に対する微生物の付着・脱着プロセスを詳細に理解し、正確に制御することが必要不可欠である。しかし、微生物の付着現象の定量的な検討と詳細な理解は、未だ不十分である。

著者らはこれまでに、原子間力顕微鏡 (AFM) による単一の生細胞・固体表面間相互作用力の直接測定技術を開発し、本技術により動物細胞の固体表面への接着力を定量的に評価してきた。その結果、動物細胞の固体表面への接着力は、固体表面の化学的性質ばかりでなく、培養液中の接着誘導分子の有無にも大きく影響されることなどを明らかにした。

本研究では、食品産業で広く利用されている微生物の代表として酵母を取り上げ、生きた酵母細胞-固体表面間の相互作用力の AFM 測定を行うことにより、固体表面に対する酵母の付着・脱着プロセスを詳細に理解することを目指した。

2. 動物細胞と単細胞真核生物の違い

多細胞生物において、個々の細胞は独立して存在することは不可能であり、細胞同士が結合するか、細胞が細胞外マトリックスと結合している。このため、動物細胞のように、多細胞生物を構成する細胞には、多細胞生物特有の細胞接着装置が備わっている。一方、酵母のような単細胞真核生物は、独立して生存することが可能であり、特殊な接着装置を具備しない。しかし、単一の細胞だけで世渡りする酵母は、置かれた環境 (温度、pH、電解質濃度など) が変化すると、それに順応すべく自分自身の状態 (特に細胞膜付近) を変化させると考えられる。このため、置かれた環境に応じて酵母の固体表面への付着は複雑に変化する可能性がある。

このような酵母の単細胞真核生物としての特徴に着目して、固体表面に対する酵母の付着現象を定量的に検討し、動物細胞の接着現象との差異を明らかにすることが本研究の最終目標である。本研究により酵母の付着現象の全体像が明らかになれば、製造装置内面に付着した酵母など微生物の洗浄除去および付着予防、微生物の分離・固定化技術などに貢献できるものと考えている。

3. 実験

3.1 酵母菌体と培養

分裂酵母である *Schizosachharomyce pombe* (*S. pombe*; NBRC 1628) を用いた。試験管に YE 培地を入れて少量の菌体を植菌した後、シリコ栓で蓋をして、バイオシ

エイカー (BR-43FL 改, TAITEC; 30°C, 200 rpm) 中で液体培養を行った。倍加時間は2~3時間であった。対数増殖期にある菌体をサンプルとして用いた。

3.2 ナノ粒子

ナノ粒子として、粒径 15~1000 nm のポリスチレン (PS) 粒子またはシリカ (SiO₂) 粒子 (励起波長 = 485 nm, 蛍光波長 = 510 nm; micromod) を用いた。

3.3 電気泳動度とゼータ電位の測定

酵母とナノ粒子の電気泳動度とゼータ電位は、顕微鏡電気泳動装置 (Micro-Electrophoresis Apparatus Mk II 改, Rank Brothers) とレーザードップラー法に基づく電気泳動装置 (ZetasizerNano ZS, Malvern) を、それぞれ用いて測定した。酵母と粒子と分散媒として、DPBS (Ca, Mg 不含, NaCl 138 mM 他; 14190-144, GIBCO) または 150 mM NaCl 水溶液 (DPBS とイオン強度が等しい) を用いた。

3.4 酵母菌体・基板間の接着力の AFM 測定

測定直前に純水などで酵母菌体表面を洗浄した後、150 mM NaCl 水溶液中に酵母菌体を再分散させた。原子間力顕微鏡 AFM (MFP-3D, Asylum Research) を用いて、この酵母菌体の1つを AFM カンチレバーの先端に接着させることにより、細胞プローブを作製した。相互作用力の測定は、フォースモードにおいて、細胞プローブを試料基板に近づけた後、基板表面から離すことより行った。バーガラス (Matsunami) を試料基板として用い、使用直前にアセトン→エタノール→純水で洗浄した後、プラズマ処理した。

