

課題番号 : F-21-WS-0076  
利用形態 : 機器利用  
利用課題名(日本語) : アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas mobilis* Ms1 のシングルセル観察  
Program Title (English) : Single-cell observation of ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas mobilis* Ms1  
利用者名(日本語) : 池田秀斗  
Username (English) : S. Ikeda  
所属名(日本語) : 早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科  
Affiliation (English) : Department of Life Science and Medical Bioscience, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University  
キーワード/Keyword : リソグラフィ・露光・描画装置, マイクロ流体デバイス

### 1. 概要(Summary)

現在でも実験室環境で培養に成功している微生物は少なく、99%の微生物は未培養であるとされている。培養化には単離プロセス、培養プロセスの両プロセスが重要であるが、特に培養に関わる微生物の増殖に「表現型不均一性」が関与していることが多数報告されている[1]。そこで本研究では、難培養性微生物である硝化菌に着目し、その表現型不均一性と増殖ならびに実験室環境での培養性との関連性を調査することを目指している。硝化菌を個体レベルで観察するためには、マイクロ流体デバイスを用いたシングルセル観察が欠かせない。そこで早稲田大学 NTRC の技術を用いて、カバーガラス上に円形のチャンバー(直径 65  $\mu\text{m}$ , 高さ 0.7  $\mu\text{m}$  - 0.9  $\mu\text{m}$ )を構築し、硝化菌のシングルセル観察を実施した。

### 2. 実験(Experimental)

#### 【利用した主な装置】

- ・両面マスクアライナ
- ・表面極微細構造測定装置 (テンコール)
- ・プラズマリアクター (ヤマト科学製/PR500)

#### 【実験方法】

スピコート塗布条件すなわち回転数と時間とを種々変化させながらカバーガラス上に SU-8 2000.5 を塗布した。その後、マスクアライナを用いて 105  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  でパターンを転写した。最後に SU-8 developer 45sec を 2 回, IPA を 30sec と 1min で、現像を実施した。カバーガラスの膜厚は、テンコールを用いて測定した。

### 3. 結果と考察(Results and Discussion)

高さ 0.7  $\mu\text{m}$  - 1.0  $\mu\text{m}$  の膜厚を形成することに成功した。

一部では、膜厚が 0.5  $\mu\text{m}$  や 1.2  $\mu\text{m}$  となる場合があった。作成したカバーガラスを用いて数日間にわたってシングルセル観察を実施し、硝化菌 *Nitrosomonas mobilis* Ms1 を個体レベルで観察することに成功した。

SU-8 2000.5 で構築したパターンは、長期間に及ぶ観察でも壊れることなく使用できた。一方で、一部の膜厚が不均一であるため、膜厚によって細胞の挙動に違いが生まれてしまう可能性がある。今後はより均一に膜厚を形成する手法の開発を目指す。

### 4. その他・特記事項(Others)

・参考文献 : [1] M. Ackermann, Nature Reviews Microbiology 13, (2015)

### 5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

日本生物工学会【東日本支部】第 16 回学生発表討論会 オンライン開催(2021/11/19), 池田秀斗(早大・生医).

### 6. 関連特許(Patent)

なし。