

光で「生きたまま」微生物を高密度濃縮できるハニカム基板を開発

大阪府立大学 L A C - S Y S 研究所（副所長：床波 志保、所長：飯田 琢也）のチームは J S T の未来社会創造事業において、レーザーを照射しているにもかかわらず生体サンプルを低ダメージ（生存率 80～90%）かつ培養フリーで高密度に濃縮できる「ハニカム型光濃縮基板」の開発に成功しました。

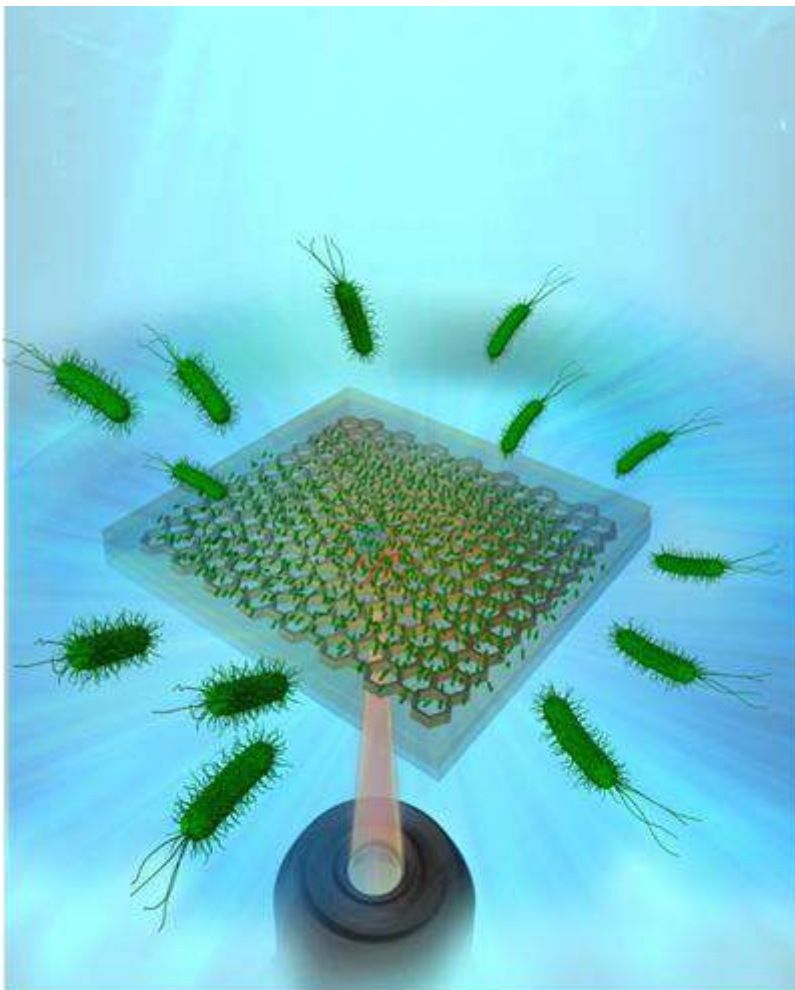


図 ハチの巣を模倣したマイクロ細孔基板に数十秒レーザー照射するだけで「大面積」「高密度」「高生存率」で有用細菌を捕捉

本研究では、自然界で最も稠密な六方最密構造を示す「ハチの巣」から着想を得て、ミクロンオーダーの細菌に適合した細孔を有するハニカム高分子膜に光発熱特性を付与した基板を開発し、多数の細菌を「生きたまま」高密度に光濃縮することで基板上の細菌総体としての代謝機能の増大とその高効率利用の実証に世界に先駆けて成功しました。この成果

