

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07348

研究課題名(和文)糸状菌の細胞表面を模倣した動物免疫系を回避するステルス性医療用ナノ粒子の研究開発

研究課題名(英文)Development of stealth-nanoparticles avoiding animal immune system that mimics the cell surface of filamentous fungi.

研究代表者

吉見 啓 (Yoshimi, Akira)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・准教授

研究者番号：60436102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糸状菌由来の新規ステルス素材である -1,3-グルカン(AG)およびヒドロフォビン(HP)を用いて、ステルス機能を賦与した医療用ナノ粒子を創成することを目的とする。本研究で得られた成果は以下の通りである。

1) AGオリゴ糖の精製条件の決定。2) AGおよびAGオリゴ糖のステルス機能の確認。3) AGとHPの非相互作用性の確認。4) AGおよびAGオリゴ糖の酵素合成条件の決定。5) AGステルス機能のマウス生体レベルでの実証。6) AGオリゴ糖の粒子吸着条件の検討。7) 麹菌における菌糸接着因子ガラクトサミノガラクトン(GAG)の発見。8) AGとGAGのステルス機能に関する相加的相互作用の実証。

研究成果の概要(英文)：This study aims to create medical nanoparticles with stealth function using -1,3-glucan (AG) and hydrophobin (HP) which are novel stealth materials derived from filamentous fungi. The results obtained in this study are as follows.

1) Determination of purification conditions for AG and AG oligosaccharides. 2) Confirmation of the stealth function of AG and AG oligosaccharides. 3) Confirmation of non-interaction between AG and HP. 4) Determination of enzymatic synthesis conditions of AG and AG oligosaccharides. 5) Demonstration of the stealth function of AG in vivo. 6) Evaluation of adsorption conditions of AG oligosaccharides and the particles. 7) Discovery of galactosaminogalactan (GAG) as hyphal adhesion factor in *Aspergillus oryzae*. 8) Demonstration of additive interactions on the stealth function of AG and GAG.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 細胞壁 ステルス素材 -1,3-グルカン オリゴ糖合成 免疫細胞応答試験 マウス免疫試験

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糸状菌細胞表面のステルス性とその応用

糸状菌の細胞壁は、 $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) や  $\beta$ -1,3-グルカン (BG)、キチンなどの多糖より構成されている。AG は、細胞壁外層に存在し、ある種のストレスから細胞を保護する役割を担う。また、ある種の動植物感染真菌において、AG が細胞壁内層の BG やキチンを被覆することにより、感染宿主の防御応答を回避している (ステルス機能) ことが明らかになっている。近年、糸状菌の産生する両親媒性蛋白質ハイドロフォビン (HP) も宿主免疫系からの回避機能 (ステルス機能) に関与し、ある種の病原真菌は HP を細胞最外層 (AG の外層) に発現することで感染宿主内での生存を図っていることが報告された (*Nature* 460:1117, 2009)。代表研究者と連携研究者の阿部は以前より、ステルス機能には関連しない抗真菌剤開発やプラスチックの分解リサイクル研究を通して、独立に AG および HP の機能を解析し、新素材としての研究開発を進めてきた (阿部ら特許 4595074 号、特許 4273504 号)。

#### (2) 医療用ナノ粒子

医療用ナノ粒子は、蛍光イメージング、MRI、中性子捕捉療法、磁気温熱療法、薬物送達系 (DDS) としての利用が期待されている。MRI や CT では固体ナノ粒子がイメージング試薬として利用できるが、静脈内に投与したナノ粒子が肝臓や脾臓などの細網内皮系 (網内系) に捕捉され、標的組織へ送達できないことが課題となっている。網内系に捕捉されないステルス機能を付与したナノ粒子を創成できれば、少投与量で高性能な診断・治療用のプローブを達成できる。代表研究者は、病原糸状菌の細胞表面構造、特に AG や HP のステルス機能に着目し、これらをステルス新素材として利用できると考えた。そこで本研究では、糸状菌由来の AG および HP を材料として、糸状菌の細胞表面を模倣してステルス機能を付与した新規医療用ナノ粒子を開発することを目的とした。細胞表面の順序に従う順層表面および反転させた逆層表面のナノ粒子を作製し、最適なナノ粒子表面構造の解明を目指す。

### 2. 研究の目的

(1)  $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) オリゴ糖のステルス機能評価

代表研究者は、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を中心に糸状菌の細胞壁構築シグナル伝達経路に関する研究を展開してきた。その一環として、AG を素材として利用する試みを進めている。まず、不溶性多糖である AG 素材の利便性を向上させるため、亜臨界水による可溶化条件を検討した。その結果、重合度 (DP) 3-25 の AG オリゴ糖の作製に成功している。さらに、AG オリゴ糖に