3.5 酵母菌体のナノ粒子への暴露

ナノ粒子が懸濁された YE 培地中に、対数増殖期まで増殖させた菌体の一部を植菌し、バイオシェイカー (30°C, 200 rpm) 中で液体培養を行った。培養液の濁度から菌体の増殖率を求めて、ナノ粒子不含のサンプルの増殖率と比較することより、菌体の増殖に及ぼすナノ粒子の影響を検討した。

3.6 CLSM または SEM による形態観察

CLSM (Nikon CIsi-ready TE2000-E, レーザー波長 488 nm, 594 nm) により、蛍光ナノ粒子暴露後の菌体の形態を観察した。Nano Percolater (JEOL) を用いて、ナノ粒子暴露後の菌体を捕集した後、4% パラホルムアルデヒドで1次固定し、1% OsO₄ で2次固定した。エタノール段階希釈液で脱水した後、t-ブチルアルコールで溶液置換し、4°Cで凍結させた。その試料を、VFD-21S (Vacuum Device) で凍結乾燥させ、Emitech K575XD (Quorum Technologies) で5nmの金蒸着した後 Keyence V8800 で観察した。

4. 結果と考察

4.1 酵母菌体の電気泳動度

酵母菌体 (*S. pombe*)、赤血球、浮遊性細胞 (Jurkat)、接着性細胞 (B16F10)、ポリスチレン球 (直径 2 μm) の電気泳動度に対する分散媒体中の電解質 NaCl 濃度の影響を、図 1 に示す。水溶液中で負帯電しているポリスチレン球の電気泳動度の絶対値は、低 NaCl 濃度領域では急激に減少し、50 mM 以上の濃度ではほぼ一定 ($-1.2 \mu\text{m s}^{-1}/(\text{V cm}^{-1})$ 、ゼータ電位 -16 mV に相当) となった。細胞を低電解質の水溶液中に懸濁すると、細胞内外の浸透圧差のため、細胞が膨潤し破裂してしまう。このため、細胞膜がむき出しの動物細胞では、電気泳動度が測定可能であった電解質濃度は 50 mM 以上であった。柔らかい。一方、酵母菌体では、細胞膜の外側に強固な細胞壁が存在しているため、低い電解質濃度でも酵母菌体が崩壊せずに、電気泳動度が測定可能であった。しかし、酵母菌体の電気泳動度の絶対値がそもそも小さいため、電気二重層が遮蔽されやすい高い電解質濃度 (150 mM) では、かなり高い電圧を印加する必要があり、電極での電気分解や熱対流による影響で、電気泳動度の測定は困難であった。

細胞表面には帯電した高分子の層が存在するため、細胞は固体粒子ではなく、“柔らかい” 粒子と見なす必要がある。このため、細胞では、ゼータ電位の概念の意味を失う。いずれにせよ図 1 より、生理的な条件下では、*S. pombe* の表面は、やや負に帯電しているが、その電気二重層は十分に遮蔽されていると考えられる。

