

論文 / 著書情報
Article / Book Information

論題(和文)	遺伝子および形態解析技術による微生物系バイオ研究支援
Title(English)	
著者(和文)	高田綾子
Authors(English)	Ayako Takada
出典 / Citation	TCカレッジ TC論文
発行日 / Pub. date	2023, 3

令和4年度 TC論文

遺伝子および形態解析技術による
微生物系バイオ研究支援

東工大TCカレッジ バイオ系TCコース

高田綾子

東京工業大学 オープンファシリティセンター バイオ部門

目次

第1章 緒論	
第1節 技術職員としてのこれまでの活動実績	2
第2節 バイオ系研究支援	10
第3節 TC論文の構成	18
第2章 微生物の遺伝子解析に関わる研究支援	
第1節 微生物培養技術支援	19
第2節 遺伝子解析技術支援	25
第3章 微生物の形態観察支援	
第1節 細菌のグラム染色支援	31
第2節 酵母の走査型電子顕鏡観察支援	35
第3節 コリネ型細菌の走査型電子顕微鏡観察支援	38
第4節 微細藻類の顕微鏡観察支援	41
第4章 総括	
第1節 まとめとバイオ系研究支援で求められる技術職員像について	46
第2節 今後の技術系職員による研究支援の在り方	50
参考文献	52
謝辞	56

第1章 緒論

第1節 技術職員としてのこれまでの活動実績

筆者は1990年4月に文部技官として東京工業大学工学部生物工学科細胞工学講座に採用された。新設の生命理工学部採用される予定であったが、採用(4月1日)時点で当該年度の予算が成立しておらず、工学部での採用となった。同年6月7日に予算が成立し、生命理工学部が設置され、採用2ヵ月で配置換えを経験した。予算の成立が6月以降にずれ込んだのは1955年度(昭和30年度)以来35年ぶりのことであり、予算の成立時期としては現憲法施行後4番目に遅い成立である。このような希少な年に採用されたため記憶に残るものとなった。

所属した細胞工学講座は、前年4月に教授に着任された農学博士の永井和夫先生が主宰しており、動物細胞を用いた免疫機構の研究と、細菌を用いた染色体複製や細胞分裂の研究が大きな研究テーマであった。筆者は後者の細菌を用いた研究において研究支援を行った。その中で、「細菌のRNA結合タンパク質とRNase(リボ核酸分解酵素)の機能解析」の研究を行い、その成果を国内学会、国際学会、国際専門誌において発表し、2000年度にそれらの成果をまとめ、「DNA、RNA結合タンパク質 Hfq による大腸菌細胞複製の制御機構の研究」と題して発表し、博士(工学)の学位を取得(2001年3月東京工業大学)した。

2007年4月に技術職員の業務の全学的な見直しにより技術職員が集約され、技術部が設置された。これに伴い筆者は大学院生命理工学研究科から技術部バイオ技術センターに配置換えとなった。以降、バイオ系研究に関わる全学的な研究教育支援を行っている。2020年4月には技術部が発展的に解消され、オープンファ

シリティセンター (OFC) が設置された。これに伴いバイオ技術センターは OFC バイオ部門となった。これまでの筆者の学歴・経歴を表 1-1 にまとめた。

筆者のバイオ部門 (旧技術部バイオ技術センターを含む) での主な業務内容は以下のとおりである。

- DNA シーケンス解析サービス
- 生物試料の電子顕微鏡観察支援
- 光学顕微鏡システム管理における技術支援
- 実験動物にかかわる支援
- 研究・技術支援
- 教育支援
- その他

筆者は、2008 年度から現在まで DNA シーケンス解析の副担当として支援を行ってきた。2011 年度から 2013 年度までは実験動物にかかわる支援を担当し、2012 年 2 月には実験動物 2 級技術者の資格を取得した。2014 年度から現在まで OFC 遺伝子実験施設 (旧バイオ研究基盤支援総合センター) の光学顕微鏡システム (共焦点レーザースキャン顕微鏡、蛍光顕微鏡、ズーム顕微鏡 他) の管理と観察支援を担当している。また、これらの担当業務以外に研究室等からの依頼業務として研究教育支援を行っている。2008 年度から 2021 年度までにバイオ部門で受けた業務依頼数は 353 件であり、そのうち筆者への業務依頼は 114 件である。これまで生命理工学院、物質理工学院、理工学研究科 (2016 年 4 月学院へ移行)、総合

理工学研究科（2016年4月学院へ移行）、バイオ研究基盤支援総合センター（2021年3月廃止）、放射線総合センターおよび技術部（2020年4月OFCに改組）から依頼を受けた。主な支援業務内容を以下に示す。

- ・ 大腸菌変異株のゲノム調製
- ・ 次世代シーケンサーによる微生物ゲノム変異点解析
- ・ 酵母細胞の走査型電子顕微鏡観察
- ・ 乳酸菌の走査型電子顕微鏡観察用試料調製支援
- ・ 酵母とナノファイバーの走査型電子顕微鏡用試料調製
- ・ ペプチドゲルのSEM観察支援
- ・ Peptide Mass Fingerprint 解析
- ・ スズ含有フィルムの殺菌活性試験
- ・ 単一細胞操作分析技術の開発における微生物実験
- ・ 細菌の同定
- ・ 動物実験補助
- ・ マウス精子の凍結保存の支援
- ・ 非密封放射線同位元素取り扱い教育訓練および実習補助
- ・ 生命理工学研究科廃棄物倉庫の管理
- ・ 安全衛生週間における安全点検調査補助
- ・ 工大祭における展示支援

以上のように、研究教育支援の内容は、遺伝子配列解析、質量分析、光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、微生物実験および動物実験など広範囲・多岐にわたっている。バイオ部門での業務内容を表 1-2 にまとめた。

また、研究教育支援の他に独自に微生物に関する研究課題も遂行しており、科学研究費補助金事業（4 件）に採択されている。

1. 奨励研究（B）細菌の染色体複製の制御機構の解析
(1994 年度、180 千円)
2. 奨励研究（B）大腸菌 DNA・RNA 結合タンパク質 Hfq の酸化ストレス防御機構における役割
(2001 年度、240 千円)
3. 挑戦的萌芽研究 RNA 代謝を標的とする新規薬剤の探索
(2011～2013 年度、研究代表者：高田綾子、1,600 千円)
4. 挑戦的萌芽研究 アンサマイシン系抗生物質の Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害の解除機構の解析
(2015～2017 年度、研究代表者：高田綾子、2,990 千円)

これらの独自の研究テーマについては、これまで国際学会 14 件、国内学会 45 件の口頭発表およびポスター発表を行い、また、共同研究により下記の特許 1 件を出願している。

発明の名称：単一細胞分離用プレート

発明者：松谷 晃宏 ， 高田 綾子

出願人/特許権者： 国立大学法人東京工業大学

出願番号（国際出願番号）：特願 2010-017287

公開番号（公開出願番号）：特開 2011-152108

出願日： 2010 年 01 月 28 日

公開日（公表日）： 2011 年 08 月 11 日

組織運営では、2007 年度の技術職員集約化当初からセンター（部門）職員の取りまとめを行ってきた。2012～2014 年度には技術企画室員を兼任し、技術部全体の運営にも関わり、2015～2019 年度は技術部バイオ部門の副部門長を務め、教員である部門長とともに実質的にバイオ部門の管理・運営を担当してきた。2018 年度には「バイオ分野における教育研究支援とバイオ部門運営への貢献」で職務表彰された。OFC への組織改革後の 2020 年度からはバイオ部門長を務めている。また、2020 年度以降、大型機器の導入 2 件において仕様策定委員長を務め、遺伝子組換え実験等安全委員会委員および動物実験委員会委員など全学安全管理も担っている。また、2008 年 8 月には衛生工学衛生管理者の資格を取得している。2021 年度には「生命系教育研究支援および OFC バイオ部門運営への貢献」が評価され、東工大特別賞を授賞した。これまでの筆者の業績等を表 1-3 にまとめた。

以上のように筆者は、博士人材やわが国の研究基盤を支える技術職員の新たなロールモデルとなることを目指して、これまでのバイオ系研究における研究支援の実績を本論文にまとめた。

表 1-1 学歴・経歴

1986年3月	栃木県立足利女子高等学校普通科卒業
1990年3月	群馬大学工学部高分子化学科卒業
1990年4月	工学部生物工学科 細胞工学講座
1990年6月	生命理工学部生物工学科 細胞工学講座
1999年4月	生命理工学部生命工学科 細胞工学講座
2001年3月	学位取得 博士（工学）
2002年4月	大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻 細胞・分子工学講座 技術専門職員
2004年4月	大学院生命理工学研究科 技術専門員
2007年4月	技術部バイオ技術センター 技術専門員
2012年4月（～2014年）	技術企画室
2015年4月（～2019年）	バイオ技術センター 副センター（部門）長
2016年4月	技術部バイオ部門 技術専門員
2020年4月	オープンファシリティセンターバイオ部門 主任技術専門員・部門長
現在に至る	

表 1-2 バイオ部門での業務

<p>DNAシーケンス解析サービス (2008年度～現在)</p>	 3730xl DNA Analyzer
<p>生物試料の電子顕微鏡観察支援 (2008年度～現在)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 酵母細胞の走査型電子顕微鏡観察 ✓ 乳酸菌の走査型電子顕微鏡観察用試料調製支援 ✓ 酵母とナノファイバーの走査型電子顕微鏡用試料調製 ✓ ペプチドゲルの走査型電子顕微鏡観察支援 	 JEOL JCM-6000
<p>実験動物にかかわる支援 (2011年度～2013年度)</p> <p>※2012年2月実験動物2級技術者 資格取得</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 動物実験補助 ✓ マウス精子の凍結保存の支援 	 体外受精
<p>光学顕微鏡システム管理における技術支援 (2014年度～現在)</p>	 ElyraS1/LSM780+AiryScan
<p>研究・技術支援 (2008年度～現在)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 大腸菌変異株のゲノム調製 ✓ 次世代シーケンサーによる微生物ゲノム変異点解析 ✓ Peptide Mass Fingerprint解析 ✓ スズ含有フィルムの殺菌活性試験 ✓ 単一細胞操作分析技術の開発における微生物実験 ✓ 細菌の同定 	 ultraflex TOF/TOF
<p>教育支援 (2010年度～2012年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 非密封放射線同位元素取り扱い教育訓練および実習補助 	
<p>その他 (2008年度～2021年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 生命理工学院廃棄物倉庫の管理 ✓ 安全衛生週間における安全点検調査補助 (生命理工学院) ✓ 工大祭における展示支援 (生命理工学院) 	 工大祭

