

ナノファイバー基材を用いた極限微生物の培養技術  
の探索

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-01-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤田, 聡, 末, 信一郎, 里村, 武範 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10098/7060">http://hdl.handle.net/10098/7060</a>

## 平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 ナノファイバー基材を用いた極限微生物の培養技術の探索

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）、里村 武範（工学研究科・講師）

<b>概 要</b>	ナノファイバーを用いた培養基材を開発し、極限環境微生物の培養に成功した。超好熱菌は、通常の微生物と異なる化学システムを備えており、安定な酵素の供給源としても期待されている。しかし、これらの培養は高温で行われるため、通常のアガロースゲルを使用することはできず、固層培養による菌単離・スクリーニングが困難という課題がある。そこで本研究では、超好熱菌の長期培養に適した、高温で使用可能な足場材料として、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバー基材を用い、 <i>Sulfolobus solfataricus</i> の接着とコロニー化の挙動を調べた。その結果、酸素プラズマ処理により表面親水性を高めたポリウレタンナノファイバー上では、接着とコロニー形成がみられることを蛍光顕微鏡とSEMの観察により見出した。本結果は、極限環境微生物の培養において、合成高分子材料を使った固層培養というこれまでにない新たなアプローチの可能性をはじめて見出した。
<b>関連キーワード</b>	エレクトロスピンニング、ナノファイバー、超好熱菌、接着、足場材料

### 研究の背景および目的

超好熱菌は、100℃近くの高温で生育することのできる菌で、温泉などから単離されてきた。超好熱菌は、バクテリアや真核生物とは異なった代謝経路を有しており、極限環境、すなわち高温、高pHあるいは低pH、有機溶媒中等で安定な新規な酵素を見出されている。そのため、超好熱菌は生物学的な興味の対象としてだけでなく、産業上の応用の可能性を秘めていると期待されている。

超好熱菌の単離と培養には、一般的なバクテリアの培養に用いられる固体アガロースゲル培地ではなく、液体培地が用いられる。しかしながら、液体培地を用いてシングルコロニーを得ることは困難であるため、超好熱菌の単離は手間のかかるプロセスとなっている。固体培地が用いられない主な理由は、長期間の培養を要するためである。超好熱菌の増殖速度は遅く、高温下での培地の蒸

発を防ぎながら固体培地の体積を維持することは難しい。また、高温でアガロースゲルを調製することも難しい。こうした課題を解決すべく、固体ゲル培地に代わる培養基材が強く望まれている。しかし、培養基材の開発に向けては基材への接着やコロニー化に関しての知見が不足している。

本研究では、高温かつ低pHで活動する超好熱菌*Sulfolobus solfataricus*の培養に適した基材に関し、エレクトロスピンニング法を用いて作成したナノファイバーについて検討した。このプロセスは、基材を簡便かつ安価に作製でき、種々のポリマーにも適用でき、3次元構造も容易に作るができるため、哺乳類の細胞や医療デバイスなどの培養基材として広く使われている。極限環境微生物の培養において適用できれば、産業利用可能な新しい培養方法として期待できる。

### 研究の内容および成果

本研究においては、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバーの汎用性に着目し、超好熱菌*S. solfataricus*の培養に適用できるかどうか検討した。まず、哺乳類細胞で基材としてよく利用されているポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA; 75:25; Mw 20,000)を用いたところ、培養条件下(80℃, pH 3.0)では1週間で基材が分解されてしまった。そこで次に、ポリウレタン(PU; Mw

60,000)とポリスチレン(PS; Mw 20,000)について検討をおこなった。エレクトロスピンニングの条件をTable 1に示す。これらのポリマーは、十分な機械的強度を有しており、高温でも分解されないため、本目的には適していると考えた。ファイバーは基材の上に橋わたしするよう一方に配向させた(Scheme 1)。作成したファイバーは酸素プラズマ処理(100 W, 30 sec, <0.1 MPa)を施した。

作製したファイバーの直径を走査型電子顕微鏡(SEM)で測定した。ポリマー溶液15% PU, 20% PS, 30% PSで調製したナノファイバーの直径は、それぞれ $1.46 \pm 0.70$ ,  $1.83 \pm 0.56$  and  $3.90 \pm 1.17 \mu\text{m}$ であった(Fig. 1)。

次に作製したナノファイバー基材上で*S. solfataricus*を所定の培養条件下(80℃, pH

**Table 1**  
Polymer solutions and the condition of electrospinning.

#	Polymer	Solvent	Conc., w/v%	Voltage, kV	Infusion rate, mL/h	Collector rotation, rpm
1	PU	95% THF/ 5% DMF	15	25	0.8	1200
2	PS	THF	20	25	0.7	900
3	PS	THF	30	25	1.0	900

3.0) で培養した。培養 1 週間後の細胞の接着およびコロニー形成を、蛍光顕微鏡にて観察をおこなった。その結果、PS 基材上では細胞の接着が見られなかったが、PU 基材上では接着が見られた(Fig. 2)。