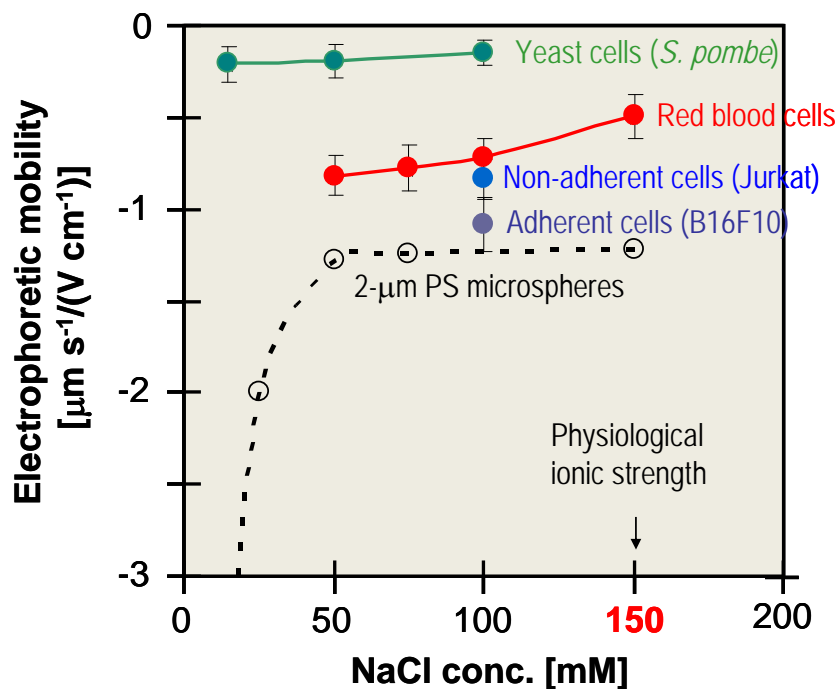


図 1 酵母菌体、赤血球、浮遊性細胞、接着性細胞、ポリスチレン球の電気泳動度に対する分散媒体中の NaCl 濃度の影響

4.2 酵母菌体・基板間の接着力のAFM測定

まず、直径3~10 μm 程度のコロイド球をAFMカンチレバーの先端に接着させた「コロイドプローブ」を用いて、コロイド球-酵母菌体間の相互作用力のAFM測定を試みた。しかし、直径2 μm 、長さ7 μm 程度の円柱状の *S. pombe* は、コロイドプローブで用いられるコロイド球のサイズとほぼ同じか小さいため、*S. pombe* の真上にコロイド球を持ってきたのちフォースカーブを測定することは、技術的に困難であった。

そのため、単一菌体をAFMカンチレバーの先端に接着させた「細胞プローブ」を作製し、酵母 *S. pombe* の1菌体とガラス平板との相互作用力のAFM測定を行った。その結果を、図2に示す。表面間の接近時では、近距離領域において菌体を圧縮したことに伴う斥力が観測されたが、脱離時では弱い付着力が観測された。

しかしながら、フォースカーブの取得と解釈には、多くの課題が浮かび上がった。フォースカーブ取得時の困難の原因は、菌体がカンチレバーから外れてしまうことが多かったことにある。2章でも述べたように、酵母のような単細胞真核生物は、特殊な接着装置を具備しないため、純粋培養の条件下では、接着対象の物質の材質に依らず弱い接着しか示さないと考えられる。一方、フォースカーブ解釈時の困難の原因は、酵母のライフサイクルが複雑であることによる。酵母には無性と有性の繁殖サイクルがあり、酵母菌体の懸濁液には種々の状態の菌体が混在しているため、単一菌体レベルのAFM測定では、数多くのフォースカーブを取得する必要があるが、これが容易ではないことは前述の通りである。

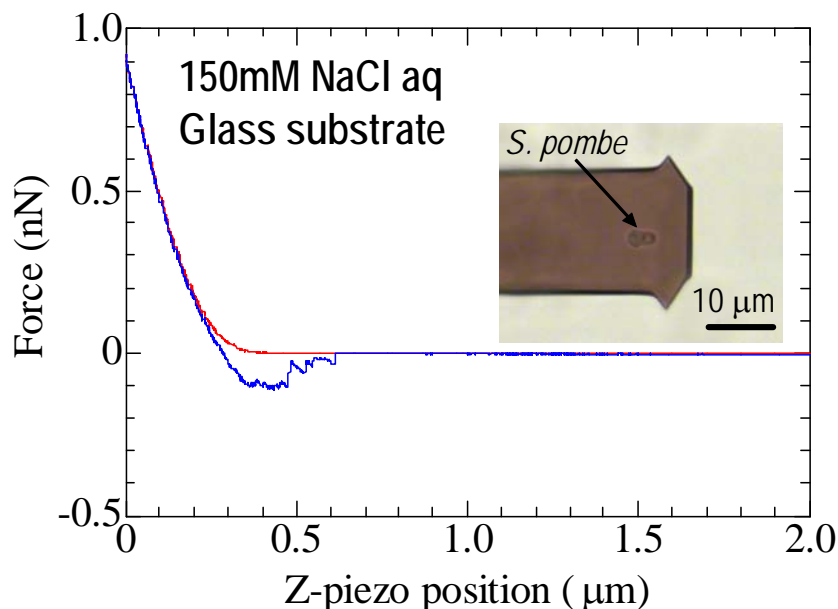


図2 150mM NaCl 水溶液中での酵母 *S. pombe* の1菌体とガラス基板との間の相互作用力曲線。挿入図は、短冊形カンチレバーの先端に固定された酵母 *S. pombe* の1菌体の光学顕微鏡像。