表 1-3 業績等

原著論文：22 報（第一著者 4 報、共著 18 報）

学会発表：国際学会等 14 件、国内学会等 45 件

科 研 費：奨励研究 2 件、挑戦的萌芽研究 2 件

特 許：1 件

表彰・受賞：2 件

2018 年度 技術職員に係る職務表彰

2021 年度 東工大特別賞

各種委員等：

技術部安全衛生委員会 衛生管理者（2016 年度、2017 年度）

技術部情報セキュリティ要員（2019 年度）

遺伝子組換え実験等安全委員会委員（2020 年 4 月～現在）

動物実験委員会委員（2021 年 4 月～現在）

実験・実習技術研究会実行委員会（2018 年度～2021 年度）

仕様策定委員会（委員長 2 回、委員 2 回）

学外活動：

International and Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell
Technology 1996 事務局（1996 年 9 月 1 日～4 日）

The 3rd Fujihara International Seminar "Bacterial Cell Cycle 2001" 事務局
（2001 年 9 月 18 日～20 日）

「親子で遊ぼう！女技の夏休み子どもサイエンス 2022」講師

（2022 年 8 月 10 日）

第2節 バイオ系研究支援

バイオは生物学（バイオロジーBiology）の略語で、他の語の前につくと生命や生物などの意味を表す接頭語となる。生物学（バイオロジー）と技術（テクノロジー）が結びつくとバイオテクノロジーとなり、複数の異なる細胞を使い両方の機能をもった新しい細胞を作る細胞融合技術や、除草剤の影響を受けない大豆や病気に強いトマトなどを作る遺伝子組換え技術などがその例としてあげられる。みそや醤油など微生物の働きを利用して作られる伝統的な発酵食品もバイオの技術を活用している。バイオは、発酵、農業、食品、医療、環境など幅広い分野で応用されると共に、近年では他分野と融合してバイオエレクトロニクス、バイオメカニクスなどの新たな研究領域が広がってきている。バイオ系研究支援では、遺伝子工学技術や細胞工学技術などの基盤となる生化学、微生物学、分子生物学および遺伝子工学等の知識を持ち、バイオ系実験を適切かつ安全に実行しうる能力が要求される。

本学の研究支援体制を図 1-1 に示す。本学では、生命理工学院を含む全ての学院および科学技術創成研究院、地球生命研究所など多くの部局においてバイオ系研究が行われている。本学の研究を技術的に支える OFC は 7 部門（設計製作部門、分析部門、教育支援部門、情報基盤支援部門、安全管理・放射線部門、マイクロプロセス部門、バイオ部門）、2 施設（遺伝子実験施設、動物実験施設）で構成され、84 名（2023 年 1 月現在）の技術職員が所属している。バイオ部門には 5 名の技術職員が所属し、遺伝子実験施設および動物実験施設と連携しながら、バイオ系研究支援を行っている。

バイオ系の研究を支える主な技術としては（1）微生物や細胞の培養、動物の

飼育、植物の栽培など生物材料の育成、(2) 遺伝子の解析や操作技術、(3) 形態観察、(4) 機器分析、(5) バイオインフォマティクスがあげられる。中でも、(1) 微生物培養、(2) 遺伝子の解析や操作技術、(3) 形態観察は基盤となる技術である (図 1-2)。

微生物培養は、生物種により最適な条件が異なるため、取り扱う細胞の性質や特長を理解している必要がある。研究目的に適した培養を行うためには、培地成分、細胞密度、培養温度、培養時間、pH、溶存酸素濃度、浸透圧など、培養に関わる各種因子を最適に揃える必要があり、高度な知識と技術を要すると共に、経験に依存する部分も多い。

遺伝子解析 (狭義には遺伝子の配列を決定することであるが、ここでは特に遺伝子の機能の解明や、機能改変のための遺伝子操作など、種々の分子生物学的手法を含むこととする) とは、遺伝子組換え技術により発展してきたバイオ系研究において基本となる技術である。遺伝子の配列決定については、約 20 年前まではサンガー法が主流であったが、2003 年にヒトゲノムが解読されて以降、次世代シーケンス解析技術の開発が進み、短時間で膨大な配列情報を得られるようになった。その一方、一部の遺伝情報が必要な場合には、引き続きサンガー法も利用されている。

微生物 (microorganismあるいはmicrobe) とは、肉眼では観察できない微小な生物の総称であり、真核生物の藻類・原生動物・真菌、原核生物の細菌・アーキアなどが含まれる。全ての単細胞生物が微生物として扱われるほか、一部の多細胞生物 (カビや糸状性シアノバクテリアなど) も微生物の範疇に入る。ウイルスは生物ではないが、微小という枠組みで微生物として扱われることもある。微生物

のほとんどは1 mm以下であり、おおよその大きさは、細菌が1～数 μm 、酵母などの真核微生物が数 μm ～十数 μm 、かびの菌糸の幅が数 μm 、原生動物が数100 μm 、ウイルスは0.01～0.3 μm である（図1-3）。微生物の大きさに厳密な定義はなく、微小であれば微生物に区分されるため、地球上のほとんどの生物は微生物であるとも言える。

生物を対象とした研究において、形態観察は基本的なワークである。筆者が所属していた研究室では、細菌の変異株を作製した際、まず「形は観た？」と聞かれていた。歴史上初めて顕微鏡を用いて微生物を観察したのは、「微生物学の父」と称されるアントーニ・ファン・レーウエンフック（Antonie van Leeuwenhoek）である。1674年、径1 mm程度の球形のレンズを金属板の中央にはめ込んだだけの単眼式の顕微鏡（図1-4）で、湖から採取した水の中に動く物体を発見した。彼はそれを「微小動物（animalcule、アニマルクル）」と名付けた。彼の顕微鏡は試料を載せる針がねじ式で位置を微調整できるようになっており、倍率は200倍程度あったと言われている。ちなみに、とき同じく17世紀に、イギリスのロバート・フック（Robert Hooke）も顕微鏡を使ってコルクを観察した時に、四角い小さな区分が集合している様子を見出し、これを修道院で修道女たちが暮らす小さな部屋が並んでいる様にちなんで「Cell（細胞）」と名付けている。

微生物の形態観察には、生物顕微鏡、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡などの光学顕微鏡に加えて電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などが利用される。可視光および近傍の波長域の光を利用して観察する光学顕微鏡による形態観察の場合、微生物の多くは透明度が高く、サイズが小さいため、高倍率で鮮明な画像を得るためには条件出しに時間がかかり、技術も必要とする。また、細胞を固定して観察する電子

顕微鏡による形態観察においては、試料を真空の中に入れるため、細胞の固定や脱水・乾燥などの前処理が重要となる。微生物を可能な限り生きたままの状態に近く、歪みなく、表面構造を壊さないような前処理を行う必要がある。また、微生物の種類によって細胞構造が異なるため、最適な処理条件を見出すには時間と経験を必要とする。

筆者は大腸菌、コリネ型細菌、枯草菌、放線菌などの微生物を長い間取り扱っており、得られた知識と培った高度な培養技術、遺伝子解析技術、形態観察技術を研究支援として提供し、本学の研究力向上に貢献している。

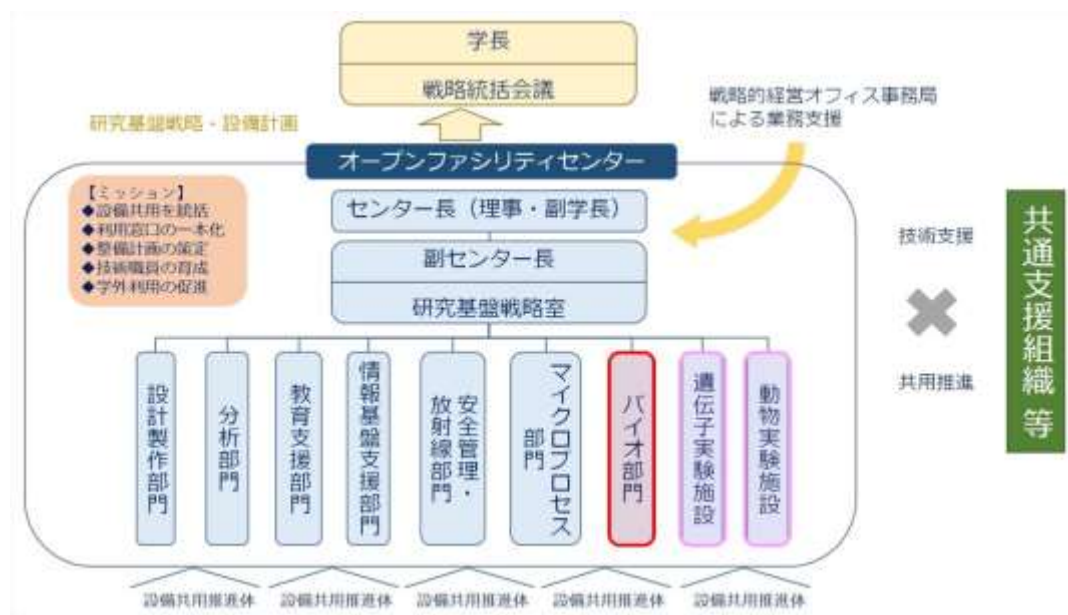


図 1-1 東京工業大学の研究支援体制

OFC は 7 部門、2 施設で構成され、84 名（2023 年 1 月現在）の技術職員が所属している。バイオ部門には 5 名の技術職員が所属し、遺伝子実験施設および動物実験施設と連携しながら、バイオ系研究を支援している。

