

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05541

研究課題名(和文) ファージインターフェース制御技術の確立とバイオセンシングへの応用

研究課題名(英文) Development and application of phage interfaces for bacteria detection

研究代表者

渡辺 茂 (Watanabe, Shigeru)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：70253333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリオファージとは、細菌に感染するウイルスの総称である。ファージが宿主に対して特異的に結合する機能に着目し、細菌検出技術への応用について検討した。粒子表面に金ナノ粒子を結合させたコア-シェル型シリカ粒子を合成した後、静電相互作用を介してファージを粒子表面に担持させた。合成したファージ修飾ナノ粒子と各種細菌を混合し、暗視野顕微鏡を用いて観察した。ファージ修飾ナノ粒子が、選択的に宿主(標的細菌)に結合し、細菌の散乱光強度を著しく増大させる様子が観察された。このようにファージ修飾ナノ粒子を利用すれば標的細菌の散乱光強度を増大させることで、容易に暗視野顕微鏡を用いて検出できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Bacteriophages are viruses that infect only bacterial cells in order to reproduce. Their natural affinity to the host cells can be used to design highly specific tools. We proposed phage-conjugated silica-gold core-shell nanoparticles as plasmon scattering probes for dark-field optical detection of pathogenic bacteria. By electrostatic layer-by-layer deposition on the silica nanoparticles, the phage-conjugated silica-gold core-shell nanoparticles were prepared. The phage-conjugated silica-gold core-shell nanoparticles selectively bound to the surfaces of target bacteria. The nanoparticles-bound bacteria remarkably increased the light scattering intensity. Our result suggests that the pathogenic bacteria can be detected with high selectivity and sensitivity by the dark-field microscopy technique. Furthermore, a wide variety of bacteria can be rapidly detected by altering a variety of phages immobilized on the nanoparticles.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：金ナノ粒子 ファージ 細菌 暗視野顕微鏡 比色検出

1. 研究開始当初の背景

医療、食品および環境分野において、細菌検査は衛生管理や汚染原因の究明およびバイオハザード等の面から増々重要になりつつある。病原菌を早期に発見し、速やかに対応するためにも迅速かつ簡便な検査技術の開発が求められており、近年“ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)”や“抗原抗体反応”を利用した細菌検査法が開発されている。しかし、遺伝子解析には高額な分析機器が必要な上、細菌の中には、宿主免疫を回避するような防御機能を備えているものもあり、遺伝子解析や抗原抗体反応に依らない新奇な検出原理が求められている。このような状況下、抗菌・抗ウイルス作用など多様な生理活性機能を示す多機能タンパク質をはじめとして宿主細菌に対して特異的に感染する“バクテリオファージ”の生物機能に着目し、免疫反応に代わる新奇な検出技術への応用が期待されている。

2. 研究の目的

近年、金や銀などの金属ナノ粒子の光学特性が、粒子近傍の屈折率変化に鋭敏に反応することに着目し、粒子表面に生体分子を担持させたバイオコンジュゲートナノ粒子を利用し、バイオイメージングやバイオセンシングへの応用が活発に進められている。本研究では、その優れた生体機能を失わせることなく“多機能タンパク質”をはじめ“バクテリオファージ”をナノ粒子表面に担持させる組織化技術について開発する。さらに、これらバイオコンジュゲートナノ粒子を利用した細菌検出法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ラクトフェリン修飾金ナノ粒子の合成

ラクトフェリンは粘膜上皮細胞によって産生され、母乳をはじめ涙液、鼻汁、唾液気管分泌物などほとんどすべての外分泌液中に含まれており、特に初乳に多く含まれ新生児の免疫力を高め感染予防に寄与している。さらに鉄代謝調整作用、抗菌・抗ウイルス作用、抗炎症・抗アレルギー作用、抗がん作用に加え、酸化ストレス抑制作用、脂質代謝改善作用、鎮痛・抗不安作用を示すなど多機能タンパク質として知られている。その細菌活性機能を失わせることなくラクトフェリンを担持させた金ナノ粒子の調製方法を確立するとともに、細菌の比色検出に利用できるか検討した。

(2) ファージ修飾ナノプローブの合成

幅広い細菌に対して感染予防に寄与するラクトフェリンは、細菌との選択的な相互作用に乏しく、高選択的な細菌検出には向かない。そこで、宿主細菌に対して極めて高い細菌特異性を示すバクテリオファージを担持させた金ナノ粒子の調製方法を確立するとともに、選択的な細菌の検出に利用できるか検討した。