はバイオマス利用技術の革新につながるものです。

### <研究の背景>

細菌を生存状態で基板上に高密度集積化することは、目的とする細菌の代謝機構の基礎的評価に加え、有用細菌の応用や機能の最大化の観点から非常に重要です。近年、有用細菌の代謝機構を利用した応用の範囲は污水处理やバイオエタノールなど有用な有機化合物の精製、電気的エネルギーの取得など多岐にわたっています。一例として、原始的な細菌であるジオバクター属やシュワネラ属などの電流発生菌は菌体内で起こる酸化還元反応に由来する電子を効率良く菌体外に排出することが知られており、微生物燃料電池（MFC）への応用が期待されています。このような電子移動機構を応用して、電流発生菌からの電子取得の高効率化に関する取り組みが数多く行われています。例えば、接触面積を増やすためにポーラスカーボンやグラフェンナノリボンなど表面積の大きな電極を用いた研究が行われてきましたが、細菌の高密度化には培養を用いるため数日以上長い時間が必要でした。

これら細菌のサイズは数百ナノメートル（nm）～数マイクロメートル（ $\mu\text{m}$ ）程度ですが、 $1\sim 10\ \mu\text{m}$ 程度の大きさの細孔を密に配列した基板を準備できれば、接触面積を最大化でき、外場で遠隔的に多数の細菌を生きのままに濃縮・トラップ（捕捉）することで機能を最大化できるはずと考えました。このような観点から、細菌捕捉用基板として自然界で最も稠密な六方最密構造を示すハニカム構造に注目しました。例えば、マクロなハニカム構造は、少ない材料で多くの蜜を収容できる蜂の巣や、表面積を増やし多くの光を感知する昆虫の複眼、さまざまな方向からの応力を分散し体内を守る亀の甲羅など、単位面積あたりの容積や強度が必要な器官で用いられており、ハニカム構造を活用した生体模倣技術の開発も試みられています。一方で、外場による細菌捕捉技術は光ピンセットのように光電磁場との相互作用を用いる方法では少数の細胞しか捕捉できず、光を金属ナノ薄膜に照射した場合に生じる光発熱効果による対流を利用した光発熱集合では大半の細菌が死滅してしまうという課題がありました。

我々は、このようなハニカム構造の優れた特性や外場による細菌捕捉技術から着想を得て、ミクロンオーダーの細菌に適合したサイズの細孔を有するハニカム高分子膜を基板上に作製し、光発熱効果における熱伝導特性をデザインすることで物理的手段により低ダメージで「生きのまま」多数の細菌をより迅速に高密度捕捉するための原理解明を試みました（図1）。

