

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05161

研究課題名（和文）スマートセルに対応した微生物増殖測定技術の開発

研究課題名（英文）Development of microbial growth measurement technology for smart cells

研究代表者

三宅 英雄（Miyake, Hideo）

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50362364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：微生物や動物細胞等を用いた物質生産技術が注目されており，全世界で関連市場が急速に拡大していくと予想されている．しかしながら，微生物や動物細胞を改変したスマートセルによる物質生産において大量に作製されたスマートセルの分析がボトルネックである．特にこれらスマートセルの培養は不可欠であり，個々の増殖過程を同時にモニタリングする技術が求められている．そこで本研究では微生物や細胞の代謝熱を高感度に測定することができる微小熱量測定法を改良することで振とう培養に対応した最小の微生物増殖測定用セルの開発を行った．さらにこれらセルを複数搭載したスマートセルに対応した微生物増殖測定技術を開発した．

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ゲノム編集技術などによって様々な優れた機能を有した微生物や細胞（スマートセル）が大量に創出されることが予想される．これらを分析するには培養をする必要があり，大量のサンプルを迅速に測定する技術が求められている．本研究は、これら課題を解決できる手法であり、基礎となる基盤技術を確立することに成功した．

研究成果の概要（英文）：Material production technology using microorganisms and animal cells has been attracting attention, and the related market is expected to expand rapidly worldwide. However, since microorganisms and animal cell-modified smart cells are produced in large quantities, their analysis is a bottleneck. In particular, culture of these smart cells is essential, and technology to simultaneously monitor the growth process of each individual cell is required. In this study, we developed the smallest cell for measuring microbial growth compatible with shaking culture by improving a microcalorimetry method that can measure the metabolic heat of microorganisms and animal cells with high sensitivity. Furthermore, we have developed a microbial growth measurement technique for smart cells that are equipped with multiple measurement cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：熱測定 微生物 増殖 スマートセル 培養

### 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、微生物や植物等の生物を用いた物質生産技術が注目されており、全世界で関連市場が急速に拡大していくと予想されている。これまでの技術革新により生物情報のデータ化が速く安価になり、さらに AI (人工知能) の登場で生物機能を最大限活用するための遺伝子設計が可能となった。加えてゲノム編集などの技術革新により、我々は自由にゲノムをデザインすることができるようになり、高度に機能がデザインされ機能の発現が制御された生物細胞 (スマートセル) の作製が可能となった。現在、欧米を中心にそのスマートセルを使った産業群 (スマートセルインダストリー) の市場獲得に向けた取り組みが進められており、我が国の競争力確保のためには、情報技術を利用した合理的な遺伝子設計と、大規模な遺伝子組み換えの融合による我が国独自の技術構築が必要である。生物情報のデータ化や AI といったコンピュータを活用した計算科学のスループット化はかなり進化し、加えてロボットを使った大規模な遺伝子組み換えも近い将来確立されることが予想されている。しかしながら、微生物や動物細胞を改変したスマートセルによる物質生産を考えた時、大量に作製されたスマートセルの分析がボトルネックになることが予想される。特に大量に作製されたスマートセルの培養は不可欠であり、個々の増殖過程を同時にモニタリングする技術が求められている。

我々は、これまでに嫌気性菌の増殖に伴う発熱を追跡することで、培養液を取り出すことなく、それらの増殖過程を ATP 測定に匹敵するほどの高感度で自動計測できることを示した。微生物は増殖の際に微小な熱を発生し、細胞 1 個あたり熱生成は、そのサイズにもよるが、1~100 pW 程度である。現在、我々が開発した微小熱量測定法では、小型のサーモモジュールを用いることで 1 mW の発熱を測定することは比較的容易であり、発熱をプローブとすることで微生物の増殖過程を精度よく評価することができる。さらに我々は、濁度 (OD) 測定では困難な菌体が凝集するようなサンプルや培地に不溶性物質が入ったサンプルでも、そのサーモグラムから非破壊的に微生物の増殖過程を正確に測定することができることを証明した。

### 2. 研究の目的

スマートセルに対応した微生物増殖測定技術の開発を行うためには、様々な培養条件に対応する必要がある。特にスマートセルに求められているのは、大量のサンプルを迅速に計測することが求められている。微生物増殖測定においては、OD 測定や ATP 測定が一般的であるが、OD 測定においてはガラス容器の外から一定波長の光を当てることで測定可能な装置もあるが、菌体が凝集するものや培地に不溶性物質が入っていると測定は困難である。ATP 測定においては非常に感度は良いが、培養液からサンプルを取り出す必要があり、バックグラウンドの ATP を消去する必要があるため操作が煩雑である。熱測定においては上記で説明したように、ATP 測定に匹敵する感度で自動計測でき、さらにバイオフィルムや動物細胞にも対応可能であり、様々な生物細胞に対応可能なこれまでにない生物細胞増殖測定装置になるポテンシャルを秘めている。

