

# 指向性進化を目的としたマイクロ流路細胞培養システムの開発

## Development of a microfluidic cell culture system for the adaptive laboratory evolution

精密工学専攻 14号 大竹理寛

Masahiro Otake

### 1. 緒言

現在、石油を原料として様々な化成品が作られているが、石油由来の製品は大気中のCO<sub>2</sub>を増やし、地球温暖化などの環境問題を引き起こす。そこで、物質生産過程の一部を、生物由来のプロセスに置き換えることで、カーボンニュートラルな循環型社会への転換が期待されている。大阪大学の清水らのグループは、代謝フラックスバランス解析に基づいて微生物（大腸菌等）の代謝経路と物質収支を合理的に改良することで、目的生産物の生産収率や生産量を向上させる手法を開拓してきた<sup>(1)</sup>。最近、遺伝子操作に加えて植え継ぎ培養による指向性実験室進化(Adaptive laboratory evolution; ALE)を取り入れることで、増殖に連動して化成品の原料物質を効率的に生産する大腸菌株が得られることを示した<sup>(2)</sup>。このように、代謝経路を人工的に改変した大腸菌株を植え継ぎ培養し、その選択圧（ここでは増殖速度）によって物質生産能が上昇した進化株を構築可能であることが示されてきた。しかし、従来のALEは、mlスケールの容器を用いているため、クローン化や多系列化が困難といった課題がある。

本研究では、スケールダウンと並列化に優れるマイクロ流路を利用した多系列連続培養デバイスを構築し、培養条件を変化させた複数の指向性進化実験を行うことが可能な系の確立を目指した。マイクロスケール大腸菌培養の足場として、油中液滴(W/O エマルション)から均一なサブミリサイズのアガロースのゲルマイクロドロップ(GMD)を作製し、培地灌流条件を変化させた際の大腸菌の増殖を長期間観察するシステムの構築を行った。

## 2. FF法を用いたエマルションの作製とゲルマイクロドロップの抽出

### 2.1. 実験方法

#### 2.1.1. デバイスの作製

設計したドロップレット形成デバイスの流路デザインをFig. 1(a)に示す。マイクロ流路を用いた均一な液滴形成法として、Flow Focusing法(FF法)を採用した。FF法は、分散相が連続相によって両側で挟まれ、粘性力と2つの相間の界面張力の競合により液滴形成が制御される(Fig. 1b)。設計した流路のデザインをもとに、高アスペクト比のネガティブフォトレジスト(SU-8)で高さ100 μmの流路鋳型を作製した。次に、透明シリコンゴム(PDMS)にパターンを転写した。また、マイクロ流路内壁の濡れ性を制御するために、ガラス基板にもPDMSコーティングをした。最後に、送液用の穴を開け、O<sub>2</sub>プラズマ処理でガラス基板と接着して180°Cで1時間ベーク後、実験に使用した。

#### 2.1.2. エマルションの作製

55°Cに加熱したガラスヒーター上で、外液として2%の界面活性剤入りフッ素オイル、内液として低融点アガロースと培地の混合溶液を送液し、FF法でW/Oエマルションを作製した。

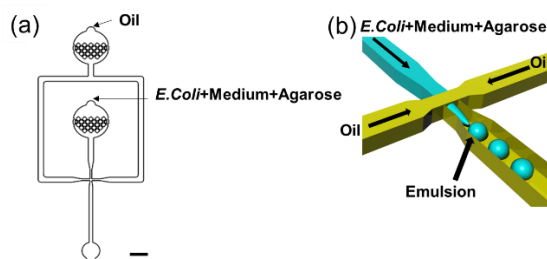


Fig. 1 (a) Design of the FF microchannel for W/O droplet generation (scale bar: 1 mm). (b) Schematic of the W/O droplet generation process.

