

○平成27年度奨励研究

「原子間力顕微鏡を用いた臨床微生物の形態観察とその有用性の評価」

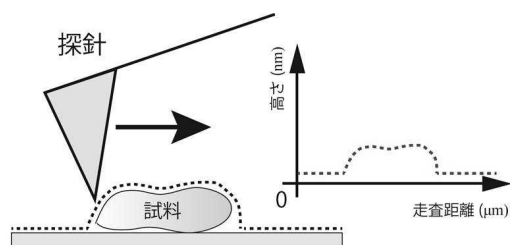
医科学センター 藤田 智也
桜井 直美
塚本 和己

1. 研究目的

微生物を含む微小な生体試料の観察には、光学顕微鏡や電子顕微鏡が一般に使用されるが、現在、染色体DNAやタンパク質を分子レベルで直接観察することを可能にした原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic Force Microscope) が生物学の分野で注目されている。AFMは極めて微小な探針を用い、試料間との原子間力を制御しながら試料表面をなぞることで微細な形状をナノメートルオーダーで測定できる装置である (右図)。

AFMは光学顕微鏡や電子顕微鏡と比較して、試料調製の簡便性やデータの解像度が優れていることから、生物学の進展の一助になると今後期待されている。しかしながら、AFMは開発からの歴史が浅く、また、生体試料の中でも微小かつ動的な微生物試料は特に測定が難しく、知見がきわめて少ない。

そこで本研究は、挑戦的かつ先導的にAFMを用いた微生物観察を行い、これまでに見出すことができなかった知見を得るとともに、臨床検査や食品検査などでの有用性についても評価する。



図：原子間力顕微鏡 (AFM) による測定

2. 研究方法

観察試料は、寒天培地上に枯草菌、黄色ブドウ球菌および大腸菌の集落 (コロニー) をそれぞれ形成させた後、グルタルアルデヒド固定、エタノール脱水行程を経て樹脂包埋し、ウルトラミクロトームを用いて100nm以下に薄切した後、切片をガラス基板上に固定したものをを用いた。

3. 研究結果

各微生物のコロニーの断面をAFMで観察すると、光学顕微鏡や電子顕微鏡では確認が困難であったバイオフィルム様の菌体外マトリックスを明瞭に確認することができ、芽胞も他とは異なった様態で観察することができた (図1)。また、樹脂包埋法による観察試料をAFMで観察し、画像の濃淡を解析することで、菌種による細胞の硬さおよび菌体外マトリックスの硬さの違いを示すことができた (図2)。

4. 考察 (結論)

AFMを用いて細菌を観察することによって、既存の顕微鏡にはない物理化学的なデータも併せて得ることができ、微生物観察および検査技術の進展の一助になる可能性を本研究で見出した。今後は、期間内で行うことができなかった硬さを指標にした細菌の分類を試み、細菌以外の微生物での観察や、試料調製を行わずに微生物試料を直接観察する技術を開発し、観察の簡便性を追求していく。

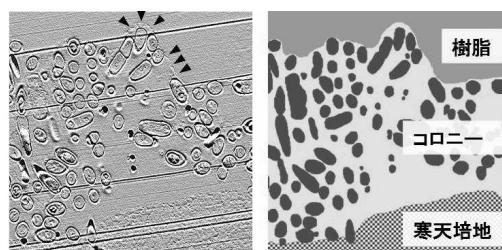


図1：AFM観察による枯草菌コロニーの断面
左：AFM像、右：AFM像のイラスト化
黒矢印は樹脂とコロニーの境界を示す

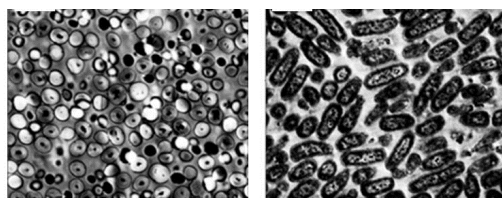


図2：AFM観察による微生物コロニーの断面
A:黄色ブドウ球菌、B:大腸菌

5. 成果の発表 (学会・論文等, 予定を含む)

塚本和己、熊田薫、桜井直美、藤田智也「コロニー内部構造観察手法の開発」

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (神戸): 2015年12月