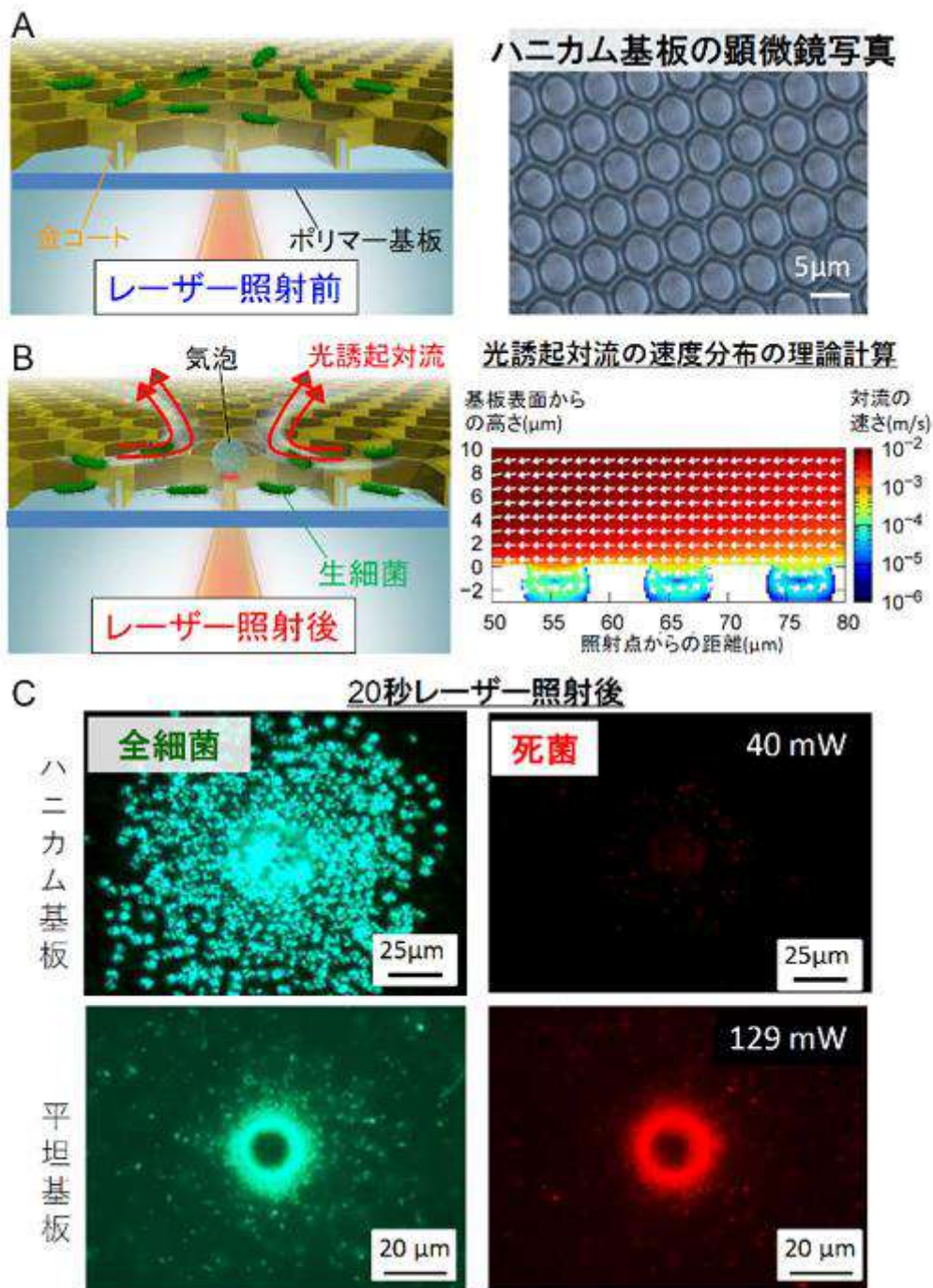


図1 ハニカム基板による生細菌の高密度光濃縮

### <研究方法>

水滴を鋳型としてポリマー膜中にハニカム状の細孔を自己組織的に形成し、その表面に金属ナノ薄膜（膜厚50 nm）を形成することで高効率な光発熱基板を開発しました。このハニカム基板の隔壁部分に赤外レーザー（波長1064 nm）照射をすることで生じた「光誘起対流」により、鞭毛を持ち走化性のある緑膿菌と走化性の無い黄色ブドウ球菌を

集積化し、生存率を評価しました。また、電流発生菌も光集積の対象としてレーザー照射点数を変えて集積し、その後にハニカム基板に電圧印加のもとで発生する電流密度の測定を行うことで機能評価しました。同じ出力のレーザーを照射した場合、従来の光発熱集合法で用いていた平坦な金ナノ薄膜をコートした基板よりもハニカム基板の方では温度の上昇が倍増することをサーモグラフィーによる測定で見いだしました（図2）。また、電磁応答理論と熱流体力学理論を融合して対流を解析し、レーザー照射点に向かうハニカム基板表面の水平対流と細孔内の渦状の対流が発生することを示すことで、生きて動く細菌でも高密度に捕捉できる実験結果を検証しました（図1 B右）。