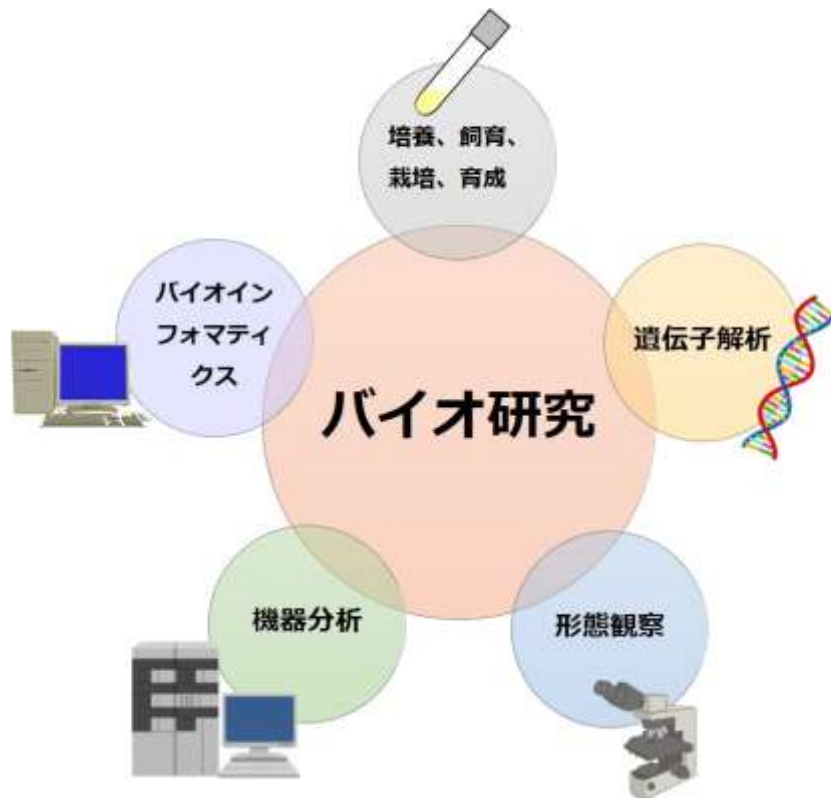


図 1-2 バイオ系研究を支える主な技術

(1) 微生物や細胞の培養、動物の飼育、植物の栽培など生物材料の育成、(2) 遺伝子の解析や操作技術、(3) 形態観察、(4) 機器分析、(5) バイオインフォマティクス。中でも、(1) 微生物培養、(2) 遺伝子の解析や操作技術、(3) 形態観察は基盤となる技術である。

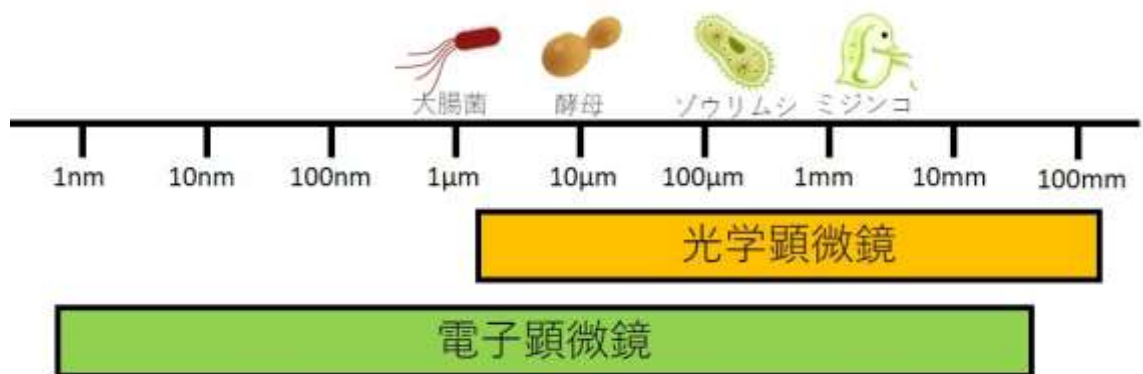


図 1-3 微生物の大きさ

微生物のほとんどは 1 mm 以下である。おおよその大きさは、細菌が 1～数 μm 、酵母などの真核微生物が数 μm ～十数 μm 、かびの菌糸の幅が数 μm 、原生動物が数 100 μm 、ウイルスは 0.01～0.3 μm である。



図 1-4 初期レーウェンフック型の顕微鏡（複製）

直径 1 mm 程度の球形のレンズを金属板の中央にはめ込んだだけの単眼式の顕微鏡で、試料を載せる針がねじ式で位置を微調整できる。倍率は 200 倍程度。ウィキペディアより引用。

第3節 TC論文の構成

本論文では、第1章において31年間の研究支援業務実績をまとめ、第2章では、「微生物に関わる研究支援」として微生物の培養技術および遺伝子解析技術を用いた研究支援内容をまとめた。第3章では、「微生物の形態観察支援」として、細菌のグラム染色および酵母やコリネ型細菌などの微生物の電子顕微鏡観察用試料調製や観察などの研究支援についてまとめ、新たに行った「微細藻類の形態観察支援」について紹介した。最後に第4章では、これらの支援経験を基に今後の研究支援の在り方についての展望を述べる。

第2章 微生物の遺伝子解析に関わる研究支援

第1節 微生物培養技術支援

従来の生化学的分析では、不均一な細胞集団をひとまとめにして抽出・分析していたため、それらの平均化された情報しか得ることができなかった。近年では、一細胞毎の個々の情報を得るための技術が求められるようになってきている。これまでもマイクロウエル構造を用いた単一細胞分離技術が開発され利用されていたが、それらは10 μm 以上の大きな真核細胞等を対象としており、細菌などの1~数 μm 程度の微小な細胞には適していなかった。そこで、半導体プロセス技術を用いて、数 μm 程度の細胞を分離・解析できる新規ツールの開発が行われた。筆者は新規ツール（マイクロ罫い）の開発過程において、微生物実験を担当した。大腸菌を用い、実験に最適な細胞濃度の決定、培養条件の検討、単一細胞の分離頻度の計測・算出などを行った。その研究成果は「High-frequency single-cell isolation of bacteria using microenclosure array with multipillar structure」（Matsutani et al., Jpn. J. Appl. Phys., 2010）として発表された（図2-1~4）。その後、1~2 μm 程度の大腸菌細胞を高頻度で単一細胞に分離できるピラー（柱状）構造を有するマイクロ罫いの開発に成功し、2011年に特許として公開された（特開2011-152108）。以降の関連研究においても、微生物を取り扱う実験を担当し、その成果を発表している。

- ・ Microfabrication of Si and GaAs by plasma etching process using bacterial cells as an etching mask material (Matsutani et al., Jpn. J. Appl. Phys., 2012)
- ・ Fabrication of silicon microchannel for transport of bacterial cells by Ar/F₂ vapor

etching process (Matsutani et al., Jpn. J. Appl. Phys., 2013)

- Single-cell isolation and size sieving for microbial analysis using microenclosure array (Matsutani et al., Sensor and Materials, 2015)
- Microchannel-free collection and single-cell isolation of yeast cells in a suspension using liquid standing wave (Matsutani et al., Jpn. J. Appl. Phys., 2016)
- Celluloid microenclosure and microlens array fabricated by SUMP method and XeF₂ vapor etching for microbial analysis (Matsutani et al., Sensor and Materials, 2018)
- Microfabrication of concave micromirror for microbial cell trapping using köhler illumination by XeF₂ vapor etching (Matsutani et al., Sensor and Materials, 2019)

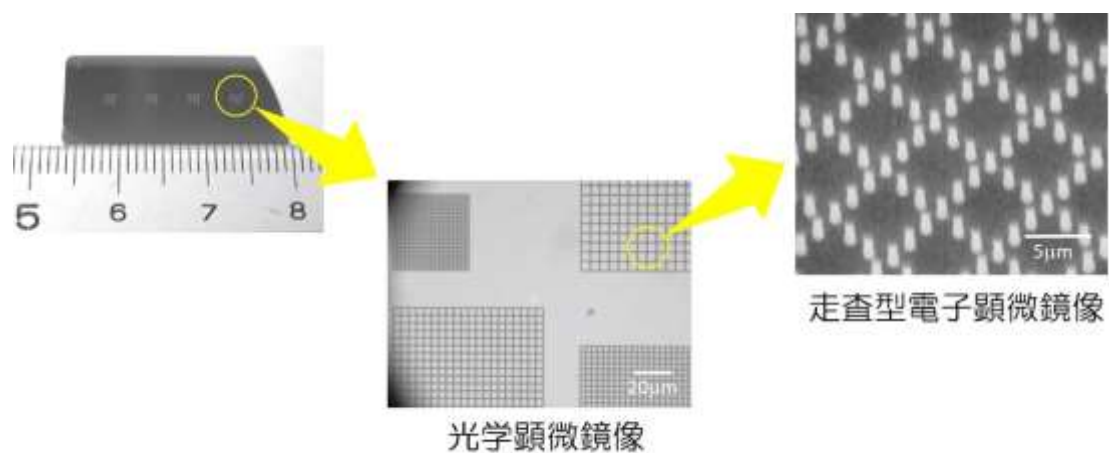


図 2-1 製作したマイクロ囲い

GaAs 基板の上に電子線レジストをスピコートし、電子線リソグラフィプロセスにより格子状のレジストパターンを製作し、このレジストパターンをマスクとして、塩素ガスを用いたドライエッチング装置（誘導結合型プラズマエッチング装置）により、円柱の 2 次元アレイ構造を作製した。その後、酸素ガスを用いたプラズマエッチングによりレジストを除去し、ピラー構造を有するマイクロ囲いを作製した。