#### 2.1.3. ゲルマイクロドロップの抽出

大腸菌培養の足場としてゲルマイクロドロップ(GMD)は、均一な油中液滴(エマルション)をテンプレートとし、その中でアガロースゲルをゲル化させ、それを取り出すことで作製した。流路からW/Oエマルションを回収した後、4°Cに冷却することでゲル化させた。その後、外環境をオイルから水に置換するために、解乳化剤を用いてオイルを除去し、GMDを水溶液中に分散させ(Fig. 2)、顕微鏡観察を行った。

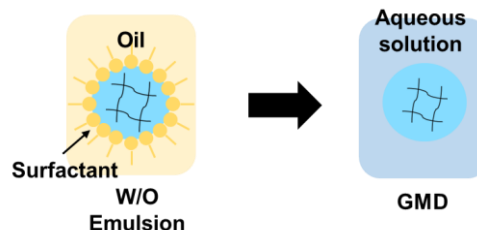


Fig. 2 Schematic of the extraction of gel micro droplet (GMD).

#### 2.1.4. GMDのアガロース濃度の検討

内液のアガロース濃度を0.5%、1.0%、および2.0%に変化させ、2.2.1章と同様にGMDを作製した。その後、顕微鏡観察を行い、GMDを効率的に作製するための最適濃度の評価を行った。

### 2.2. 実験結果

#### 2.2.1. エマルション及びGMDの観察

文献(2)で用いた3つの大腸菌株(野生株WT、代謝解析に基づいて作製した5遺伝子破壊株P、およびmlスケールの指向性進化により得られた進化株E)をそれぞれ $1 \sim 2 \times 10^5$  cell/mlの濃度で油中液滴に封入した(Fig. 3a)。続いて、この中のGMDをオイルから抽出した(Fig. 3b)。この結果、油中液滴と同程度のサイズ(直径約120 μm)を持つ大腸菌封入アガロースGMDが作製された。また、この細胞濃度では、直径120 μmの体積中に平均0.1程度の細胞が存在することになり、ポアソンの封入条件となる。すなわち、理論上、大腸

菌が存在する GMD は 99.5% の確立でシングルセルであることが担保される。

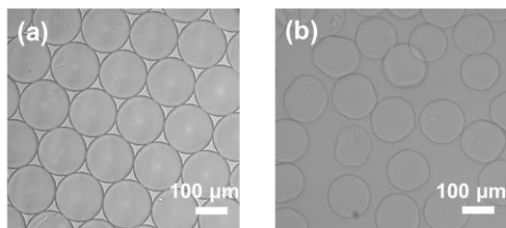


Fig. 3 Microscopic images. (a) W/O emulsion droplets. (b) Extracted GMDs containing *E. coli*.

### 2.2.2. GMD 作製におけるアガロースの濃度の検討

Fig. 4 に 0.5%, 1.0%, 2.0% のアガロース濃度で作製した GMD の顕微鏡写真を示す。アガロース濃度に依存して溶液の粘度が変わるが、同じ送液圧力の条件において GMD を作製した。アガロースの濃度が濃いほど、透過光による顕微鏡観察においてよいコントラストの像が得られた。粘度とコントラストのバランスから、1.0% の条件を採用した。

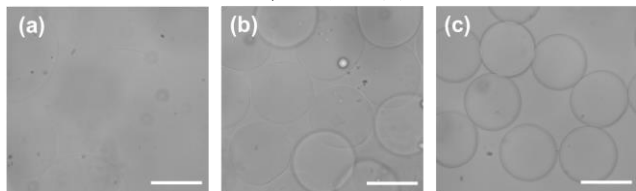


Fig. 4 Microscopic images of GMDs prepared and extracted using three different concentrations of agarose (scale bar: 100 μm). (a) 0.5%, (b) 1.0%, (c) 2.0%.

## 3. 静置培養の増殖評価系

### 3.1. 実験方法

#### 3.1.1. デバイスの作製

はじめに、GMD 内での大腸菌コロニーの増殖速度の見積もりと、顕微鏡下での見え方を確認するため、培地の灌流を行わない静置培養系を構築した。設計した装置の全体図を Fig. 5 に示す。Fig. 5(a) は GMD をトラップさせる容器の概要図であり、直径 2 mm、深さ 4 mm のマイクロウェルを作製した。