4.3 酵母菌体のナノ粒子への暴露

粒子径 51 nm のシリカ粒子を懸濁した YE 培地中で、*S. pombe* を培養した。1 日以内では、*S. pombe* の増殖率に有意の変化は観測されなかった。そのときの *S. pombe* の SEM 写真を、図 1 に示す。粒子暴露後でも、暴露前の *S. pombe* の形態がほぼ保たれていた。無修飾シリカ粒子のゼータ電位はマイナス数十 mV、*S. pombe* の表面電荷はほぼゼロ（図 1 参照）であったため、このシリカ粒子は *S. pombe* の表面に付着している可能性がある。シリカ粒子は蛍光性であるため、CLSM による直接観察を行った。しかし、*S. pombe* が自家蛍光を発し、その蛍光波長が用いた蛍光シリカ粒子の蛍光波長とほぼ同じであった。このため、蛍光シリカ粒子が *S. pombe* に付着したり取り込まれたりしたのかどうか、判断することはできなかった。

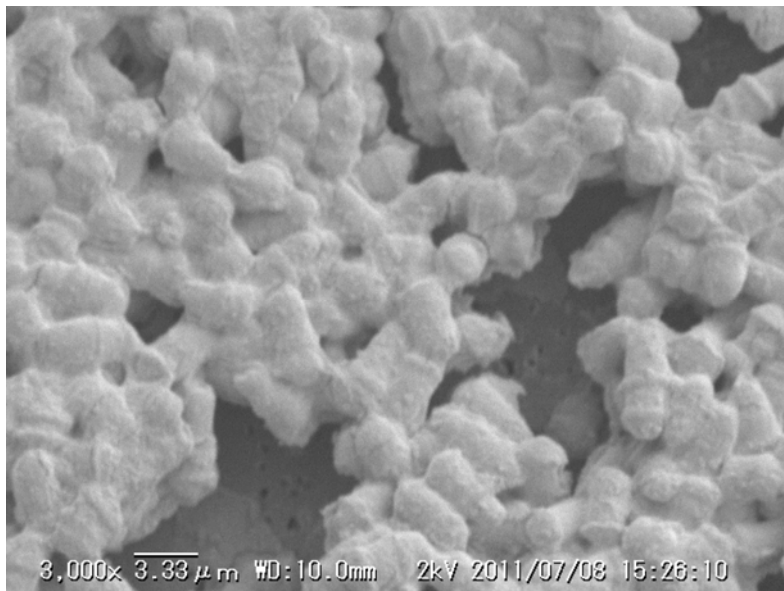


図 3 無修飾シリカ粒子（粒子径 51 nm）が暴露された酵母 *S. pombe* の SEM 画像

5. おわりに

著者らは、動物細胞（赤血球、浮遊性細胞、接着性細胞）に対するナノ粒子・マイクロとの相互作用を、種々の手法を開発・駆使して、評価してきた。ここで培った評価手法を、酵母のような単細胞真核生物に適用することにより、粒子に対する酵母の付着現象を定量的に検討し、動物細胞の接着現象との差異を明らかにすることが、本研究の目標であった。しかし、前述したように、予想外に数々の困難に直面し、それらの解決に多くの時間を費やしたため、当初の予定通りには研究が進まなかった。本助成期間終了後も、この研究を継続して、当初の目標を達成する予定である。

最後に、研究助成を頂きました粉体工学情報センターに感謝の意を表します。

3. 研究発表

●学術誌発表

培養細胞を用いたナノ粒子の毒性試験法

粉体工学会誌, **47**(8), pp.561-568 (2010)

