

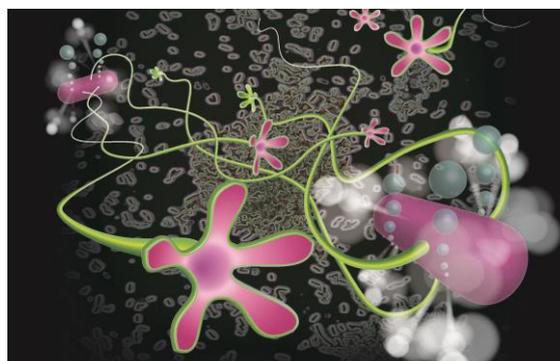
## 微生物の活動を電流で計測

### 代謝活性評価のための微生物プラットフォームを開発

大阪府立大学(学長:辰巳砂 昌弘)大学院工学研究科 博士前期課程 齊藤 真希、博士後期課程 Nguyen Dung、石木 健吾、椎木 弘准教授らの研究グループは、導電性高分子(解説1)を利用して微生物を基板に固定する方法を開発しました。本開発によって、微生物によるバイオフィーム(解説2)形成をリアルタイムで追跡することができました。また、微生物の呼吸活性を電流計測することが可能になり、通性嫌気性細菌(解説3)と好気性細菌(解説4)の好気条件下における呼吸活性がほぼ同レベルであることを初めて実証しました。本開発は、食中毒菌検査、薬剤感受性試験や抗菌性物質のスクリーニングなど、微生物の活性を利用する様々な分析・計測に利用可能な技術として期待されます。

#### ■本開発のポイント(特徴と効果)

- 1) 種々の材料に微生物を生きたまま固定可能
  - 2) 微生物の活性を単一細胞レベルで評価可能
  - 3) バイオフィームの生成過程を経時観察可能
- これらの特徴を利用して、
- 4) 微生物呼吸の定量化に成功
  - 5) 単一細胞の呼吸量の算出に成功



微生物の中には食中毒や感染症を引き起こし、人命に脅威を与える菌があります。一方、お酒やヨーグルトなどの発酵食品や污水浄化、有毒物質の分解、有用物質の生成、および微生物燃料電池などの分野で有用な菌も多く存在します。微生物脅威を抑制し、それらの有用性を高め、人類と微生物がさらに効率的に共存するためには、微生物機能の理解と評価が必要です。現在、微生物の生存率測定や生死判別は、食中毒菌検査、薬剤感受性試験や抗菌性物質のスクリーニングなど様々な分析・計測に利用されています。それらは、一般的に寒天培地やシート状培地におけるコロニー形成やマイクロプレートウェルでの比色分析によって評価されています。細胞計数、染色またはクロマトグラフィーによる評価は、顕微鏡や分析機器などの特別な装置を必要とするばかりでなく、培養は検出工程を長びかせ、操作や評価には熟練を要します。一方、電気化学方式は装置の小型化が容易であり、操作も簡単であるため、ポータブル電気化学センサを作製することができます。しかし、ほとんどの微生物は金属や金属酸化物など、電極やチップを構成する無機材料との親和性が低く、微生物の活性を計測することが困難でした。本研究グループでは、導電性高分子が微生物に親和的であることを実証し、導電性高分子に細胞を固定する方法を開発しました。細胞は高分子マトリクスに高い生存率で固定化され、生体適合性、多孔構造や機械特性などの化学的、物理的特性において微生物に適した環境の構築が可能であることを実証し、細胞活性の直接計測に成功しました。

本成果は米国化学会「*Analytical Chemistry*」オンライン版で2019年8月19日に公開されました。なお、「*Analytical Chemistry*」誌のCover artに選出されました。

## 背景

微生物の基板への固定化は、光学および電気化学的な手法によって微生物の活性を直接観察、計測することを容易にします。しかし、ほとんどの微生物は金属や金属酸化物など電極やチップを構成する無機材料との親和性が低く、生きたまま細胞を固定することが困難であるため、リアルタイムで微生物の活性を観察、計測することができませんでした。私たちは、導電性高分子であるポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン) (PEDOT) やポリピロール (PPy) の重合の際、反応溶液に微生物を共存させると、無機材料上に形成された高分子膜に細胞が固定されることを見出しました。導電性高分子は重合反応の進行とともに骨格に正電荷を生じ、反応溶液中の陰イオンと相互作用して成膜されます。得られた高分子膜は柔軟で多孔質であるため、化学的、物理的に微生物の活性に影響しない構造を有しています。したがって、無機材料上に微生物に適した環境を形成することができます。糖鎖に覆われた微生物細胞は負のゼータ電位を持つことから、高分子骨格中に生じた正電荷との相互作用によって高い生存率での固定化が期待されます。