#### 3.1.2. 静置培養実験の手順

培地を保持する容器として、48 穴のマルチウェルプレートを使用した。ウェルの底に Fig. 5(a) のマイクロウェルを両面テープで接着した (Fig. 5b)。マルチウェル内に培地を 800 μL 入れ、マイクロピペットを使用してマイクロウェル内の空気を除去した後、GMD を含む液を 10 μL 滴下した。曇り対策としてミネラルオイルを 200 μL をかぶせ、さらにシールで蓋をした後、ヒーターを備えた顕微鏡に乗せて 37°C を保持し、観察を行った (Fig. 5c)。今回使用した大腸菌株は、大阪大学清水研究室において、代謝シミュレーションによりグリセロールの代謝経路がコハク酸に流れるように設計したものである。もとの野生株に比べて、副産物の経路を破壊した 5 遺伝子破壊株 (P 株) では、コハク酸の生産量が 2.8 倍になったことが確認されているが、増殖速度が大幅に低下した。E 株は、植え継培養による指向性進化により、増殖速度とコハク酸生産が上昇した株である<sup>(1)</sup>。本研究では、すでに性質が明らかになっているこの 3 種の大腸菌を用いて、マイクロ流路培養による指向性進化を目的とした培養の追試験を行った。

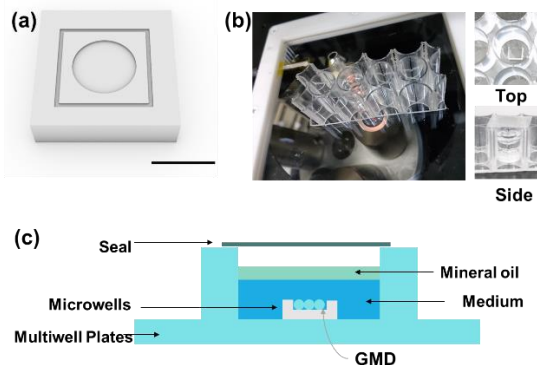


Fig. 5 Schematic diagram of the static cell culture. (a) Microwell (scale bar: 3 mm). (b) Overall view of the experimental setup. (c) Schematic of the side view of the experimental setup.

### 3.2. GMD 内培養での増殖速度の評価

2.2.1 節で述べた 3 つの大腸菌株の増殖過程の画像を示す (Fig. 6)。これらの画像から、いずれの株においても、GMD 内でのシングルセルからのコロニー形成を確認できた。また、コロニーが大きく成長するに従い、GMD から大腸菌が流出する事を確認した。画像から見積もった、大腸菌コロニーサイズの変化を Fig. 7 に示す。グラフから、E 株は WT と同程度で増殖が速く、およそ一晩でコロニーの直径が 80 μm にも達すること、また、P 株の増殖は非常に遅く、同程度のサイズになるまで 3~4 日を要することが確認された。このことから、バルク培養での増殖速度の違いが GMD 培養でも再現することが分かった。従って、マイクロ流路内培養システムとして、3 日以上培養を実現する必要があることが確認された。

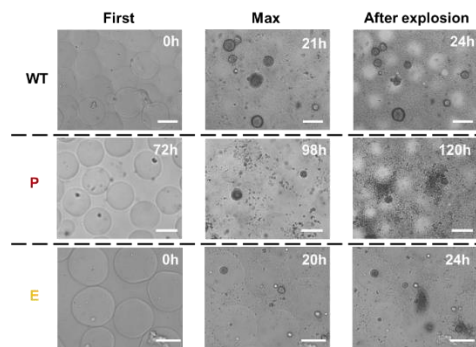


Fig. 6 Snapshots of the time-lapse microscope imaging of *E. coli* colonies grown in GMD (scale bar: 100 μm).

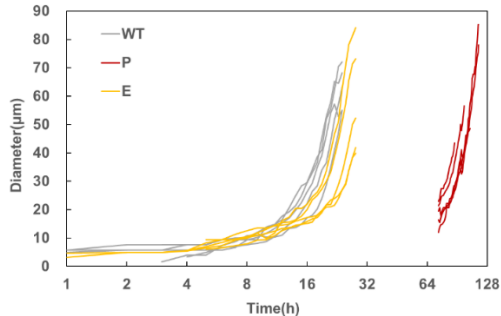


Fig. 7 Time variation of the colony diameter for three strains.