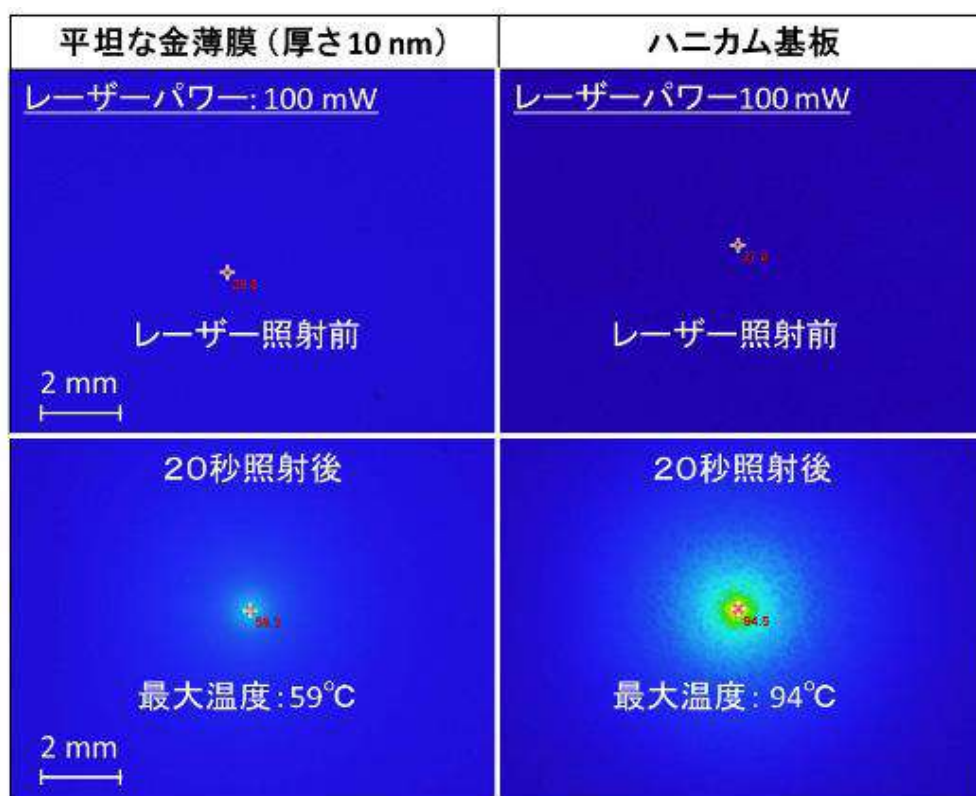


図2 ハニカム基板と従来の平坦基板の光発熱効果の比較

### <研究成果>

本研究の主な成果として、ハニカム光濃縮基板を用いてレーザー照射による細菌の捕捉を行った結果について説明します。対象とする細菌の例として、グラム陰性菌であり桿菌（棒状の細菌）である緑膿菌と、グラム陽性菌であり球菌である黄色ブドウ球菌（球状の細菌）を用いました。図1 Cの上段はハニカム高分子膜の隔壁に40 mWのレーザー出力で光発熱集積を行った場合の生細菌（緑色）と外膜損傷を受けた細菌（赤色）の蛍光イメージです。100 μmに及ぶ広範囲でハニカム高分子膜に対し細菌が密に集積され、死菌（赤色）がほとんどいないことも分かり、レーザー照射後に細菌を集積した基板を培養液

に浸漬して培養したところ細菌が増殖することも確認しています。一方、比較実験として、従来法で用いてできた平坦な金属ナノ薄膜（平坦基板）にレーザー照射した場合には70 mW以下のレーザーでは気泡も発生せず、129 mWと高出力のレーザーを照射した場合には細菌はレーザー照射点付近に集積はできますが、集積範囲も狭く生存率も約16%と大半の細菌が死滅していることが分かりました。さらに、図3では各細菌において10 mW～70 mWの範囲でレーザーパワー変化させ、捕捉した細菌の蛍光染色像から見積もった捕捉密度と生存率の関係を示していますが、緑膿菌、黄色ブドウ球菌いずれの場合も特定のレーザーパワーの範囲で80～90%の高生存率を保ちながら各ハニカム細孔に高密度に捕捉されていることも分かりました。