ついて樹状細胞応答性を評価したところ、DP 5-10 の AG オリゴ糖はサイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の産生を誘起しないことを明らかにしている (AG のステルス性を確認)。本研究では、ナノ粒子被覆用の AG および AG オリゴ糖の精製を目的として、AG 亜臨界抽出条件の最適化を試みる。また、研究過程において AG および AG オリゴ糖を糖転移反応により合成する方針へと変更したため、AG および AG オリゴ糖の酵素合成条件を決定することも研究目的とした。さらに、マウス *in vivo* 試験により、AG のステルス機能をマウス生体レベルで確認することを目標とした。また、水溶性バイオフィルムの構成多糖である GAG にもステルス機能があると推定されたため、GAG のステルス機能確認を目的に追加とした。

(2) 糸状菌 AG で被覆したステルスナノ粒子

これ迄に連携研究者の阿部・川上・高見は、麹菌の HP である Ro1A あるいは Ro1A で被覆した酸化鉄ナノ粒子が樹状細胞を刺激せず、MRI イメージングにより Ro1A 被覆酸化鉄ナノ粒子は網内系による捕捉を回避することを明らかにしている。本研究では、これらの成果に基づき AG および HP で被覆したナノ粒子を作製することを目的とする。一方、本研究過程において AG と HP の相互作用が確認できなかったため、AG 単独での被覆ナノ粒子の作製条件検討に注力することに方針を変更した。

### 3. 研究の方法

(1) 麹菌の培養菌体から AG を抽出し、亜臨界水処理条件の最適化により AG オリゴ糖を生産、オリゴ糖シリーズを作製する。また、AG オリゴ糖シリーズの免疫応答性を評価する。

(2) AG 欠損株および AG 低減株を用いて免疫細胞を刺激し、麹菌細胞における AG のステルス機能を再確認する。

(3) 分子間相互作用解析装置 QCM (Quartz Crystal Microbalance) を使用して AG と HP の相互作用を評価する。

(4) *Streptococcus mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF-I) を利用して、継続的・安定的に AG および AG オリゴ糖を得るための AG および AG オリゴ糖の糖転移酵素による酵素合成条件を検討する。

(5) AG 低減麹菌を用いたマウス *in vivo* 試験により、AG のステルス能の有効性をマウス生体レベルで評価する。

(6) 表面を修飾した酸化鉄ナノ粒子と還元末端のみを酸化してカルボキシイミド化

したAGオリゴ糖を用いてAGによるナノ粒子の被覆条件を検討する。

(7) 水溶性バイオフィルムを構成するヘテロ多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) のステルス能を評価するため、まずは麹菌において生産されるGAGを分析する。また、AGとGAGの二重欠損株を作製し、これら菌株の培養菌糸を用いて免疫細胞応答試験を実施する。

#### 4. 研究成果

(1) 糸状菌細胞壁からのAGの精製とオリゴ糖化：麹菌の培養菌体から熱水・アルカリ抽出法により細胞壁多糖AGを抽出した。また、バッチ式亜臨界面水処理装置を用いてAGオリゴ糖化の最適条件を決定し、糖の重合度 (DP) 毎にシリーズ化した高純度AGオリゴ糖を取得した。

(2) AGおよびAGオリゴ糖シリーズの免疫応答性評価：精製したAGおよびAGオリゴ糖シリーズに対する樹状細胞のサイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の産生量を解析した。また、免疫応答をGFP蛍光で評価可能な免疫応答レポーター系によりAG欠損麹菌の免疫刺激性を評価した。これらの解析により、多糖AGとそのオリゴ糖のステルス機能を再確認できただけでなく、AG欠損株における免疫賦活活性の増強が初めて確認された。

(3) AGおよびHPの相互作用解析：分子間相互作用解析装置QCM(Quartz Crystal Microbalance)を利用したAGとHPの相互作用解析においては、QCM金電極上にHPであるRo1Aを吸着させ、センサー電極がRo1Aで被覆した状態でAGオリゴ糖を添加した。その結果、発振周波数に変化は認められず、Ro1AとAGオリゴ糖が直接相互作用する証拠は得られなかった。今回使用したオリゴ糖は比較的鎖長が短く (DP10以下)、濃度も低かったことから相互作用が微弱で検出限界以下であった可能性が考えられた。そこで、AGおよびAGオリゴ糖を大量に獲得する必要があると判断し、後述する糖転移酵素合成によるAGオリゴ糖精製を開始した。