新戸 浩幸

Adhesion of Melanoma Cells to the Surfaces of Microspheres Studied by Atomic Force Microscopy

Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 91, pp.114-121 (2012)

H. Shinto, Y. Aso, F. Tomonori, and K. Higashitani

Adhesion of Melanoma Cells to the Microsphere Surface is Reduced by Exposure to Nanoparticles

Advanced Powder Technology, in press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.appt.2012.05.004>)

H. Shinto, Y. Ohta, and T. Fukasawa

●国際会議発表

Interactions of Particles with Mammalian Cells: Adhesion, Uptake, and Cytotoxicity

International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010),
Makuhari Messe, Chiba, Japan, September 22, 2010

H. Shinto, R. Miyagawa, Y. Ohta, K. Higashitani

Interactions between Mammalian Cells and Nanoparticles: Adhesion, Uptake and Cytotoxicity

Core-to-Core 2010 World Network Seminar on Advanced Particle Science and Technology,
Kyoto, Japan, November 26, 2010

H. Shinto, T. Fukasawa

Interaction of Living Cells with Materials: What Can Colloid Engineers Do about It?

Emerging Leadership Australia-Japan Collaboration Workshop in Colloid and Materials
Science, Sendai, Japan, May 19, 2012

H Shinto, T. Fukasawa

●国内会議発表

種々の動物細胞へのナノシリカ粒子の付着・取り込みと毒性

粉体工学会 2010 年度春期研究発表会, 京都, 2010 年 5 月 26 日

新戸浩幸, 岩井祐樹, 宮坂昌宏

原子間力顕微鏡による動物細胞・マイクロ粒子表面間の接着力の直接測定

粉体工学会 第 46 回夏期シンポジウム, 京都, 2010 年 8 月 9 日

新戸浩幸, 東谷 公

ナノシリカ粒子の動物細胞への付着・取り込みと細胞毒性

粉体工学会 第 46 回夏期シンポジウム, 京都, 2010 年 8 月 10 日

深澤智典, 岩井祐樹, 宮坂昌宏, 新戸浩幸

(依頼講演) 動物細胞と粒子の相互作用に関する一考察

ライフサイエンス産学連携研究センター学術講演会 ミニシンポジウム「ナノ粒子—そのリスクとベネフィットを考える」, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス, 2010 年 10 月 4 日

新戸浩幸

シリカ粒子の動物細胞への付着・取り込みと細胞毒性

材料化学システム工学討論会, 京都大学桂キャンパス, 2010 年 12 月 4 日

新戸浩幸, 深澤智典

(依頼講演) 細胞と粒子の相互作用に関する基礎的研究

微粒子科学技術研究センター 講演会, 同志社大学 京田辺キャンパス, 2011 年 3 月 11 日

新戸浩幸

SEMによるシリカ粒子暴露後の動物細胞の形態観察

粉体工学会 2011 年度春期研究発表会, 東京, 2011 年 5 月 25 日

深澤智典, 新戸浩幸

生細胞に対するシリカナノ粒子の付着と膜破壊

第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都大学, 2011 年 9 月 7-9 日

深澤智典, 新戸浩幸

(依頼講演) **微粒子と動物細胞との相互作用： 付着、取り込み、毒性**
化学工学会第43回秋季大会，名古屋工業大学，2011年9月14日
新戸浩幸

各種顕微鏡法によるシリカ粒子暴露後の生細胞の形態観察
化学工学会第43回秋季大会，名古屋工業大学，2011年9月15日
深澤智典，新戸浩幸

ソフトマテリアルと微粒子との相互作用
粉体工学会2011年度秋期研究発表会，大阪アカデミア，2010年10月19日
新戸浩幸，深澤智典

(第6回粉体工学情報センター助成研究講演) **微粒子の生体膜への付着と膜損傷**
粉体工学会2012年度春期研究発表会，京都，2012年5月23日
新戸浩幸

赤血球をモデルとしたナノ粒子由来の細胞毒性評価
粉体工学会2012年度春期研究発表会，京都，2012年5月23日
吉末幸祐，深澤智典，新戸浩幸