## 研究内容と成果

PEDOT や PPy を構成するモノマー溶液に大腸菌を所定量分散させ、電解重合によって金属酸化物からなる透明ガラス電極上に高分子膜を析出しました。この電極を暗視野顕微鏡で観察したところ、ロッド状の細胞が高分子膜に分散して固定されている様子が観察されました(図1a)。細胞染色の結果から、細胞生存率はほぼ100%でした。この電極を液体培地に浸漬し、好気および嫌気条件下で培養しました。9時間後、電極を取り出して暗視野観察したところ、細胞の増殖とともに細胞の集合体が観察されました。さらに培養を行うと菌数は大幅に増加しました。細胞の集合体は大きくなり、バイオフィルムの形成が認められました。PPy 膜上での大腸菌の増殖は液体培地で得られる一般的な傾向を示すものでした。

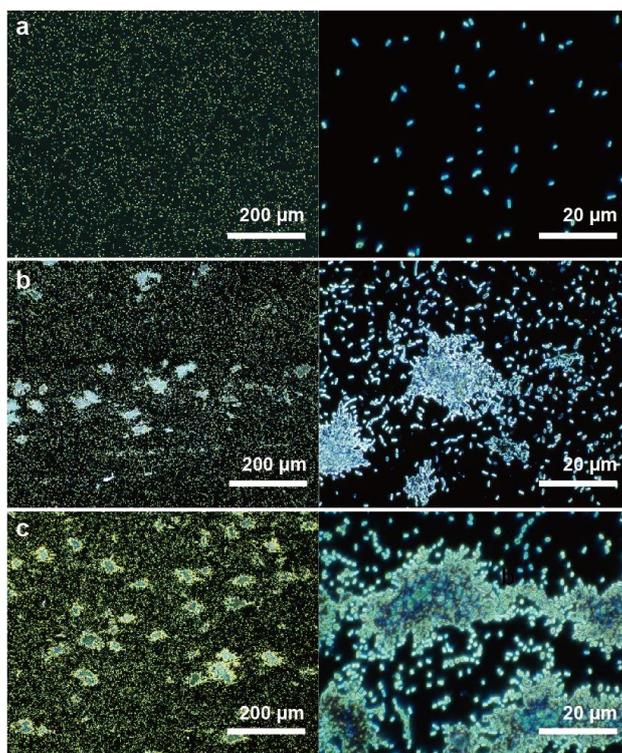


図1 大腸菌固定 PPy 膜の暗視野顕微鏡像, (a)重合直後, 液体培地で (b)9 時間, (c)18 時間培養

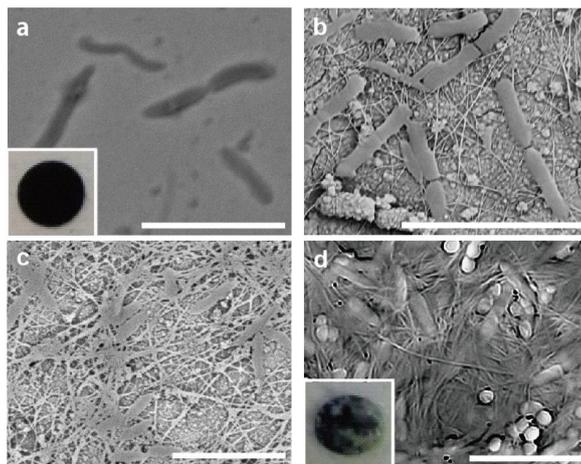


図2 酢酸菌固定PEDOT膜のSEM像, (a)重合直後, 液体培地で (b)12時間, (c)24時間, (d)42時間培養後. 挿入図はPEDOT膜の外観

PEDOTに固定した酢酸菌についても同様の検討を行いました(図2)。PEDOTは黒色の膜として電極上に得られました。電子顕微鏡(SEM)像では導電性(薄灰色)のPEDOTをマトリクスとして絶縁性(濃灰色)の細胞が観察されました。培養とともに細胞からセルロースナノファイバが分泌される様子が観られました。このナノファイバは培養とともに分泌され、PEDOTは白い膜に覆われて観察されました。この膜はナタ・デ・ココとして知られています。このナタ・デ・ココのなかにはたくさんの細胞が観察されました。細胞活性はPEDOTによって影響されることなく、ナノファイバの分泌の様子を観察することが可能になりました。分光測定の結果から、酢酸菌の増殖によるPEDOTの構造変化や変質は認められませんでした。このように、微生物の生物学的機能がPPyやPEDOTのような導電性高分子の化学構造および電気伝導率などの諸特性に影響することも、導電性高分子が微生物の活性に影響することもなく、これらの導電性高分子が微生物にとって親和的な環境を形成することが実証されました。