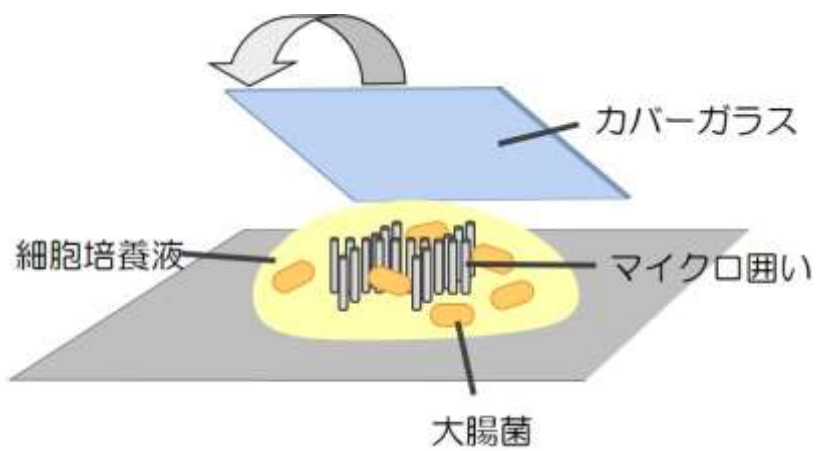


図 2-2 マイクロ罫による大腸菌分離の模式図

培養液中の大腸菌は、2次元アレイ状に配置したマイクロピラーの罫とカバーガラスにより同一平面内に分離される。

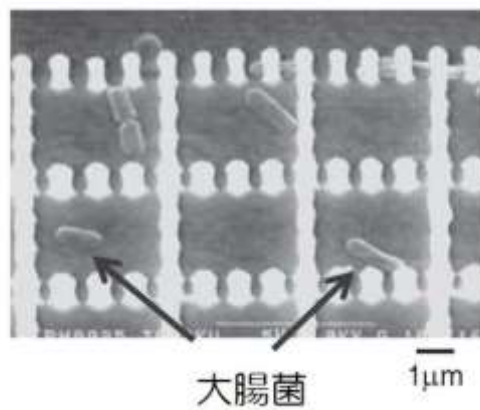


図 2-3 マイクロ罫による大腸菌の分離

一晚培養した大腸菌を生理食塩水で 1×10^5 cells/ μL に調整後、 $1 \mu\text{L}$ をマイクロ罫上に滴下し、分離の様子を走査型電子顕微鏡で観察した。単一に分離された大腸菌細胞が観察された。Jpn. J. Appl. Phys., 49.127201-1-4 (2010)より引用。

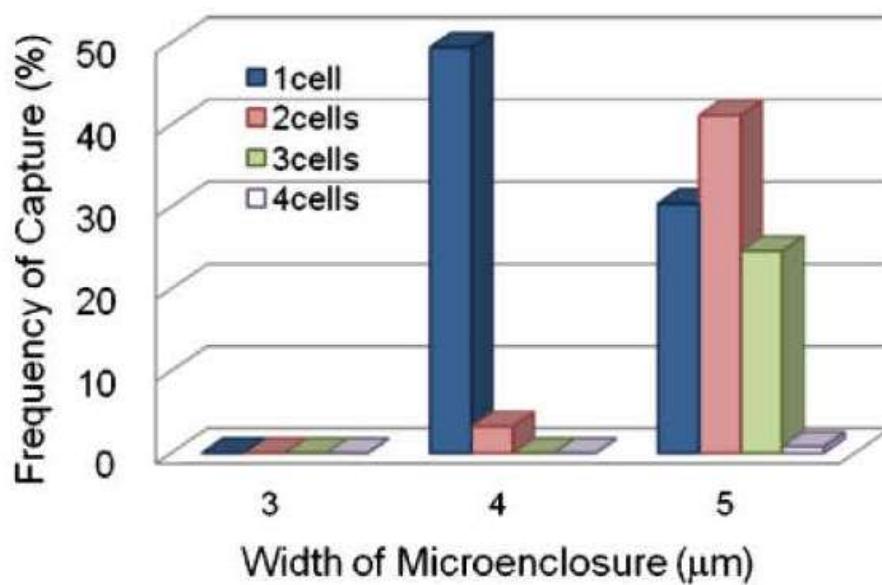


図 2-4 マイクロ罫いによる大腸菌細胞の分離頻度

一つの罫いに収納された細胞数を計数することにより、分離頻度を算出した。その結果、一辺の長さが 4 μm の罫いにおいて、約 50% の頻度で単一細胞を分離できることが示された。Jpn. J. Appl. Phys., 49.127201-1-4 (2010)より引用。

第2節 遺伝子解析技術支援

ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティングとは、分子生物学の実験で用いられる技術であり、リボ核酸（RNA）断片の混合物から特定の配列をもつ断片を検出定量して、遺伝子の発現状態を解析する方法である。細胞からRNAを抽出し、RNA断片をゲル電気泳動で分離し、ゲルからナイロン膜などのメンブレンに転写後、目的とする断片に相補的な核酸断片の標識プローブとハイブリッド形成させ、目的断片を検出する。「ノーザン（northern）」の名称は、デオキシリボ核酸（DNA）を検出するサザン（Southern）ブロッティングとの対比から名づけられた通称である。ちなみに、サザンブロッティングは開発者であるエドウィン・サザン（Sir Edwin Mellor Southern）の名からとられており、人名由来のため英文中でも大文字から書き始める。ノーザンブロッティングでは、細胞由来、または環境中から混入するRNaseによってRNAサンプルが分解されてしまうことが失敗の最大の原因となるため、使用器具を適切に滅菌したり、ジエチルピロカーボネート（DEPC）などの有毒なRNase不活化試薬を用いる必要がある。そのため当時は、RNA実験は厳重に隔離された別室で行うことなどが推奨されていた。しかしながら、筆者はどのステップでRNAが分解されるかを検討して実験手法を見直し、RNase不活化試薬などを用いることなく、通常の実験環境でノーザンブロッティングを行う簡便な方法を確立した（図2-5）。細菌を使ったRNA実験では、RNAの分解のほとんどは菌体の回収からRNA抽出までの過程で起きていることに気付き、この過程をできるだけ素早く行うプロトコルを確立させることにより、再現性よく実験結果が得られ

るようになった。ちなみに筆者は、転写後のメンブレンを床に落としても緩衝液で洗浄し、問題なくブロット像を得ることに成功した経験もある。

確立した簡便な手法を用いて、大腸菌の細胞骨格タンパク質の解析におけるノーザンブロットティングについて技術支援を行い、研究成果が「Transcriptional analysis of the *Escherichia coli mreBCD* genes responsible for morphogenesis and chromosome segregation」 (Wachi et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2006) として発表された。大腸菌の*mreBCD*オペロンの転写産物の検出をノーザンブロットティングにより行い、主要な転写産物である*mreB* mRNAと、リードスルーにより生じたマイナーな転写産物である*mreBCD* mRNAの検出に成功している (図2-6)。

DNA配列解析

DNAは生物の遺伝情報を担う分子であり、ATCGの4種類のヌクレオチドから構成されている。DNAシーケンシングとは、構成するヌクレオチドの結合順序 (塩基配列) を決定することであり、遺伝情報を解析する上で基本的な実験手段である。サンガー法は、DNA複製酵素 (DNAポリメラーゼ) を用いて末端が特定の塩基に対応するDNA断片を合成する方法である。プライマーと呼ばれるDNA複製時の起点となる短鎖DNAと、AGCTそれぞれの塩基に対応する位置で伸長を止める試薬 (ジデオキシヌクレオチド) を反応系に添加することにより塩基配列に対応したDNA断片を得ることができる。バイオ部門では、サンガー法とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を組み合わせて改良されたサイクルシーケンス法と自動読み取り装置 (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer) により、DNAシーケンス解析サービスを提供している。DNAシーケンス解析サービスでは、反応は各自で行い解析の

みを依頼する解析サービスと、反応も含めて依頼する反応+解析サービスの2通りから選択できる。解析のみを依頼する場合は、利用者が自ら反応を行う必要があるが、解析開始から120塩基付近に大きなノイズシグナルがあり、遺伝子の配列を決定できないという相談を度々受ける。そのような場合は研究支援業務依頼により、本実験手法の実地指導も行っている。

コリネ型細菌のグルタミン酸排出担体であるNCg11221の変異体の配列解析では、確立した実験手法を用いて様々な変異体のDNA配列決定を支援し、その成果は「L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCg11221 mechanosensitive channel」(Yamashita et al., Biosci. Biotech. Biochem., 2013)として発表された(図2-7)。

<簡便なRNA抽出方法>

- ↓ 培養液 (1 mL)
- ↓ 急冷 (氷水)
- ↺ 遠心 10000rpm 3min
- ↓ 上清を完全に除去
- ↓ 100 μ L Tris-EDTA Buffer (氷冷) を加える
- ↓ 素早く懸濁
- ↓ 100 μ L フェノールクロロホルムを加える
- ↓ ボルテックスで激しく混和 1min \times 3回
- ↺ 遠心 13000rpm 10min 4 $^{\circ}$ C
- ↓ 上清 (RNAサンプル)

図 2-5 ノーザンブロットィングのための簡便な RNA 抽出方法

RNA の分解のほとんどは菌体の回収から RNA 抽出までの過程で起きている。細胞の回収から RNA 抽出までを迅速に行うことで RNA の分解を極力少なくしている。