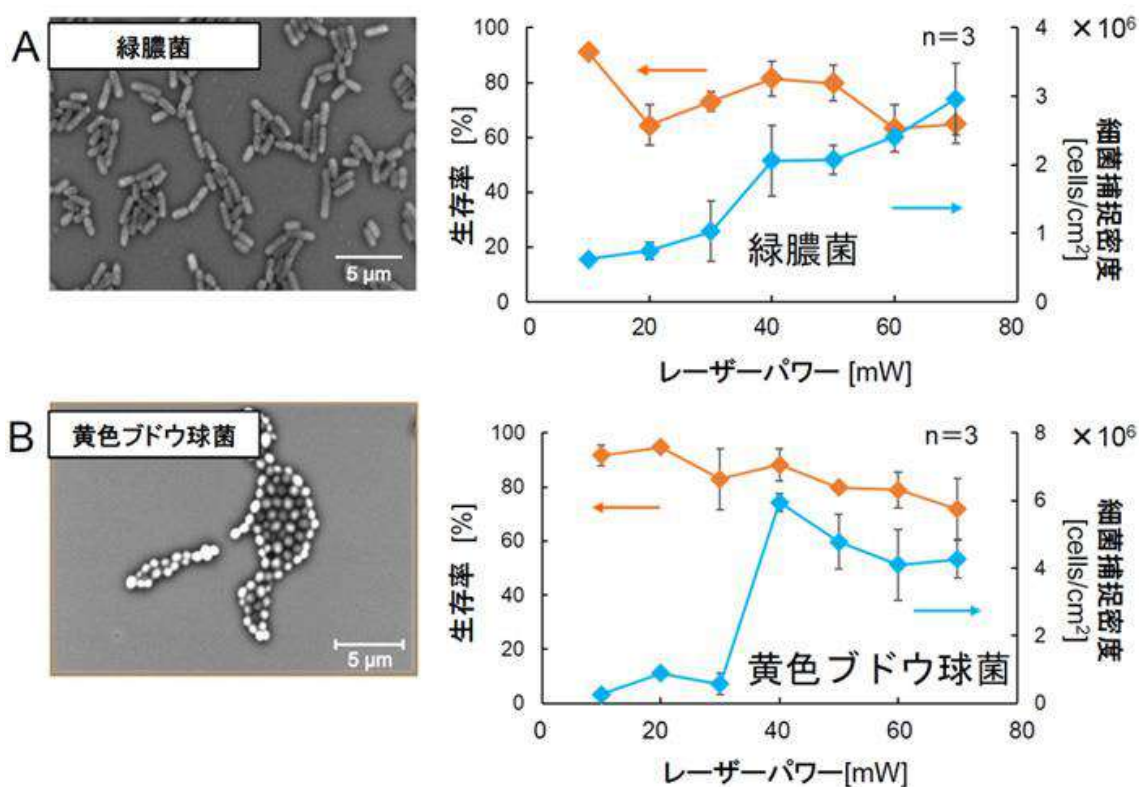


図3 複数種類の細菌の光集積による捕捉密度と生存率

高密度トラップした細菌の機能評価を行うために電流発生菌の一種であるシュワネラ菌を対象とした実験も行いました。この菌を光集積したハニカム基板を負極とし、Pt基板を正極、参照極にAg/AgClを用いた三極系においてバイアス電圧を印加しながら電流計測をした結果が図4です。シュワネラ菌は有機物を分解して電子放出を行うことが知られており、有機物として乳酸ナトリウムを添加して電子抽出をしやすい環境下（嫌気性条件下）での測定を行いました。各点20秒ずつ逐次的にレーザー照射を行ったところ、照射点の数を25点、50点、100点と増やすと、電流密度が照射点数に伴って1～2ヶ

タの増大を示すことが分かりました。ここでは細胞分裂が起こらない程度の短時間で電流計測を行っており、この電流密度の増大はレーザー照射により高密度集積されたシュワネラ菌によるものと考えられます。