(4) AGおよびAGオリゴ糖の酵素合成：継続的・安定的にAGオリゴ糖を得るためAGおよびAGオリゴ糖の糖転移酵素による酵素合成を開始した。AGの酵素合成には、*Streptococcus mutans*のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF-I) を利用した。本酵素をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、スクロースを基質としてAGの生成条件を検討した。その結果、基質量からの換算値で3-5%と良好な収率でのAG生成条件を決定した。また、C13-NMRにより得られた

AGは、想定どおり主に1,3結合から構成される多糖であることが確認された。

(5) AGの免疫応答マウス試験：AGの免疫ステルス機能をマウス生体レベルで評価するため、AG低減麹菌を用いてマウス *in vivo* 試験を実施した。まず、マウスに2週間、対照株およびAG低減麹菌株の粉末を腸管摂取し、その際のNK、NKT、T細胞およびマクロファージの実数および活性化細胞数を解析した。その結果、いずれの実験区においても対照株群<AG低減株群の傾向が認められ、AGのステルス性がマウス生体レベルで初めて実証された。

(6) AGオリゴ糖の粒子吸着条件の検討：AG被覆酸化鉄などの粒子を作製するため粒子表面にアミノ基を導入した酸化鉄ナノ粒子を準備した。これにAGオリゴ糖の還元末端のみを酸化してカルボキシイミド化したAGオリゴ糖をカルボキシイミドカップリングにより結合させる計画であったが、アミノ基導入効率および糖のカルボキシイミド化が不安定なため、AGオリゴ糖の粒子吸着条件の決定には至らなかった。そこで、粒子に直接糖を吸着させ糖転移反応によりオリゴ糖鎖を伸長させる条件の検討を開始した。

(7) 麹菌におけるガラクトサミノガラクトン (GAG) 分析：水溶性バイオフィルムを構成するヘテロ多糖GAGは、ステルス能を有することが報告されている。麹菌にもGAG生合成遺伝子が保存されていたことから、麹菌において生産されるGAGを分析した。また、AGとGAGの二重欠損株を作製し、GAGが麹菌における菌糸接着因子であることを発見した。

(8) AGおよびGAGの免疫応答性評価：麹菌におけるAG&GAG二重欠損株を用いて、菌糸の免疫細胞応答性を評価した。その結果、AGとGAGは相加的に菌糸細胞にステルス機能を賦与していることが示唆された。

#### 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6件)

① Akira Yoshimi, Ken Miyazawa, Keietsu Abe

Function and Biosynthesis of Cell Wall  $\alpha$ -1,3-Glucan in Fungi, *Journal of Fungi*, 査読有、3巻、2017、63  
DOI: 10.3390/jof3040063

② Akira Yoshimi, Misa Hirama, Yasunobu Tsubota, Kazuyoshi Kawakami, Silai Zhang, Katsuya Gomi, and Keietsu Abe

Characterization of cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan-deficient mutants in

*Aspergillus oryzae* isolated by a screening method based on their sensitivities to Congo red or Lysing Enzymes, Journal of Applied Glycoscience, 査読有, 64 巻, 2017, 65-73  
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2017\_004

③ Silai Zhang, Hiroki Sato, Sakurako Ichinose, Ken Miyazawa, Akira Yoshimi, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Keietsu Abe and Katsuya Gomi

Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan prevents  $\alpha$ -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 124 巻, 2017, 47-53  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.013

④ Akira Yoshimi, Ken Miyazawa, Keietsu Abe

Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 80 巻, 2016, 1700-1711  
DOI: 10.1080/09168451.2016.1177446

⑤ Osamu Mizutani, Matsuko Shiina, Akira Yoshimi, Motoaki Sano, Takeshi Watanabe, Youhei Yamagata, Tasuku Nakajima, Katsuya Gomi, and Keietsu Abe

Substantial decrease in cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan caused by disruption of the *kexB* gene encoding a subtilisin-like processing protease in *Aspergillus oryzae*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 80 巻, 2016, 1781-1791  
DOI: 10.1080/09168451.2016.1158632

⑥ Ken Miyazawa, Akira Yoshimi, Silai Zhang, Motoaki Sano, Mayumi Nakayama, Katsuya Gomi, and Keietsu Abe

Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 80 巻, 2016, 1853-1863  
DOI: 10.1080/09168451.2016.1209968

[学会発表] (計 23 件)

① 小泉亜未, 矢野成和, 宮澤拳, 吉見啓, 佐野元昭, 阿部敬悦

産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* の GPI 型糖転移酵素 AgtA の生物学的機能解析  
日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

② Yuki Terauchi, Yoon-Kyung Kim, Takumi Tanaka, Kei Nanatani, Akira Yoshimi, Toru Takahashi, Keietsu Abe

Asp30 and Asp73 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 are involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA  
14th European Conference on Fungal Genetics (ECFG14) (国際学会), 2018