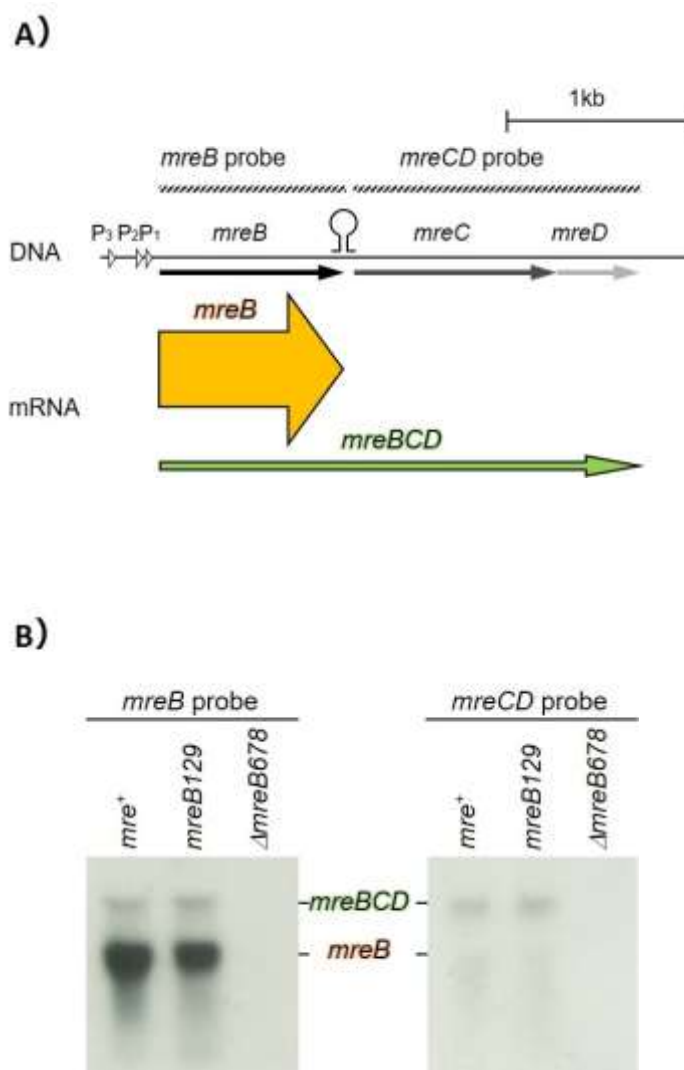
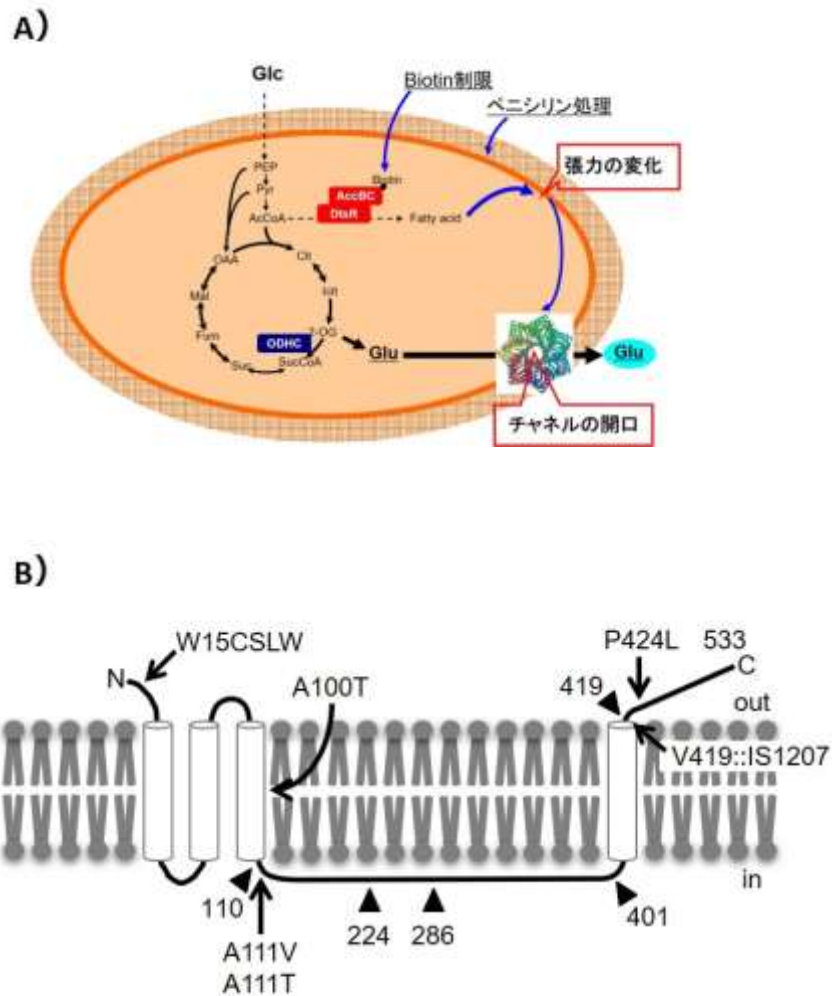


図 2-6 ノーザンブロッティング

大腸菌からRNAを抽出し、*mreB*および*mreCD*をプローブとしてノーザンブロッティングを行った。A) *mreBCD*オペロンの転写様式、B) ノーザンブロッティングの結果。主要な転写産物である*mreB* mRNAと、リードスルーにより生じたマイナーな転写産物である*mreBCD* mRNAが検出された。Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (11), 2712-2719 (2006)より引用



三角 (▼) は作製したC末ドメイン欠失部位を示す。

図 2-7 NCgl1221 の変異体の配列解析

A) グルタミン酸排出担体でNCgl1221は、細胞膜の張力の変化によりチャンネルを開口し、グルタミン酸を搬出する。B) NCgl1221の膜トポロジー構造を示す。グルタミン酸搬出に必要な領域を決定するため、様々な欠失変異体が作製された。Biosci. Biotech. Biochem., 77 (5), 1008-13 (2013)より引用。

第3章 微生物の形態観察支援

第1節 細菌のグラム染色観察支援

細菌の分類において、まず最初に行われるのがグラム染色による観察である。グラム染色はハンス・クレスチャン・ヨアキム・グラム (Hans Christian Joachim Gram) によって開発された細菌の分別染色法である (1884)。細菌はこのグラム染色により染色されるか、されないかにより、グラム陽性菌とグラム陰性菌に大別される。この染色性の違いは細胞壁の構造の違いと関連しており、グラム陽性菌はペプチドグリカン層が厚く、グラム陰性菌はペプチドグリカン層が薄く、さらに外膜を有する。この細胞壁構造の違いは、この両者が生物学的に大きく違うことを反映しており、グラム染色は現在でも細菌を分類する上で重要な手法になっている。グラム染色法の簡単なスキームを図3-1に示す。

グラム染色は二種類の色素を使って染め分ける点で、一種類の色素による単染色より複雑な染色法であり、きれいな染色像を得るには熟練した技術が必要とされる。特に火炎固定や脱色の過程は微妙な操作が必要であり、慣れないものが染色を行うとグラム染色判定を間違えることが多い。環境中から分離された細菌の同定のため研究室からの研究支援依頼業務としてグラム染色の技術指導を行ってきた。

『微生物の宣教師』でありたいとする宮道慎二氏が微生物の形態の顕微鏡画像を収録した図鑑「微生物の世界 The World of Microorganisms」(丸善)を編纂する際に、生命理工学院和地正明教授に細菌の顕微鏡写真の提供依頼があり、筆者が行った大腸菌(グラム陰性)とコリネ型細菌(グラム陽性)のグラム染色の顕微

鏡写真が採用されている（図3-2）。先述のようにきれいなグラム染色像を得るには熟練した技術が必要であり、宮道氏からは「まさに教科書レベルの染色像である」との評価を頂いた。本書は見た目から微生物の魅力を伝えようと微生物全般の顕微鏡写真を収録し、日本語と英語で解説を加えた世界的にも珍しい貴重な図鑑である。本書への掲載により、筆者も『微生物の宣教師』の一端に貢献することができた。

1. スライドガラスに、新しく分離培養した菌を含む菌液を薄く塗抹し、乾燥後、火炎中を2-3回通過させて固定する（火炎固定）。
2. クリスタルバイオレットなどの塩基性の紫色色素液で1分間程度染色する。この段階では、細胞はグラム陽性と陰性に関わらず紫色に染まる。
3. 媒染剤（ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液など）で色素液を洗い流すようにして1分間処理する。この処理で紫色色素が不溶化される。1分間水洗した後、水分を除く。
4. 95%エタノールで、手早く、色素が浮き上がってこなくなるまで脱色する。この段階でグラム陰性菌だけが脱色される。ただちに水洗し、風乾する。
5. サフラニンなどの赤色色素で1分間程度染色する（対比染色）。この処理でグラム陰性菌は赤染される。
6. 乾燥後、光学顕微鏡で観察する。グラム陽性菌は濃紫色、グラム陰性菌は赤色に染まって見える。

図3-1 グラム染色スキーム

細菌はグラム染色により染色されるか、されないかにより、グラム陽性菌とグラム陰性菌に大別される。

コリネ型細菌

大腸菌+コリネ型細菌

大腸菌

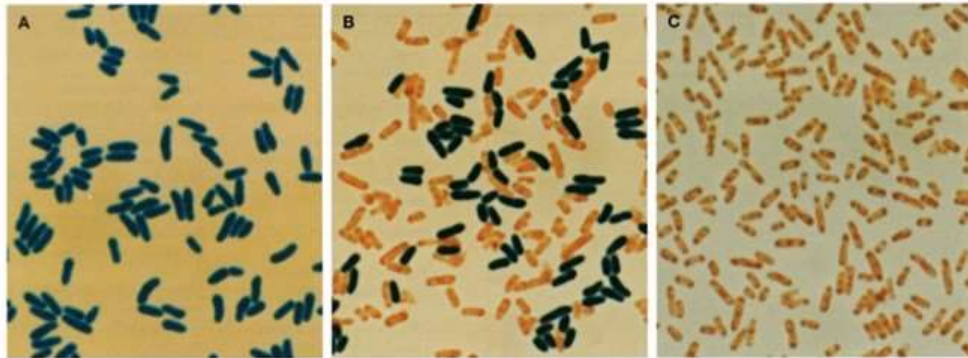


図3-2 グラム染色

大腸菌（グラム陰性）とコリネ型細菌（グラム陽性）のグラム染色の光学顕微鏡写真。「微生物の世界 The World of Microorganisms」（宮道慎二ほか編集、丸善）より引用。