これまでの微小熱量測定法では、一定の温度に保たれた分厚いステンレスで密閉された容器 (サンプルユニット) に 20 個程度のセルが固定され、サンプルの資化熱をサーモモジュールによって装置内のリファレンスとの温度差から発熱速度を経時的に電気シグナルとして捉え、コンピュータに取り込んでいる。既存の装置では、セルは全て固定されているため、サンプルの大きさに制限があり、セルの数を増やすのは難しい。さらに既存のインキュベータを使うことができないため汎用性が低い。特に好気性菌で培養量が少ない時、一般的に振とう培養を行うためサンプルは動き続ける必要があり、セルが固定された既存の装置では測定することができない。これらの問題を解決するために、セルを独立させ、測定可能な最小の微生物増殖測定用セルの作製と既存のインキュベータの活用が必要である。これらが達成できれば、サンプルに微生物増殖測定用セルを固定するだけで増殖速度をモニタリングすることができ、大規模な測定やユーザが求める様々な培養条件に対応できる。そこで、本研究ではこれら技術を発展させることでスマートセルに対応した微生物増殖測定技術の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

試料セルは、フラスコなどの容器に入った試料が接する面を銅板とし、それにサーモモジュールを接着させた。そして、サーモモジュールが受けた熱を速やかに逃すためにサーモモジュールにアルミニウム製のヒートシンクを挟むことで試料セルとした (図 1)。これを振とう培養器に搭載し、断熱容器として市販のペルチェ式のインキュベータにそれらを格納した。

微生物として大腸菌 JM109 を用いた。40 mL の LB 培地が入った 100mL 容の三角フラスコに植菌し、これを試料とした。各試料は本装置で 37°C, 138rpm で振とう培養を行い、増殖に伴う発熱は試料セルで電気信号に変換され、10 分間隔で自動記録した。熱測定から得られるサーモグラムは時間あたりの mV であり、熱損

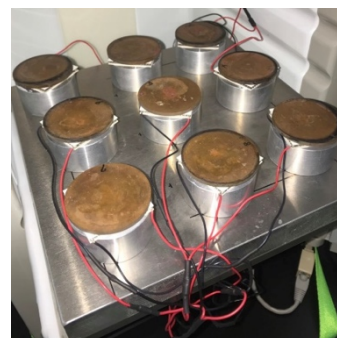


図 1 試料セル

失を補正し、積分することで微生物増殖量に相当するサーモグラムと各パラメータ（発熱量  $q$ 、総発熱量  $Q$ 、発熱ピーク時間  $t_p$ 、総発熱量の半分に達する時間  $t_{1/2}$ ）を算出した。本装置で測定したサーモグラムと OD 測定によって得られたデータを比較することで本装置の性能を調べた。

#### 4. 研究成果

本装置で測定した各時間における発熱量  $q$  と OD の値の間に高い相関（ $R^2=0.994$ ）を得た（図 2）。したがって、本装置で得られたサーモグラムは微生物増殖を反映していることが分かった。

次に異なる初菌量（ $10^{-1} \sim 10^{-4} \mu\text{L}$ ）を含む培養液を用意し、本装置で振とう培養させた時のサーモグラムと各種パラメータを解析した（図 3）。その結果、植菌量が減少すると、サーモグラムの形状は変わらないが、時間が長い方へ移動したようなサーモグラムの形状を得た。 $t_p$  と初菌量および  $t_{1/2}$  と初菌量の間で高い相関が得られた。これは、市販品の多試料等温熱量計で静置培養したときの熱測定と比べ  $t_p$  および  $t_{1/2}$  の値に違いはあるがサーモグラムの形状は同等の傾向が得られた。しかし、総発熱量  $Q$  はサンプル間でばらつきが見られた。市販品の多試料等温熱量計に比べ、本装置は測定セル間が区切られていないため、他の試料や外部からの熱の影響を受けやすいと考えられる。測定セル間に断熱材を入れて区切るなど改善の余地がある。

以上の結果より、振とう培養に対応した熱測定装置を作製することができた。さらに改良を重ねることで様々な用途に対応したスマートセルに対応した微生物増殖測定技術として確立することができるだろう。

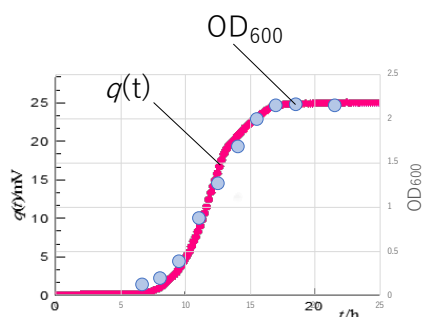


図 2 大腸菌の振とう培養における OD と発熱量の経時変化

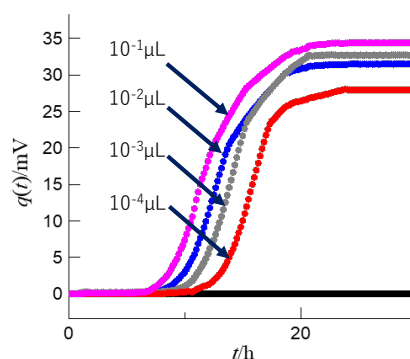


図 3 初菌量の違いによる増殖過程の評価

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 千原菜緒，柴田敏行，田中礼士，三宅英雄
2．発表標題 微生物熱測定によるフロロタンニン類の微生物増殖抑制効果の評価
3．学会等名 日本農芸化学会
4．発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1．著者名 三宅 英雄	4．発行年 2020年
2．出版社 丸善出版	5．総ページ数 363
3．書名 熱量測定・熱分析ハンドブック 第3版 5.6 食品・生物材料	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------