## 4. 灌流培養デバイスの評価

### 4.1. 実験方法

#### 4.1.1. デバイスの作製

静置培養では、培地中の栄養は常に消費され、老廃物が蓄積される。マイクロ流路を用い、新しい培地を連続的に送液することで、GMD 内の培地を常に更新しながら培養を行なう系の構築を行った。このようなマイクロ灌流系では、溶液中の成分の濃度を空間的・時間的に制御することも容易となる。今回設計した灌流デバイスの概要図を Fig. 8 に示す。Fig. 8(a) はデバイスの概要図であり、Fig. 8(b) はその部分的な詳細図である。加えて、GMD を培養エリアに直接注入するため、培養エリアに直接、直径 3 mm の穴を開けた。

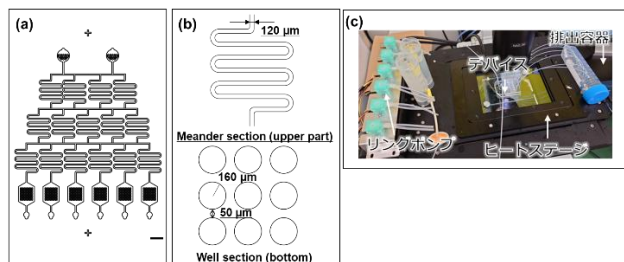


Fig. 8 Schematic diagram of the perfusion culture device. (a) Overview diagram (scale bar: 2 mm). (b) Enlarged view of each part. (c) Overview of the experimental setup.

#### 4.1.2. 灌流培養デバイスの培養実験手順

培養エリア上部に設けた導入口からマイクロピペットを用いて GMD を滴下したのちテープで蓋をした。微量送液が可能なリングポンプを用い、デバイスに接続したシリコンチューブを介して送液を行った。ヒーターを備えた顕微鏡ステージに乗せて 37°C に保持し、15 時間のタイムラプス撮影を行った (Fig. 8c)。

### 4.2. 実験結果

#### 4.2.1. 灌流デバイスの評価

培養エリア内の時間経過ごとの顕微鏡画像を Fig. 9 に示す。培養前の状態では、円形の穴の縁が黒く見えにくいこと、また、7 時間後には気泡が発生して培養エリア内に侵入した。その原因として、シリコンチューブのガス透過性が高く、リングポンプの送液時におけるチューブの変形時に空気がチューブ内に侵入し、気泡が発生したと考えられる。

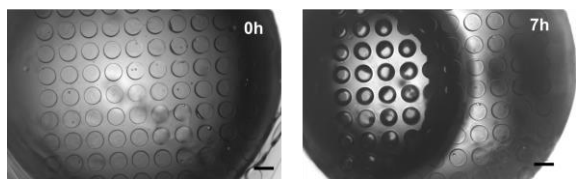


Fig. 9 Images at the culture and observation section in the perfusion device (scale bar; 200 μm).

#### 4.2.2. 気泡トラップを設けた灌流デバイスの評価

培養・観察エリアへの気泡の侵入防止を目的として設計したデバイスの概要図を Fig. 10 に示す。Fig. 10(a) はデバイスの概要図であり、Fig. 10(b) はその部分的な詳細図である。また、気泡トラップを設けたデバイスでは、ガラスと流路デバイスの接着後、気泡トラップ部を密閉させるため、縦 1 cm × 横 2 cm × 高さ 5 mm の PDMS を気泡トラップ部の上部に O<sub>2</sub> プラズマを用いて接着した。GMD は、流出口からマイクロ

ピペットを用いてデバイスに注入し、送液ではガス透過性の低いファームドチューブを用いたリングポンプを採用した。ヒーターを備えた顕微鏡ステージに乗せて 37°C に保持し、18 時間のタイムラプス撮影を行った (Fig. 10c)。この条件における、ウェル部の時間経過ごとの画像を Fig. 11 に示す。培養前の状態では、ウェル内に GMD がトラップされていることが明確に確認できた。18 時間後、気泡が侵入せず、大腸菌が増殖していることが確認された。このシステムでは、2 日間の灌流培養の観察ができることが確認された。以上の系により、安定したマイクロ流路内大腸菌培養条件を確立した。

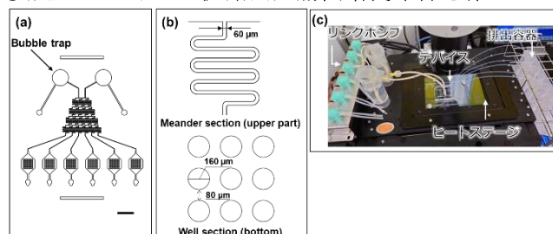


Fig. 10 Schematic diagram of the perfusion culture device with a bubble trap. (a) Overview diagram (scale bar 3 mm). (b) Enlarged view of each part. (c) Overview of the experimental setup.