第2節 酵母の走査型電子顕微鏡観察支援

Candida albicans (カンジダ・アルビカンス) は無色の不完全酵母であり、出芽で増殖し、条件によっては菌糸に近い姿(仮菌糸)をとる。カンジダ症の病原体として知られているが、仮菌糸への形態変化が病原性に関わっており、またバイオフィーム(微生物が固相表面に形成した集合体)形成の際にも、仮菌糸へ形態変化する。バイオフィーム形成時の酵母の形態に関する研究において、筆者は走査型電子顕微鏡(SEM)観察支援の依頼を受けた。これまで酵母の観察は行った経験はあるが、バイオフィームの観察は行ったことはなかったため、バイオフィームをどのように形成させるかなどバイオフィーム形成の条件検討から技術支援を行った。バイオフィームはシリコンスポンジを培地に沈めて培養することによりスポンジ表面に形成させたが、スポンジが沈まずバイオフィームが形成されなかったり、形成されたバイオフィームが前処理中にスポンジから剥がれてしまうなど、各工程で様々な条件検討が必要であった。得られた成果は「The role of Bgl2p in the transition to filamentous cells during biofilm formation by *Candida albicans*」(Chen et al., *Mycoses*, 2016) として発表された(図3-3)。

また、学術誌(*J. Gen. Appl. Microbiol.*, No.67 2021)表紙用に、出芽酵母のSEM観察を行い、画像を提供した(図3-4)。

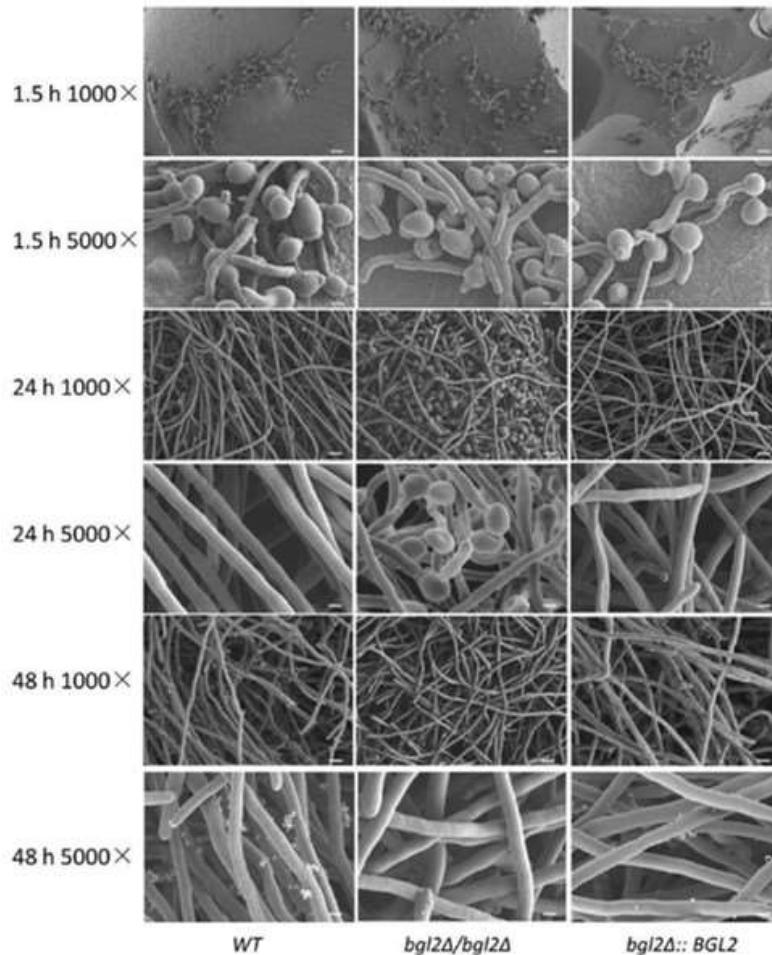
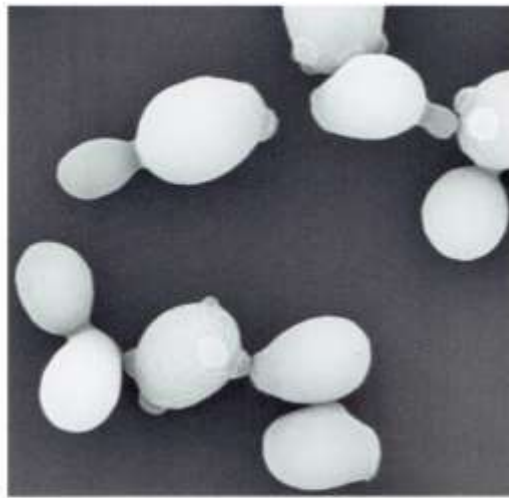


図3-3 酵母のバイオフィルムのSEM像

96穴プレートに培地と滅菌した3 mm角のシリコンスポンジを入れ、野生株および変異株を接種し、1.5時間、24時間、48時間培養後、シリコンスポンジ表面に形成されたバイオフィルムをSEM (Hitachi S-4800) を用いて観察した。*bgl2*遺伝子欠損株において、バイオフィルム形成の遅延が観察された。Mycoses, 60 (2), 96-103 (2016)より引用。



•
Corynebacterium glutamicum Micrococcin 3 protects against multiple oxidative stresses and displays thiorodan-like activity.
**
The influence of medium composition on the microbial secretory production of hydroxyalkamate oligomers.

¹³C-metabolic flux analysis in glycerol-assimilating strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Genome analysis and optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by lactic acid bacteria from plant materials.
•
Effects of *Enterococcus faecalis* administration on the community structure of airborne bacteria in weanling piglet and layer hen houses.
**
Hsp101 contributes to freeze-thaw tolerance by maintaining proteasomal activity in a spore clone isolated from *Shirokumi kudama* yeast.

図3-4 出芽酵母のSEM像

ガラスにのせた出芽酵母をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで固定し、エタノールで脱水後、臨界点乾燥装置で乾燥し、金をコーティングして、SEM (JEOL JCM-6000) を用いて観察した。J. Gen. Appl. Microbiol., 67 (2021) 表紙より引用。

第3節 コリネ型細菌の走査型電子顕微鏡観察支援

*Corynebacterim glutamicum*はグラム陽性桿菌であり、放線菌門 (Actinobacteria) に分類される細菌であり、L-グルタミン酸を培地中に生産する微生物として日本で分離された。うま味調味料であるL-グルタミン酸ナトリウムはコリネ型細菌を用いた発酵法により製造されている。菌体の両端または片端が膨れた棍棒状の形態を示す。Coryne-は「棍棒状の」という意味である。本研究では、カルシウムキレート剤であるエチレングリコール-bis (β-アミノエチルエーテル) -N,N,N',N'-四酢酸 (Ethyleneglycol- bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid; EGTA) が *Corynebacterim glutamicum*の細胞表層構造に及ぼす影響を、SEMを用いて観察している。本支援では、学生に試料調製の技術指導を行った。SEM観察の結果、ゴミのようなぶつぶつが多数観察され、それがゴミなのか、細胞に由来する構造体であるのか判断が難しかった。そこで、培地や試薬の検討を行うことでゴミ (不要成分) の混入を極力抑え、さらに有効なコントロールをとることにより、細胞由来の構造体であることが示された。その成果は、「Effects of EGTA on cell surface structures of *Corynebacterium glutamicum*」 (Theresia et al., Arch. Microbiol., 2018) として発表された (図3-5)。

また、2020年に発表された「Growth promotion in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of the NCgl2986 gene encoding a protein homologous to peptidoglycan amidases」 (Utami et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 2020) においても、同様にコリネ型細菌のSEM観察における試料調製について技術支援を行った。本研究では、細胞壁加水分解酵素と考えられていたタンパク質の過剰発現による形態変化をSEMを用いて観察した。本支援の成果は学術誌の表紙に採用された (図3-6)。

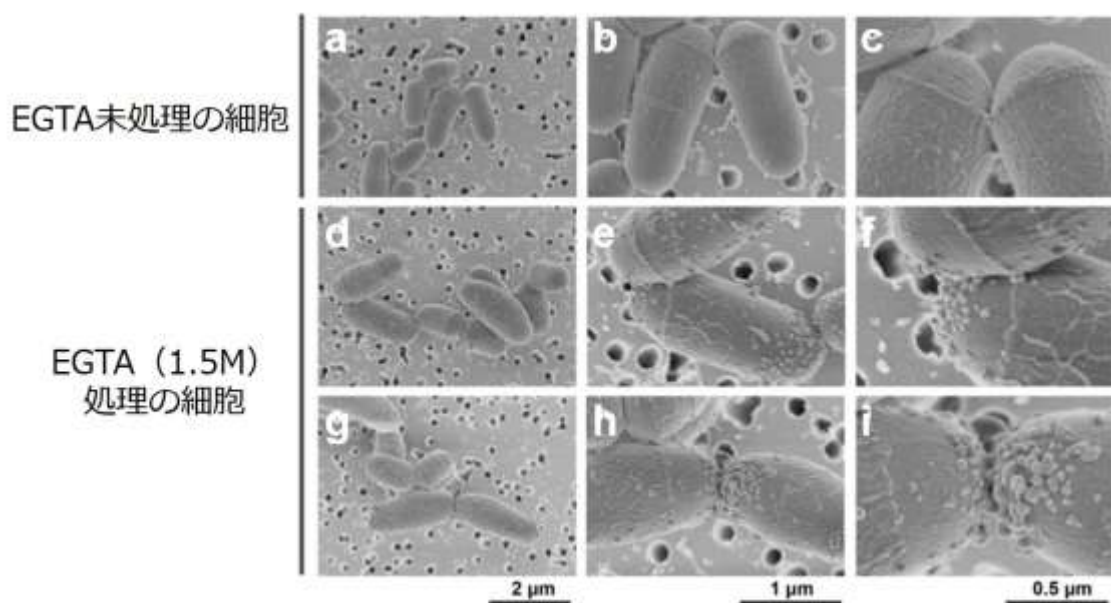


図3-5 コリネ型細菌のSEM像

EGTA未処理の細胞 (a-c) とEGTAで処理した細胞 (d-i) をメンブレンフィルターに回収し、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定し、エタノールで脱水し、凍結乾燥装置で乾燥した後、白金をコーティングし、SEM (Hitachi S-5500) を用いて観察した。Arch. Microbiol., 200 (2), 281-289 (2018) より引用。