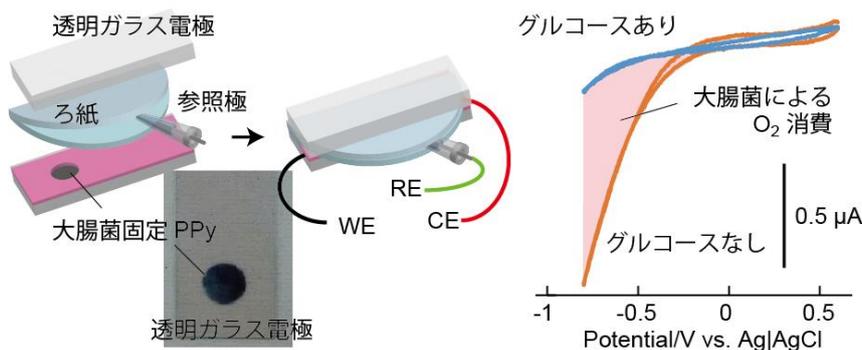
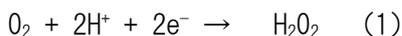
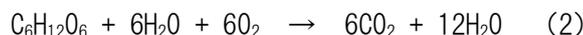


図3 薄層セルにより取得した電流-電圧曲線

大腸菌を固定した PPy 膜を透明ガラス電極に析出し、その上にろ紙をのせ、透明ガラス電極で挟み込んで薄層電気化学セルを作製しました(図3)。ろ紙に電解液としてリン酸緩衝液を浸み込ませました。このときの電圧-電流曲線には電解液に含まれる溶存酸素の還元電流のみが観察されました[式(1)]。



この電解液にグルコースを添加し、30分培養した後に得た電圧-電流曲線では、溶存酸素の還元電流の減少が観察されました。グルコースを添加しない場合や PPy に大腸菌を含まない場合、このような電流の減少は観察されませんでした。これらの結果は、PPy に固定した大腸菌が溶存酸素を消費し、グルコースを酸化する下式 (2) の反応に基づいています。



大腸菌はこの反応に基づいてエネルギーを獲得します。つまり、グルコース存在下での呼吸量を計測することで大腸菌細胞の活性を見積もることができるわけです。一方、電極反応において酸素の還元は、式 (1) に基づいて進行します。そこで、グルコースがある場合とない場合の電流-電圧曲線の差から (図3中のピンク色の領域)、酸素の還元を利用される電子量を算出することができます (約 17  $\mu\text{C}$ )。PPy には 18 万の大腸菌細胞が固定されていたので、単一細胞当たり  $1.6 \times 10^{-17}$  mol/min で酸素を消費していることとなります。この結果は、大腸菌懸濁液における酸素消費量とほぼ一致しました。さらに、他の通性嫌気性細菌や好気性細菌についても同様の検討を行ったところ、サルモネラ菌では  $1.6 \times 10^{-17}$  mol/min、緑膿菌では  $1.4 \times 10^{-17}$  mol/min と算出され、どちらのタイプの細菌も同等の好気呼吸活性を示すことが明らかになりました。

本研究では、微生物を固定した導電性高分子の形成によって、種々の細胞の呼吸量を電流応答に基づき定量することが可能となりました。これは導電性高分子が電気伝導性を持つのみならず、微生物に親和的な環境を提供することに起因するものです。

## 研究助成等

本研究は、JSPS 科学研究費補助金 (16H04137)、JSPS 特別研究員 (19J10509)、公益財団法人発酵研究所の支援により行われました。

## 用語解説

(解説 1) 導電性高分子：電気伝導性を持つ高分子の総称で、ポリアニリンやポリピロール、ポリチオフェンなどが知られている。PEDOT はポリチオフェンの誘導体であり、可溶性や透明性に優れる。

(解説 2) バイオフィーム：細胞外高分子物質の分泌などによって微生物がつくる構造体のことで、菌膜とも呼ぶ。

(解説 3) 通性嫌気性細菌：酸素の有無によって代謝を切り替える細菌のことで、酸素存在下では好気呼吸によってエネルギーとなる ATP を生成し、酸素がない場合においては発酵によりエネルギーを得る。

(解説 4) 好気性細菌：酸素に基づく代謝機構を持っており、糖のような基質を酸化してエネルギーを得る際に酸素を利用する。

## 発表論文

論文名：A Microbial Platform Based on Conducting Polymers for Evaluating Metabolic Activity

著者名：Maki Saito, Kengo Ishiki, Dung Q. Nguyen, and Hiroshi Shiigi

掲載誌：Analytical Chemistry (米国化学会) DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02350