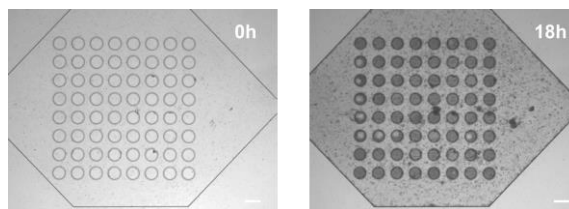


Fig. 11 Images at the culture and observation section during perfusion culture in a device with a bubble trap (scale bar: 200 μm).

## 5. 濃度勾配デバイスにおける大腸菌培養

### 5.1. コハク酸生産株の培養実験の手順

指向性進化の条件の多系列化を目的とし、基質濃度を变化させた複数の培養環境条件を並列で実現するデバイスを構築した。実際には、4.2.2 節で設計したデバイスを使用し、GMD を細胞連続培養用流路に導入した後、灌流培養を行った。上流には、基質濃度勾配を形成するための流路ネットワークを設け<sup>3)</sup>、その下流に GMD のトラップ・培養用のマイクロウェル構造を設置した。GMD 内に、3 章で使用した大腸菌 E 株を封入した。上流の流入口から GMD を直接注入したのち、リングポンプにより培地を送液した。左側の導入口 (Medium 1) にグリセロールなしの培地を、右側の導入口 (Medium 2) に制限基質であるグリセロールを含む培地を送液した (Fig. 12)。培養用流路を、ヒーターを備えた顕微鏡ステージに乗せて 37°C に保持し、18 時間のタイムラプス撮影を行った。

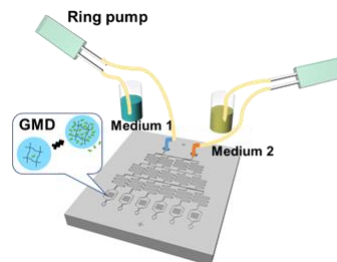


Fig. 12 Schematic of the experimental setup for GMD trap and perfusion culture device with the substrate gradient.

## 5.2. メバロン酸要求株の培養実験の手順

設計したデバイスの概要図を Fig. 13 に示す. Fig. 13(a) はデバイスの概要図である. 本実験では, 培養エリアと GMD トラップ部の設計を変更した. これまでウェル (穴) としていた部分をピラーに変えることで, GMD がトラップされる場所の面積を増やし, トラップの効率を向上させた. また, 4.2.2 節から, 培養時にウェル内に増殖した大腸菌が黒く広がっていたことから, ウェル内に培地が流れ余分な大腸菌が除去されるようにした (Fig. 13b).

先行研究において, 燃料やゴム素材として有用なイソプレノールを目的物質として<sup>(4)</sup>, その中間代謝物質であるメバロン酸取り込み能力と増殖率が指向性進化により強化された進化株が得られている<sup>(5)</sup>. 本実験では, その親株にあたる, 遺伝子操作をしたメバロン酸要求株を用いた.

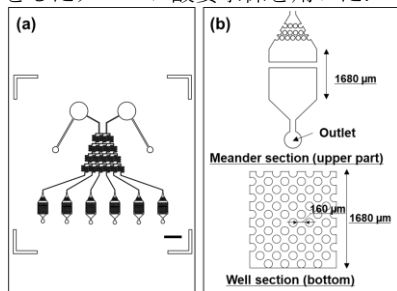


Fig.13 Schematic diagram of the concentration gradient device with micropillars for GMD trap. (a) Overview diagram (scale bar 3 mm). (b) Enlarged view of the GMD trap and culture section.