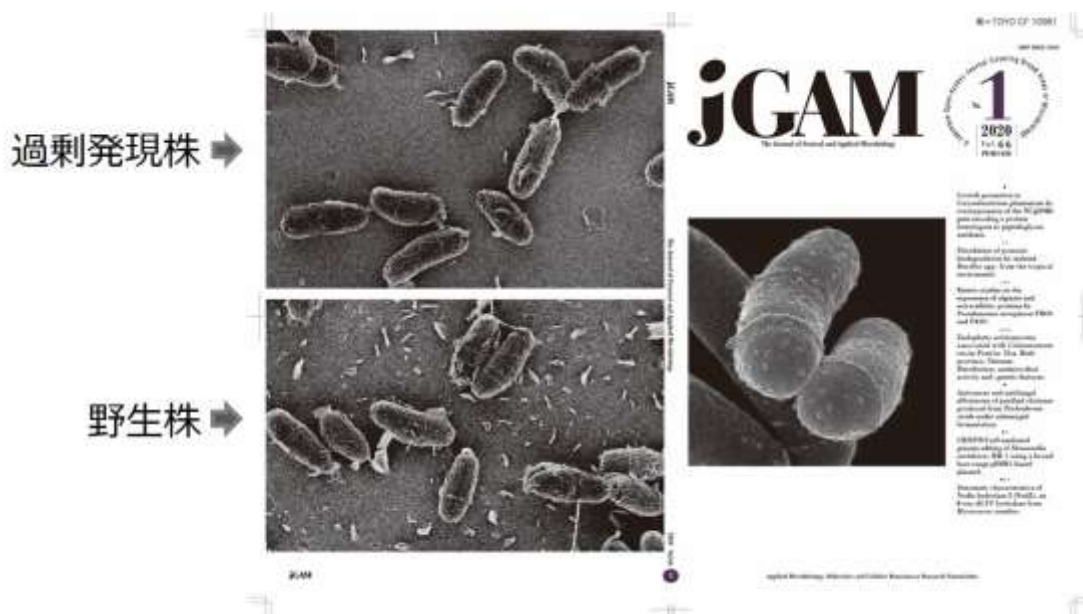


図3-6 コリネ型細菌のSEM像

コリネ型細菌をガラスにのせ、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定し、エタノールで脱水後、臨界点乾燥装置で乾燥した後、白金をコーティングし、SEM (Hitachi S-5500) を用いて観察した。表表紙 (右) の写真はSEM (Hitachi S-4700) で別に撮影したコリネ型細菌野生株。J. Gen. Appl. Microbiol., 66 (2020) 表紙より引用。

第4節 微細藻類の顕微鏡観察支援

ホログラフィック顕微鏡 (holographic microscopy) は光の干渉を応用した顕微鏡であり、通常の光学顕微鏡では観察が困難である透明な試料でも個々の物質が持っている固有の屈折率の差により撮像できる。ラベルフリー (蛍光タンパク質や蛍光色素による標識や染色が必要ない) で細胞の形状・細胞内小器官などを明確に可視化できるのが特徴で、固定をする必要がないため生体細胞や微生物を生きた状態で観察できる。また、低エネルギー照射で高速撮像できるため、細胞へのダメージも少ない。細胞定量解析、細胞内RI分布解析、細胞形態解析、細胞分解、細胞分化、細胞死 (アポトーシス、ネクローシス)、寄生虫等感染変化解析、微生物3Dイメージング、ラベルフリー4Dイメージングなどへの利用が期待されている。東京工業大学生命理工学院では、令和2年度第3次補正予算により、Tomocube社製 3Dホログラフィック顕微鏡 Tomocube HT-2H TS3が導入された。

ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis oceanica*) は真正眼点藻綱に属する2~5 μm の非常に小さい球形の単細胞藻類である。細胞の形態は緑藻綱のクロレラと似ているが、その名が示す通り細胞内に赤い眼点があるのが特徴である。細胞の重さの50%を超える油脂を蓄積することから、油脂生産藻類とし注目されている。多くの藻類では窒素欠乏時に油脂を蓄積することが知られているが、窒素欠乏条件では藻類の生育が著しく阻害される。一方、リンの欠乏条件では窒素欠乏条件と比べ生育を維持しながら油脂を高蓄積する。

細胞内に蓄積された油滴の観察は、脂肪滴に特異的に取り込まれるNile redなどの蛍光試薬で細胞を染色して、蛍光顕微鏡を用いて行われる。しかしながら、藻類細胞内の葉緑体は自家蛍光があり、観察の目的とする物質のシグナルが微

弱な場合、自家蛍光がそれらの検出を妨げる要因の1つとなっている。一方、ホログラフィック顕微鏡は、固定や染色を必要とせず透明な細胞や細胞内小器官を生きた状態で観察が可能である。これまで動物細胞のライブイメージングなどに利用されているが、細胞の大きさが5 μm 以下の微生物の観察実績はあまりない。そこで、「ホログラフィック顕微鏡を用いた藻類細胞内小器官の観察」を目的とし、観察条件の検討を行った。

リン欠乏条件下での*N. oceanica*の生育を増殖曲線を作成することにより確認した(図3-7)。リン欠乏条件下で生育した*N. oceanica* をNile redで染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡(Carl Zeiss LSM780)を用いて観察を行った結果、油滴の蓄積が確認できた(図3-8)。続いて、リン欠乏条件下で生育した*N. oceanica* をホログラフィック顕微鏡を用いて観察した。ホログラフィック顕微鏡により藻類の細胞を観察することができた(図3-9)。細胞内には、葉緑体(屈折率1.42)と推定される構造体に加えて、リン欠乏条件で葉緑体よりも屈折率の低い領域の発達がみられたが、それらを細胞内小器官に帰属するには至っていない。今後更なる条件検討が必要である。

图3-7

图3-8

图3-9

第4章 総括

第1節 まとめとバイオ系研究支援で求められる技術職員像について

本論文は、31年間の研究支援業務実績を基に、微生物の培養技術および遺伝子解析技術を用いた研究支援および各種顕微鏡を利用した酵母やコリネ型細菌、大腸菌など微生物の形態観察支援についてまとめた。微生物は肉眼では観察できない微小な生物の総称であり、真核生物から原核生物まで多種多様である。その生物種毎に性質が異なるため、微生物が変われば培養方法も取り扱い法も変わる。この点が微生物研究において難しい点でもあり、面白い点でもある。筆者は長年の経験と実績に基づき、微生物を用いた細胞増殖、染色体複製、細胞分裂、遺伝子解析、タンパク質解析、代謝解析、発酵生産、抗生物質探索などの研究を支援してきた。微生物の培養技術および遺伝子解析技術を用いた研究支援では、論文15報において共著者として貢献した。また、酵母やコリネ型細菌、大腸菌など微生物の形態観察支援では、論文3報において共著者として貢献した。また、DNAシーケンス解析および質量分析サービスについて、バイオ部門（旧バイオ技術センター）として受けた謝辞は、論文170報および学会発表等82件を超えている。更に、多くの卒業論文や修士論文、博士論文などの学位論文においても支援に対する謝辞が述べられている。

DNA配列解析では、次世代シーケンス解析の開発が進んでおり、膨大なシーケンシング反応を同時並行して実行できるようになった。遺伝子の変異や発現量の解析といった多様なアプリケーションが可能となったが、得られた膨大なデータを解析する技術は追いついていない。また、そのような膨大なデータを解析でき

る人材も求められている。2019年の国のバイオ戦略においても、バイオに関する基礎力をもちつつデータ解析できる研究人材の育成がうたわれている。筆者も今後データ解析技術を習得し、バイオインフォマティクスの支援を行うことを視野に入れている。

また、バイオ系研究ではイメージングが重要な研究成果となってきている。顕微鏡の開発も進んでおり、簡便に高解像のイメージを取得できるようになった。一方、イメージングの重要度が増すほど、良好な試料の調製や繊細な撮影技法の重要度が高まっている。試料調製などのアナログ的な技も磨きつつ、高度な観察装置の性能を最大限に発揮できる技を習得し、本学の研究力向上、ひいては我が国の研究力向上に貢献できるような技術者を目指していく。

東工大TCカレッジ バイオ系TCコースでは、「真核生物と原核生物の構造と機能を理解し、ドライとウェット双方のプロセスを用いた研究にコミットする。バイオ関連分野の広範囲におよぶ研究への支援に必要な高度な技術力を有するとともに、最新の解析手法や研究動向にも敏感である。異分野連携を視野に入れた共同研究の企画・支援において、専門分野では研究者をリードし、適宜的確な助言や提案を与える。次世代後継者の育成にも積極的に取り組み、組織の発展に貢献する。」という目指すべきTC像を掲げている(図4-1)。筆者は主に微生物を対象とした研究支援を行っているが、当初所属した研究室では動物細胞を用いた研究にふれており、2011年度からは実験動物の管理支援に携わり、凍結胚の作製、精子凍結、胚移植などを経験し、視野を広げてきた。バイオ関連分野の広範囲におよぶ研究への支援に必要な高度な技術力を有していると言うにはまだ不十分であるが、技術力の向上に努めている。筆者の強みである観察力と忍耐力、協調性を

もって今後も研究教育支援に取り組むことによって、目指すべきTC像に少しでも近づいていきたい。

バイオ系テクニカルコンダクター “TC”

