

令和元年6月18日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15247

研究課題名（和文）カビの増殖をトリガーとした抗カビ活性物質オートリリースシステムの開発

研究課題名（英文）Development of auto-release system of non-toxic anti-fungal compounds triggered by enzymes produced by fungus itself.

研究代表者

山口 宗宏（Yamaguchi, Munehiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：60358231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：住環境などでのカビの増殖はアレルギーの誘因となるなど衛生上大きな問題となる。現在市販されているカビ取り剤はカビを殺菌する作用があるが持続性に問題を秘めるため過剰使用される傾向があり、また多くは人体や環境に有害である。本研究は、人体に無毒な抗カビ活性物質を、カビが放出する酵素がトリガーとなって、必要時に必要量、必要な場所に放出し、カビの増殖を効果的に抑制するシステムの構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗カビ活性物質オートリリースシステムが確立できれば、本システムは大規模な施設投資なしに導入可能で、特に、過剰なカビ取り剤の散布が好ましくない老人施設・病院の室内設備や食品加工場・厨房施設など公共衛生施設などに有効と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fungus in the living circumstance could be caused health problems such as allergies. Marketed fungicides have the effect sterilizing fungus but tend to be overused due to their persistent, and many are chemicals which are harmful to the human body and the environment. In this study, we tried to find non-toxic anti-fungal active natural compounds and release it in suitable area, suitable time and suitable amount automatically triggered by enzymes produced by fungus itself.

研究分野：表面化学

キーワード：衛生 抗カビシステム、機能性表面 酵素反応 菌類

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カビ(糸状菌)は主要なアレルゲンであり、カビ汚染は衛生上大きな問題を引き起こす。大がかりな防カビシステムを導入できない公共衛生施設、一般家庭や小規模工場などでは一般的にカビ取り剤による定期的な洗浄により対処している。また薬剤使用の場合、カビ取り剤の主成分は次亜塩素酸や金属含有化合物であり、カビを殺菌する作用があるが持続性に問題があるため過剰使用される傾向がある。そして、多くは人体に害を引き起こす可能性がある上、薬品の洗浄による流出は環境保全の観点から問題となっている。

一方、申請者らはこれまでに、タンパク質などの生体物質を活性保持させたまま、シランカップリング剤を用いて基板表面に固定する、静的機能発現技術開発に成功し、報告している。(図1(a))

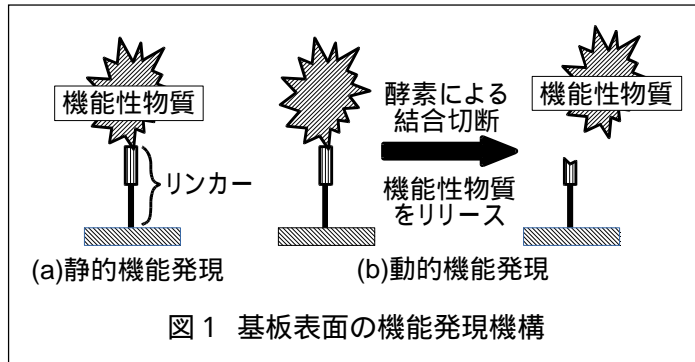
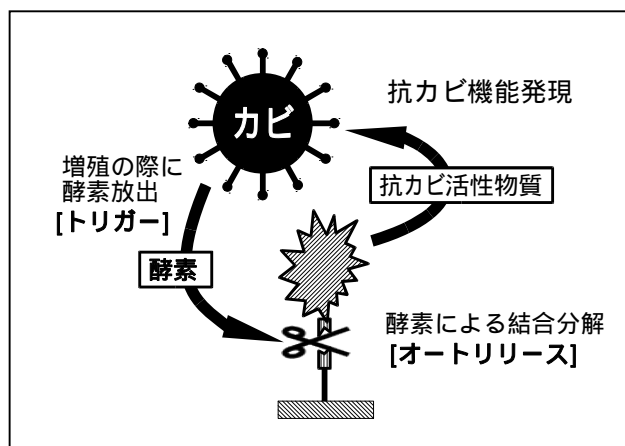