③ 寺内祐貴, 金允卿, 田中拓未, 七谷圭, 吉見啓, 高橋徹, 阿部敬悦

麹菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA と Cutinase CutL1 間の相互作用に  
関与する CutL1 側新奇相互作用部位 D30  
生物工学会 2017 年度北日本支部 福島シンポジウム, 2017 年

④ 宮澤拳, 吉見啓, 矢野成和, 笠原紳, 阿部敬悦

*Aspergillus nidulans* の 2 種の  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素による産生多糖の化学構造解析  
生物工学会 2017 年度北日本支部 福島シンポジウム, 2017 年

⑤ 宮澤拳, 吉見啓, 古明地敬介, 田畑風華, 佐野元昭, 阿部敬悦

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸接着機構の解析  
第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017 年

⑥ 宮澤拳, 吉見啓, 田畑風華, 古明地敬介, 佐野元昭, 阿部敬悦

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養において菌糸接着に関与する多糖の特定とその欠損株の表現型解析  
日本応用糖質科学会平成 29 年度大会 (第 66 回), 2017 年

⑦ 吉見啓, 宮澤拳, 佐野元昭, 古明地敬介, 張斯来, 五味勝也, 阿部敬悦

*Aspergillus* 属菌における菌糸凝集因子の解析と高密度培養による物質高生産への応用  
日本菌学会第 61 回大会 (第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017), 2017 年

⑧ Yuki Terauchi, Yoon-Kyung Kim, Takumi Tanaka, Kei Nanatani, Akira Yoshimi, Toru Takahashi, and Keietsu Abe

Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA  
IFBC2017 (International Fungal Biology Conference) (国際学会), 2017

⑨ Yuki Terauchi, Megumi Nagayama, Takumi Tanaka, Hiroki Tanabe, Toshihiko Arita, Hiroshi Yabu, Takeshi Higuchi, Kei Nanatani, Akira Yoshimi, and Keietsu Abe

The adsorption kinetics and the self-assembled structures of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA on various chemically modified solid surfaces  
IFBC2017 (International Fungal Biology Conference) (国際学会)、2017

⑩ Ken Miyazawa, Akira Yoshimi, Shin Kasahara, Shigekazu Yano, and Keietsu Abe

Comparative analysis of the function of  $\alpha$ -1,3-glucan synthases, AgsA and AgsB, in model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*  
IFBC2017 (International Fungal Biology Conference) (国際学会)、2017

⑪ Ken Miyazawa, Akira Yoshimi, Shigekazu Yano, Shin Kasahara, Humihiko Hasegawa, Keietsu Abe

Comparative analysis of the function of  $\alpha$ -1,3-glucan synthases, AgsA and AgsB, in *Aspergillus nidulans*  
29th Fungal Genetic Conference (国際学会)、2017

⑫ Ken Miyazawa, Akira Yoshimi, Shigekazu Yano, Shin Kasahara, Humihiko Hasegawa, Keietsu Abe

Comparative analysis of the function of  $\alpha$ -1,3-glucan synthases, AgsA and AgsB, in *Aspergillus nidulans*  
14th International Aspergillus meeting (国際学会)、2017

その他国内学会発表 11 件

〔図書〕 (計 2 件)

① 吉見啓、宮澤拳、張斯来、シーエムシー出版、酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開、第 9 章 麹菌の細胞壁  $\alpha$ -1,3 グルカン欠損株による高密度培養と物質高生産への利用、2018 年、162-167

② 吉見啓、宮澤拳、阿部敬悦、日本化学会、化学と教育誌、ヘッドライン：カビ ～世間の嫌われ者、実は身近で役立つ善玉カビ～、2017 年、232-235

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：変異型糸状菌及び当該変異型糸状菌を用いた物質生産方法

発明者：阿部敬悦、吉見啓、宮澤拳、田畑風華、五味勝也、佐野元昭

権利者：東北大学、金沢工業大学

種類：特許

番号：特願 2017-91734 (PCT/JP2018/17474)

出願年：平成 29 年

国内外の別：国内 (2018 年 PCT 出願)

名称：麹菌の細胞壁変異株の選抜方法、当該細胞壁変異株、当該細胞壁変異株を用いた米製品およびその製造方法

発明者：吉見啓、阿部敬悦、川上和義、平間美沙、坪田康信

権利者：東北大学

種類：特許

番号：特願 2015-205934

出願年：平成 27 年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見 啓 (YOSHIMI, Akira)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・准教授

研究者番号：60436102

(3) 連携研究者

阿部 敬悦 (ABE, Keietsu)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：50312624

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

高見 誠一 (TAKAMI, Seiichi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：40311550