4. 研究成果

(1) 牛ラクトフェリン修飾金ナノ粒は、クエン酸還元法を用いて合成した金ナノ粒子とラクトフェリンを混合し、粒子表面にラクトフェリンを担持させることで合成した。糖タンパク質の一種であるラクトフェリンと細菌との相互作用は、糖鎖が重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、粒子表面に担持されたラクトフェリンの糖鎖にタンパク質がアクセスできるか、レクチン(糖鎖結合タンパク質)を利用した比色検出法によって確認した。

α -D-マンノースと特異的に結合する Con A (α -Man)をはじめ PNA (β -Gal), Lotus (α -Fuc), ECA(Gal β 1-4GlcNAc), GS-II (α , β -GlcNAc), WGA (β -GlcNAc) など各種糖鎖と特異的に結合するレクチンをラクトフェリン修飾金ナノ粒の水溶液(粒径 61.2 nm)に添加し、吸収スペクトルを観察した(図 1)。ラクトフェリン修飾金ナノ粒を含む 10mM HEPES 緩衝液(pH 7.5)に Con A を添加すると、可視領域の吸収帯が赤色シフトし、溶液の色は赤色から赤紫色へと変化した。また、ラクトフェリン修飾金ナノ粒子の滴定後の平均粒径は、滴定前後で 3 倍以上も増大し、電子顕微鏡観察からも凝集体の形成が確認された。このようなスペクトル変化は、L-フコース特異的レクチン Lotus や D-ガラクトース特異的レクチン PNA などマンノースに対して特異性を示さないレクチンを添加しても全く観察されなかった。

牛ラクトフェリンにはアスパラギン結合型糖鎖(N-結合型糖鎖)が結合できる部位が 5 箇所確認されており、実際には 3~4 本の糖鎖が結合している。そのうち高マンノース型糖鎖が 65%、混合および複合型糖鎖が 35%を占めている。非還元末端側には、マンノースをはじめがラクトース、N-アセチルヘキソアサミン、シアル酸が確認されているが、その大半はマンノースが占めている。さらに、これらマンノースは、糖鎖クラスター効果によってレクチンに対して高い結合力を有しており、このような質と量ともに豊富なマンノースの存在によって、マンノース特異的レクチン"Con A"を添加した場合のみ金ナノ粒

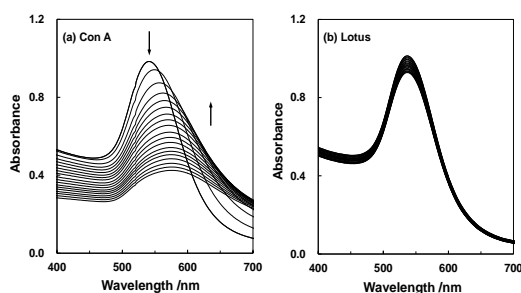


図 1. 10 mM HEPES 緩衝液中、ラクトフェリン修飾金ナノ粒子と各種レクチンを混合した時の吸収スペクトル変化 (a) Con A, (b) Lotus

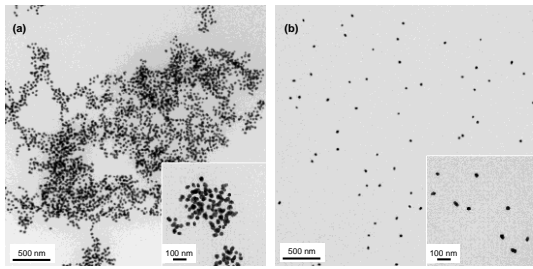


図 2. ラクトフェリン修飾金ナノ粒子と各種レクチンとの混合試料の TEM 図 (a) Con A と (b) Lotus

子が凝集し (図 2), 色調変化をもたらしたと考えられる. これらの実験結果から粒子表面に担持されたラクトフェリン糖鎖にタンパク質がアクセスできることがわかった.