SEM の観察でも同様に、15% PU ナノファイバー基材上での接着およびコロニー形成が見られた(Fig. 3)。一方、直径が同じ程度の 20% PS ファイバー上へは接着およびコロニー形成はみられなかった。また PU ファイバーには細胞の接着は見られなかった。したがって、接着の違いは表面化学組成の違いに起因するものと考えた。動物細胞の培養では、ファイバーを培地中に浸漬した場合、

細胞接着より前にまずタンパク質が吸着し、その後吸着したタンパク質を介した細胞接着が起こることが知られているが、同様の現象が起きているものと考えられる。

以上まとめると、酸素プラズマ処理により親水性を向上させたエレクトロスピンニング法により作製した基材上では、超好熱菌の良好な接着とコロニー形成が見出された。これは、極限環境でも用いることのできる、細胞接着とコロニー形成に適した培養基材の開発に向けた第一歩となり、環境浄化や産業利用など極限環境微生物の応用につながるかと期待される。

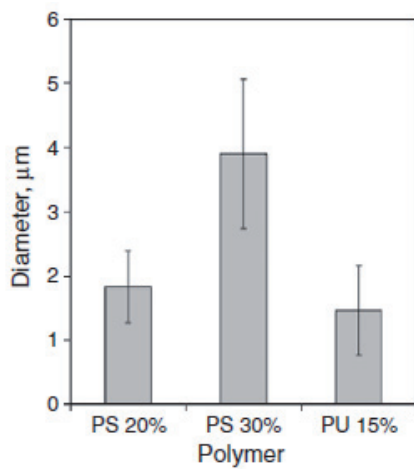


Fig. 1. Diameters of fabricated nanofibers. Means ± SD.

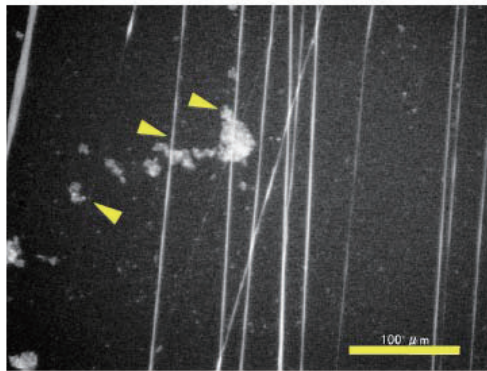
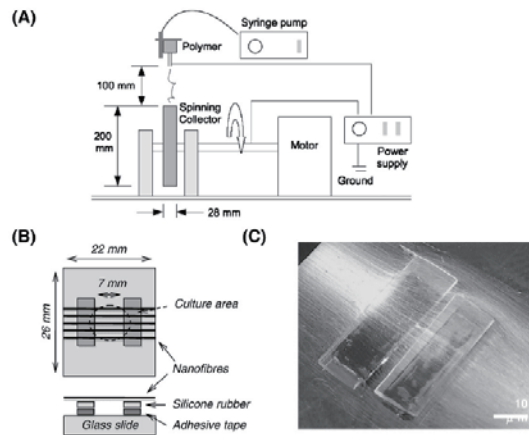


Fig. 2. Fluorescent microscopic observation of *S. solfataricus* which adhered and spread well onto the PU nanofibers after 1-week culture. Arrowheads indicate colonies. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. Fibres showed intrinsic fluorescence. Bar=100 μm.



Scheme 1 (A) Electrospinning setup. (B, C) 'Bridging' system.

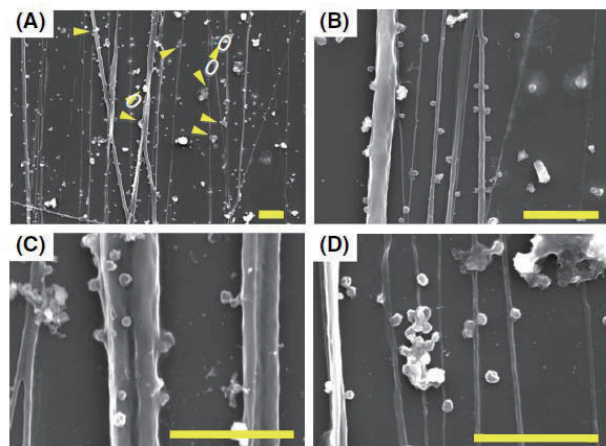


Fig. 3. SEM observation of *S. solfataricus* cultured on PU nanofibers for 1 week. (A) Low magnification image. Arrowheads indicate colonies. (B, C) High magnification images of a single cell attached on a thin (B) or thick (C) fibre. (D) High magnification image of a clump of proliferated cells. Bar=10 μm.

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

P.Hughes, S.Fujita\*, T.Satomura, S.Suye, Hydrophilic-modified polyurethane nanofibre scaffolds for culture of hyperthermophiles. *Mater. Lett.* **72**, 88-91, 2012.  
藤田聡, P.Hughes, 里村武範, 末信一朗, 超好熱

菌の固層培養を可能とする足場材料としてのナノファイバー、第 60 回高分子学会北陸支部研究発表会(金沢)、C25、2012.11.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
平成 24 年度 A-STEP (探索ステージ) 申請予定