図1 基板表面の機能発現機構

2. 研究の目的

本研究では、カビが周りの有機物を分解し栄養分として吸収するために放出する酵素に着目し、カビの増殖に伴って放出される酵素がトリガーとなって必要時に必要量、必要な場所に抗カビ活性物質を放出するという、抗カビ剤オートリリースシステムの構築を目的とした。(図2) そのために、酵素分解可能なリンカーで機能性物質を固定することにより、動的に機能発現するシステムの開発を目指した。(図1(b)) また、使用する薬剤は、天然由来で防カビ活性がありかつ毒性の無い化合物を指向した。



3. 研究の方法

まず、利用する抗カビ化合物の選定を進めた。老人施設・病院の室内設備や食品加工場・厨房施設などの公共衛生施設では過剰なカビ取り剤の散布が好ましくないことは容易に想像される。そこで、本研究で利用する化合物は、「天然由来で」、「食品添加物指定されるなど人体への影響が無い(極めて小さい)」化合物に限定した。種々検討したところ、カビを完全に殺菌したりバイオフィルム化したものを分解するだけの強い活性を有する該当化合物は得られなかったが、カビを生やさない「抗カビ活性」や、またカビが生じたとしてもバイオフィルム化を防いで洗浄にて容易に洗い流すことができるという活性を有する化合物を4種類程度得ることに成功した。(具体的な化合物の名称や構造を表示するのは差し控える)

これらの化合物に対する糸状菌の遺伝子応答の解析を行い、本研究計画の自動的に機能発現する抗カビシステムの実証性を検証するため、抗カビの生化学的な研究として、アミノ基を持つ化合物の添加効果について検討を進めた。培地に添加することでイネいもち病菌ではアミダーゼ遺伝子の発現が2倍以上に増加することを見出したことから、アミノ結合により抗菌性化合物を結合した表面に対してアミダーゼが作用し、抗菌性化合物が遊離することが期待できると考えられた。

次に、ガラス表面への均一な物質固定化方法について検討した。抗カビ活性物質を再現性よく均一に固定化することは、その後の活性試験の評価に大きく影響を与える。シランカップリング剤(アミノプロピルトリエトキシシラン; APTES)を用いた抗カビ活性物質の固定について、モデル実験として蛍光化合物の固定化反応の検討を行った。ピラニア溶液処理と真空紫外光照射により表面の有機物を除去したガラス板を APTES の 10%エタノール溶液に浸漬し、最表面にアミノ基を有する基板を作成した。この基板にダンシルクロライドを反応させ、得られたダンシル基固定化基板を蛍光顕微鏡観察することで、固定量の定量的な考察を試みた。しかし、固定の均一性および再現性が不十分で固定量を定量するには至らなかった。結鎖長の長いアミノブチルシランや N-2-(アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシランなど長鎖のシランカップリング剤の利用も検討したが、やはり定性的な評価は可能であったが定量的なデータを得るには至らなかった。(図3) そこで固定対象を粒子形態のシリカゲルとし、ガラス基板上への反応と同様に APTES によるコーティング、ダンシル基の固定反応を行い、蛍光顕微鏡により観察したところ、化合物が確実に固定されていることが確認された。さらに、固定化化合物

の酵素反応によるリリースについて検討するため、基板と化合物の間にエステル結合やアミド結合を導入し検討した。(図3) まず APTES コーティングした基板に同様に縮合剤を用いてアラニンを経由して固定し、そのアラニン N 末端にアミド結合を介してダンシル基を固定した。この場合も、蛍光顕微鏡による蛍光像の観察でダンシル化合物が固定化されていることを確認したが、やはり固定量を定量するには至らなかった。