次にラクトフェリン修飾金ナノ粒を黄色ブドウ球菌や大腸菌と混合し, その吸収スペクトル変化を観察した. しかし, いずれの場合もラクトフェリン修飾金ナノ粒子は, 細菌に結合せずスペクトル変化は観察されなかった. 表面が負電荷を帯びている細菌の検出には, 静電相互作用がきわめて重要な役割を担うことが報告されている. ラクトフェリンは塩基性タンパク質であり, 中性条件下では正電荷を帯びており, 静電的相互作用がその抗菌活性の作用機序となっている. しかし, 負電荷を帯びたクエン酸還元金ナノ粒子に担持させたことで, ラクトフェリン修飾金ナノ粒子は負電荷を帯びており, その静電反発からラクトフェリン本来の生体機能を発揮できなかったものと考えられる.

そこで, 生体分子を担持させる足場ナノ粒子として分散安定性に優れたカチオン性金ナノ粒子の合成について検討した. クエン酸還元金ナノ粒子を出発物質として, その粒子表面に水素化ホウ素ナトリウムで還元した還元ウシ血清アルブミンを担持させた還元 BSA 保護金ナノ粒子を調製した後, その水溶液に poly (diallyldimethylammonium chloride)

(PDDA) を添加し, 粒子表面を PDDA で修飾したカチオン性金ナノ粒子 (PDDA-AuNP) ($\zeta = 20-30 \text{ mV}$) の合成方法を確立した. 続いてその粒子表面にラクトフェリンを担持させ, 細菌の比色検出について検討した. PDDA 被覆金ナノ粒子にラクトフェリンを担持させたラクトフェリン修飾金ナノ粒子に大腸菌や黄色ブドウ球菌などの細菌を加えたところ, 赤色から青色へと溶液の色が劇的に変化し, 目視で細菌の存在を確認することができた. このようなスペクトル変化は, SEM 観察から細菌表面に金ナノ粒子が結合し, 凝集体を形成していることによることがわかった.

(2) 細菌との結合が静電的相互作用に由来するラクトフェリン修飾金ナノ粒子では, 細菌に対する選択性を発現させることは極め

て困難である. そこで選択的な細菌検出に向け, ラクトフェリンに代わってファージを担持させたファージ修飾ナノプローブの合成法について検討した. PDDA 被覆金ナノ粒子の水溶液にファージを添加し, 粒子表面への担持を試みたが, ナノ粒子とファージの巨大な複合凝集体が形成され, ファージ修飾金ナノ粒子を得ることはできなかった. これはファージが分散安定なリン酸緩衝液中では, 金ナノ粒子が安定性に乏しく, ファージと混合した時, 凝集してしまうことが原因と考えられる.

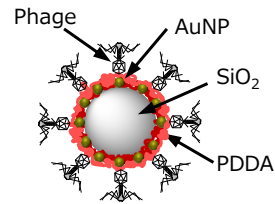


図 3. ファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子の模式図

そこで, 図 3 に示すように粒径が数百 nm のシリカナノ粒子に金ナノ粒子を担持させることで分散安定性を向上させた後, その表面をファージで修飾したファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子の合成について検討した. はじめに粒径が 500 nm のシリカナノ粒子表面をカチオン性ポリマー (PDDA: ポリジアルジメチルアンモニウムクロリド) で被覆し, クエン酸還元金ナノ粒子 (粒径 30 nm) を吸着させた. 続いて PDDA を再び被覆し, 静電的相互作用を利用して黄色ブドウ球菌を宿主とするバクテリオファージを粒子表面に担持させた (図 4).

次に暗視野顕微鏡法を用いた細菌検出について検討した. 黄色ブドウ球菌とファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子を混合し, 混合前後の黄色ブドウ球菌を暗視野顕微鏡法で観察した. ナノ粒子との混合後, 黄色ブドウ球菌から発せられる散乱光強度が増強した (図 5). これらの試料を電子顕微鏡で観察するとナノ粒子が細菌表面に吸着している様子が観察された (図 6a). 細菌表面にファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子が凝集することで, 細菌から顕著な散乱光が観察されたと考えられる.