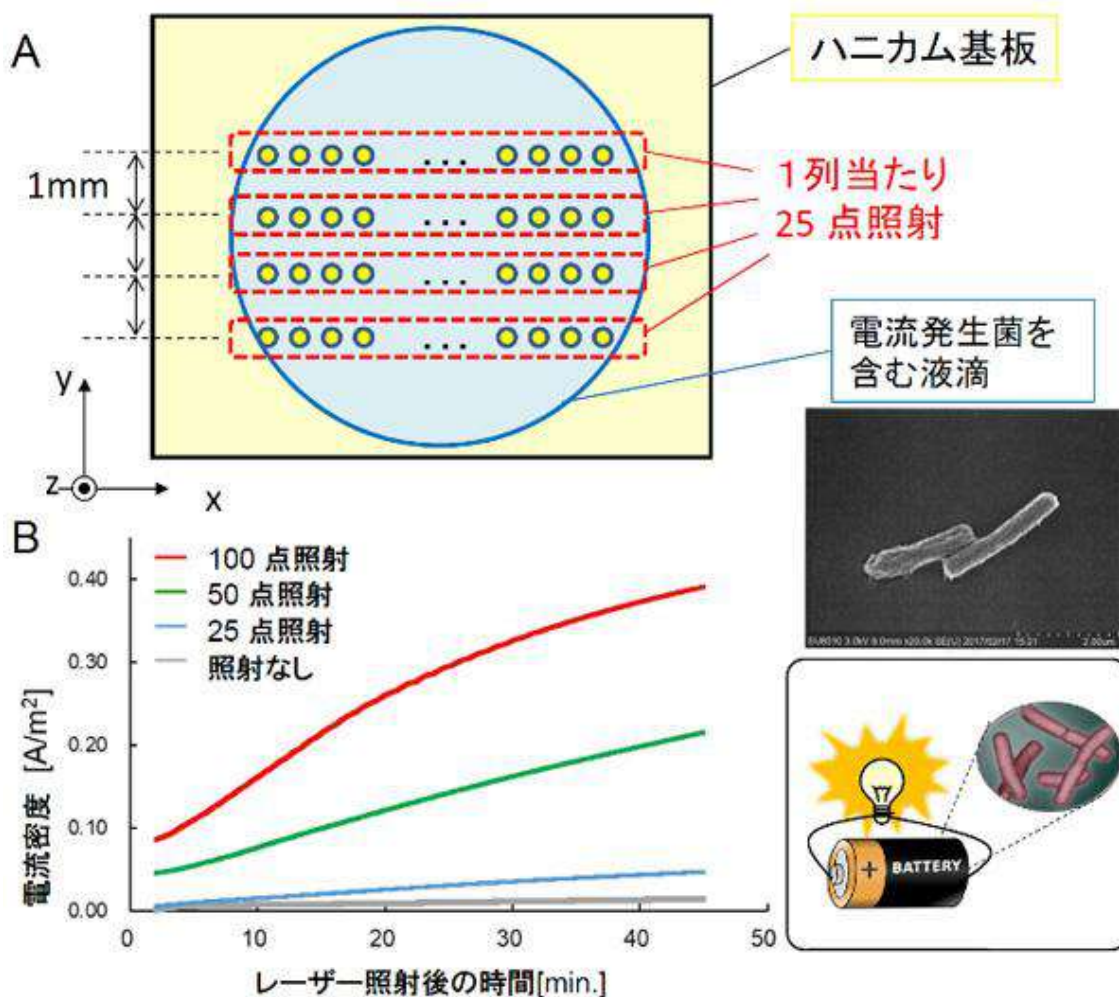


図4 逐次多点照射による電流発生菌の捕捉と電流密度増大

これらの結果は細菌が生きたまま（機能保持したまま）トラップできていることを強く支持する結果であり、細菌の機能を維持しながら高機能な微生物デバイスの開発にハニカム型光濃縮基板を利用できることを示唆する極めて重要な結果です。

#### 論文情報

タイトル Light-induced Assembly of Living Bacteria with Honeycomb Substrate

雑誌 Science Advances

DOI : [10.1126/sciadv.aaz5757](https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5757)

日文发布全文 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20200229/index.html>

文: JST 客观日本编辑部编译