コース担当：高田 綾子（バイオ部門）

監修教員：太田 啓之 教授



目指すべきTC像



真核生物と原核生物の構造と機能を理解し、ドライとウエット双方のプロセスを用いた研究にコミットする。バイオ関連分野の広範囲におよぶ研究への支援に必要な高度な技術力を有するとともに、最新の解析手法や研究動向にも敏感である。異分野連携を視野に入れた共同研究の企画・支援において、専門分野では研究者をリードし、適宜的確な助言や提案を与える。次世代後継者の育成にも積極的に取り組み、組織の発展に貢献する。

TM認定基準（KPI, 技術・開発系の業務に携わった期間に限る）

☆必要単位数：15-22

2単位/1件（下記の2単位項目のうち2項目は必須）

・ 共著論文（筆頭著者含む） ・ 外部資金（科研費等）獲得 ・ 技術研究会等発表（自らの発表）

1単位/1件

・ 論文貢献（謝辞） ・ 外部資金（科研費等）応募 ・ 学会等発表
・ 受賞・表彰 ・ 授業支援 ・ テクニカルレポート
・ セミナー等受講（講習・研修） ・ 資格（別添掲載） ・ 特許
・ 国内・海外研究留学 ・ 学会等の委員 ・ 仕様策定委員または技術審査員
・ マネージメント経験 ・ アウトリーチ活動（主担当）

図4-1 バイオ系TCコースの目指すべきTC像

令和4年度東工大TCカレッジ説明会資料より引用。

第2節 今後の技術系職員による研究支援の在り方

組織の研究力向上のためには、組織的な研究支援体制とステークホルダーの連携が重要である。東京工業大学は2020年度に科学技術振興機構の先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）が採択され、2021年に技術の匠であるTCを養成する「場」として東工大TCカレッジが創設された。本カレッジは、大学講義、学内研修・講習、メーカーとの共同開発プログラムなどを組み合わせたカリキュラムを体系化し、研究者のパートナーとなる研究支援者を養成し、全国の技術人財養成ネットワークの拠点となることを目指している。高度技術人財が輩出されても、活躍できる体制、場所、機会がなければ全く意味がない。本学の重点施策と位置づけ、教職員の理解と協力のもと、運営されることを期待している。

よりよい研究支援のためには、研究者と研究支援者の信頼関係が重要である。組織的な働きかけにより、研究者と研究支援者の意識の統一を図り、よいパートナーシップを築ける体制を期待する。単なる技術支援を研究支援のレベルにまで上げていくためには、支援者が最新の研究をフォローしていかなければならない。そのためには支援者が常に研究の場に参画していただけるような環境が必要である。例えば、技術職員ごとにメンターのような立場の研究者・教員をつけて、支援者が常に研究の雰囲気になれるようにすることも有効であろう。また、分野を超えた「研究支援」のためには、研究支援者間の連携も重要となる。近年、設備共用化により、物のネットワークは構築されつつある。今後、人のネットワークの構築も進めば、より効率的な研究支援が可能となるであろう。両ネットワークを広げることにより、全国的な研究力向上のための研究支援が可能となる。

最後に、今後、人工知能 (Artificial Intelligence、AI) の開発が進み、技術支援の形も変わっていくことが予想される。若手の技術支援者には、蓄積されたデータに基づく計算だけでは導きだせない発想力と想像力をもつ研究支援者を目指してほしい。研究者の指示に従うだけの単なる技術支援者にとどまらず、各個々人が研究を理解し自ら考えて「研究支援」にまで踏み込んでいける実力を養っていくことがなによりも重要である。

参考文献

Chen, X., Zhang, R., Takada, A., Iwatani, S., Oka, C., Kitamoto, T., Kajiwara, S., The role of Bgl2p in the transition to filamentous cells during biofilm formation by *Candida albicans*, *Mycoses*, 60 (2), 96-103 (2016)

Kaidow, A., Kataoka, T., Wachi, M., Takada, A., Yamasaki, M., and Nagai, K., The 55-kilodalton protein in an *oriC* complex fraction is glycogen synthase, *J. Bacteriol.*, 174, 5454-5456 (1992)

Kijima, N., Goyal, D., Takada, A., Wachi, M., and Nagai, K., Induction of only limited elongation instead of filamentation by inhibition of cell division in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 227-232 (1998)

Matsutani, A., and Takada, A., High-frequency single-cell isolation of bacteria using microenclosure array with multipillar structure, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 49, 127201-4 (2010)

Matsutani, A., and Takada, A., Microfabrication of Si and GaAs by plasma etching process using bacterial cells as an etching mask material, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 51, 87001-4, (2012)

Matsutani, A., and Takada, A., Fabrication of silicon microchannel for transport of bacterial cells by Ar/F₂ vapor etching process, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 52, 47001-4 (2013)

Matsutani, A., and Takada, A., Single-cell isolation and size sieving for microbial analysis using microenclosure array, *Sensor and Materials*, 27 (5), 383-390 (2015)

Matsutani, A., and Takada, A., Microchannel-free collection and single-cell isolation of yeast cells in a suspension using liquid standing wave, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55, 118006-1-4 (2016)

Matsutani, A., and Takada, A., Celluloid microenclosure and microlens array fabricated by SUMP method and XeF₂ vapor etching for microbial analysis, *Sensors and Materials*, 30 (1), 149-155 (2018)

Matsutani, A., Sato, M., Hasebe, K., and Takada, A., Microfabrication of concave micromirror for microbial cell trapping using köhler illumination by XeF₂ vapor etching, *Sensors and Materials*, 31 (4), 1325-1334 (2019)

Nagano, K., Wachi, M., Takada, A., Takaku, F., Hirasawa, T., and Nagai, K., *fcsA29* mutation is an allele of *polA* gene of *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 427-429 (1999)

Takada, A., Wachi, M., Kaidow, A., Takamura, M., and Nagai, K., DNA binding properties of the *hfq* gene product of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

236, 576-579 (1997)

Takada, A., Wachi, M., and Nagai, K., Negative regulatory role of the *Escherichia coli* *hfq* gene in cell division, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 579-583 (1999)

Takada, A., Nagai, K., and Wachi, M., A decreased level of FtsZ is responsible for inviability of RNase E-deficient cells, *Genes Cells*, 10, 733-741 (2005)

Takada, A., Umitsuki, G., Nagai, K., and Wachi, M., RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (1), 158-164 (2007)

Theresia, M. N., Aida, K., Takada, A., Iwai, N., Wachi, M., Effects of EGTA on cell surface structures of *Corynebacterium glutamicum*, *Arch. Microbiol.*, 200 (2), 281-289 (2018)

Umitsuki, G., Wachi, M., Takada, A., Hikichi, T., and Nagai, K., Involvement of RNase G in in vivo mRNA metabolism in *Escherichia coli*, *Genes Cells*, 6, 403-410 (2001)

Utami, M. F., Matsuda, Y., Takada, A., Iwai, N., Hirasawa, T., Wachi, M., Growth promotion in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of the NCgl2986 gene encoding a protein homologous to peptidoglycan amidases, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 66

(1), 1-7 (2020)

Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A., and Nagai, K., *Escherichia coli cafA* encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259, 483-488 (1999)

Wachi, M., Takada, A., and Nagai, K., Overproduction of the outer-membrane proteins FepA and FhuE responsible for iron transport in *Escherichia coli hfq::cat* mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 525-529 (1999)

Wachi, M., Osaka, K., Kohama, T., Sasaki, K., Ohtsu, I., Iwai, N., Takada, A., and Nagai, K., Transcriptional analysis of the *Escherichia coli mreBCD* genes responsible for morphogenesis and chromosome segregation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (11), 2712-2719 (2006)

Yamashita C., Hashimoto K., Kumagai K., Takada A., Kawasaki H. and Wachi M., L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 77 (5), 1008-13 (2013)

謝辞

本論文の作成にあたり、大変多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

バイオ系 TC コース監修であり主査の東京工業大学 太田 啓之 教授には、旧技術部バイオ技術センター長およびバイオ部門長として本研究支援の遂行および本論文の作成にあたり終始適切にご指導を賜りました。心より篤く御礼申し上げます。

東京工業大学 和地 正明 教授には、採用当初から現在に至るまで、終始ご懇篤なご指導を賜りました。心より篤く御礼申し上げます。

東京工業大学名誉教授 永井 和夫 博士には、文部技官として研究支援の世界に導き、学位取得まで終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました。深く御礼申し上げます。

旧技術部長 東京工業大学名誉教授 戸倉 和 博士、東京工業大学名誉教授 北條 春夫 博士、東京工業大学 伊東 利哉 教授、東京工業大学 小酒 英範 教授には、本研究支援の遂行に際し、多大なるご指導を賜りました。心から感謝申し上げます。

旧バイオ技術センター長 東京工業大学名誉教授 井上 義夫 博士、東京工業大学名誉教授 中村 聡 博士には、本研究支援の遂行に際し、多大なるご助言お

よびご指導を賜りました。心から感謝申し上げます。

東京工業大学 オープンファシリティセンター長 渡辺 治 教授、オープンファシリティセンター副センター長 中村 吉男 教授には、本研究支援の遂行および部門運営に際し、多大なるご助言およびご指導を賜りました。心より篤く感謝申し上げます。

東京工業大学 OFC マイクロプロセス部門長 松谷 晃宏 博士には、本研究支援の遂行および共同研究にあたり、有益なご助言およびご協力いただきました。心から感謝申し上げます。

東京工業大学 OFC 脇田 雄一 技術専門員には、本研究支援の遂行および本論文の作成にあたり、ご助言およびご声援いただきました。篤く感謝申し上げます。

東京工業大学 OFC バイオ部門の皆様には、本研究支援の遂行および部門運営にあたり、多大なるご協力をいただきました。心から感謝申し上げます。

最後に、本研究支援の遂行にあたり、様々なご協力を賜りました東京工業大学 OFC 職員の皆様を始め、東京工業大学教職員の皆様に心から感謝の意を表します。

2023 年 2 月

高田綾子