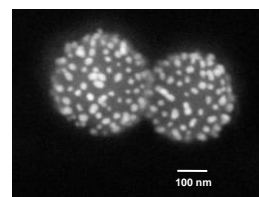


図 4. ファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子の SEM 図

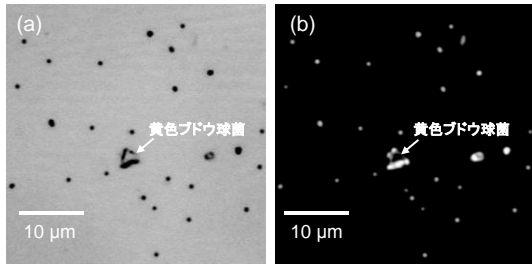


図 5. 黄色ブドウ球菌とファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子混合試料の (a) 明視野顕微鏡像と (b) 暗視野顕微鏡像

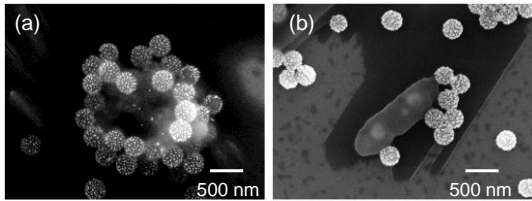


図 6. 細菌とファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子混合試料の SEM 図: (a) 黄色ブドウ球菌, (b) 大腸菌

さらに、黄色ブドウ球菌に混合比を変えながらナノ粒子を添加し、暗視野顕微鏡で黄色ブドウ球菌の散乱光強度を観察した。黄色ブドウ球菌とナノプローブの混合比が 1:200 の時、散乱光強度が最大となり、細菌検出に最適な混合比であることがわかった。一方、ナノ粒子表面に担持させたファージが宿主としない大腸菌の場合、ファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子は吸着せず (図 6b)、暗視野顕微鏡で観察しても散乱光強度が増大する様子は観察されなかった (図 7)。また、黄色ブドウ球菌と大腸菌を含む混合試料にナノプローブを添加後、顕微鏡で観察すると黄色ブドウ球菌のみから強い散乱光が観察され、宿主に対する高い選択性を確認した。

本手法は、担持させるバクテリオファージを変えることによって、特定菌種への選択性を自在に制御することが可能であり、迅速かつ簡便な細菌検出法への応用が期待できる。

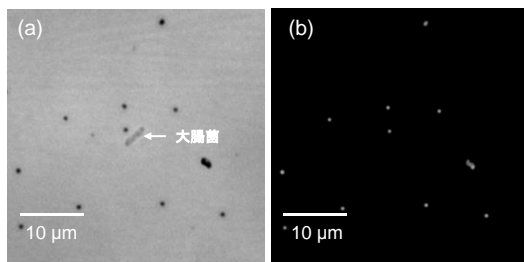


図 7. 大腸菌とファージ修飾コア-シェル型ナノ粒子混合試料の (a) 明視野顕微鏡像と (b) 暗視野顕微鏡像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 東 優磨, 清岡千尋, 塚本英視, 波多野慎悟, 渡辺 茂, “レクチン-金ナノ粒子凝集比色法を利用したラクトフェリンの迅速糖鎖修飾検出”, *Milk Science*, 査読有, 65 巻, 2016, 71-80
DOI : <https://doi.org/10.11465/milk.65.71>

[学会発表] (計 5 件)

1. 今井齊志, 鷺尾和也, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 松崎茂展, 内山淳平, “バクテリオファージ担持金ナノ粒子凝集体を利用した細菌の暗視野顕微鏡検出”, 日本化学会第 98 春季年会, 日本大学, 千葉, 2018 年 3 月 20-23 日
2. 今井齊志, 鷺尾和也, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 松崎茂展, 内山順平, “バクテリオファージ担持ナノ粒子の調製と細菌検出への応用” 日本食品微生物学会第 38 回学術総会, 徳島県郷土文化会館, 徳島, 2017 年 10 月 5-6 日
3. 鷺尾和也, 石澤 駿, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, “細菌検出に向けたカチオン性金ナノ粒子の開発”, 日本化学会 第 97 春季年会, 慶応義塾大学, 横浜, 2017 年 3 月 16-19 日
4. 塚本英視, 波多野慎悟, 渡辺 茂, “金ナノ粒子を利用した細菌の比色検出に関する基礎研究”, 第 38 回溶液化学シンポジウム, 高知, 2015 年 10 月 21-23 日
5. 渡辺 茂, “自己組織化ナノ構造テンプレートを利用した金ナノ粒子アレイの作製とプラズモンセンサーへの応用”, 附置研究所間アライアンス「次世代エレクトロニクス」グループ (G1) 分科会高知大学ジョイントシンポジウム, 高知, 2015 年 11 月 16-17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 茂 (WATANABE SHIGERU)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号 : 70253333

(2) 研究分担者

波多野 慎悟 (HADANO SHINGO)

高知大学・教育研究部総合科学系・講師

研究者番号 : 70397157