## 5.3. 実験結果

### 5.3.1. コハク酸生産株の培養

濃度勾配デバイスの細胞培養エリアに GMD を注入し, 制限基質であるグリセロールの濃度勾配を有する培地を灌流しながら培養を行った. その結果, グリセロール濃度が高い系列においてシングルセルに由来する大腸菌コロニーが 14 時間後までに成長しきり, 濃度が低い系列では増殖が抑えられた (Fig. 14). この結果は, 培地条件を変化させた多系列培養系が安定して動作したことを示している. また, 大腸菌はアガロースゲルの中で増殖するため, コロニーサイズの増加から増殖過程を定量計測することが可能である.

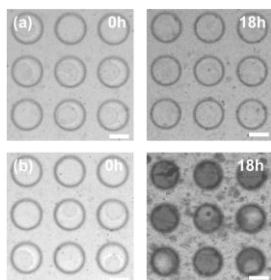


Fig.14 Microscope images of *E. coli* growing in GMDs trapped in microchambers under different glycerol concentrations (scale bar: 100 μm). (a) Low glycerol concentration. (b) High glycerol concentration.

### 5.3.2. メバロン酸要求株の培養

濃度勾配デバイスの細胞培養エリアに GMD を注入し, 制限基質であるメバロン酸の濃度勾配が異なる培地を灌流させながら 2 日間培養を行った. その結果, メバロン酸濃度が高い系列において大腸菌コロニーが成長し, 低い系列で増殖が抑えられた (Fig. 15). 5.3.1 節と同様に, 培地条件を変化さ

せた多系列培養系が安定して動作したことを示唆している.

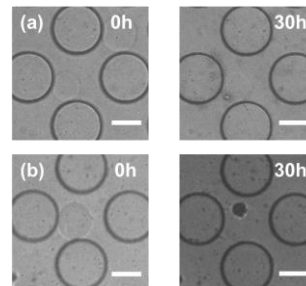


Fig.15 Microscope images of *E. coli* growing in GMDs trapped in the micropillar array under different mevalonate concentrations (scale bar: 100 μm). (a) Low mevalonate concentration. (b) High mevalonate concentration.

## 6. 結言

本報では, FF 法を用いたエマルションの作製とゲルマイクロドロップの抽出, 静置培養の作製, 及び灌流培養デバイスの開発を行った. FF 法を用いて作製したマイクロ油中液滴内でアガロースをゲル化することで, 大腸菌培養のための直径 120 μm の均一な GMD を作製した.

静置培養の増殖評価系では, GMD 内でのシングルセルからのコロニー形成を確認できた. また, コロニーが大きく成長するに従い, GMD から大腸菌が流出する事を確認した. バルク培養との増殖速度の違いを再現していることが分かった, この結果は, GMD 内培養でも従来の指向性進化系と同様の環境を提供できることを示している.

灌流培養デバイスの評価では, 流路内で条件を変化させた多系列灌流培養を行う系の基礎を確立した. それを用い, コハク酸生産株及びメバロン酸要求株を使用した培地条件を変化させた多系列培養系が安定して動作したことを確認した. この結果は, 指向性進化を行なう際, 最小の培養条件で培養可能な系の確立に貢献できる.

本研究で確立した系や知見を足場に, 細胞培養システムを発展させ, マイクロ流路内での指向性進化実験を行い, 目的生産物の高効率生産株の取得とその代謝経路の変化の解明が期待される.

## 7. 参考文献

- (1) 清水浩, 計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究, 生物工学誌, 97 巻, 第 1 号, 2019, pp. 13-20.
- (2) K. Tokuyama et al., "Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an *Escherichia coli* production strain," *Biotech. Bioeng.*, 115 (2018), pp. 1542-1551.
- (3) N. L. Jeon et al., "Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems," *Langmuir*, 16 (2000), pp. 8311-8316.
- (4) A. Kang et al., "Optimization of the IPP-bypass mevalonate pathway and fed-batch fermentation for the production of isoprenol in *Escherichia coli*," *Metabolic Eng.*, 56 (2019), pp. 85-96.
- (5) R. Kawai et al., "Acceleration of target production in co-culture by enhancing intermediate consumption through adaptive laboratory evolution", *Biotech. Bioeng.*, 119 (2022), pp. 936-945.