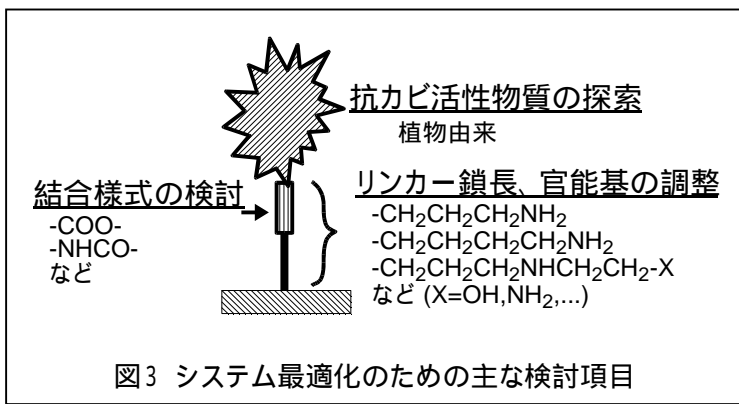


図3 システム最適化のための主な検討項目

そこで、表面が活性エステル基修飾されている市販の96穴プレートを用いて、抗カビ剤の必要量の検定を進めた。先の検証から得られた天然由来の抗カビ活性を有する4つの化合物の0.2pg/ml ~ 2mg/ml 溶液を調製し、プレートに処理することでこれらを固定化、抗カビや殺カビ効果実験をおこなった。しかし、全ての場合で殺カビ効果は得られなかった。これは、96穴プレート表面の活性エステル基の密度が殺カビ活性発現には十分でなかったためと考えられた。

高い化合物濃度修飾が可能なペプチド合成や核酸合成で利用される固相レジンをを使って、分光学的に化合物のリリース量の検討を行った。まず、数種類の抗カビ活性保有天然由来化合物を、レジン修飾可能な化合物形態に変換する研究を進めた。この際、実際の利用展開を考慮して、「リリースされる時は天然由来化合物そのものの構造となること」、「化合物が剥がれ落ちた際には再修飾が室温放置条件下で可能であること」を満たす構造をデザインし、実際にいくつかの化合物をレジン上に様々な濃度で固定化することに成功した。次に、抗カビ活性化合物のレジン表面からリリースされる化合物量について、機器分析法での検証を進めた。その結果、当初の目論見通りに、カビが発する酵素反応が働いたときに化合物が正しくリリースされ、質量分析器で化合物の同定とおおまかな定量性は検定することはできたが、重量ベースでの詳細な定量性の知見を得るには至らなかった。そこで、より高密度で化合物を固定化できる様に、1つのリンカーに複数の化合物が固定化される、枝分かれ構造や階層構造を構築してより高濃度に化合物を固定化することも検討した。せまい領域に多くの化合物がひしめき合うことから、種々検討することで適切な化学的反応条件を得ることに成功したが、やはりその固定化量を定量的に評価することは困難であった。

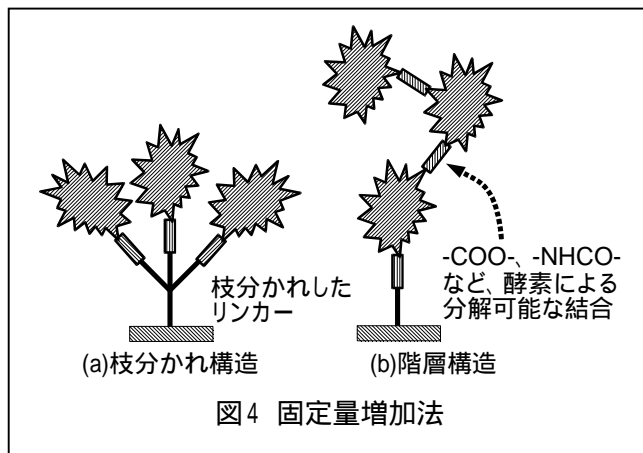


図4 固定量増加法

そこで、実際の効カビ効果により被固定化量の検定を行うことも検討したが、比較対象物の設定や、カビの植菌法などの画一化など、人工的な環境下での抗カビ効果の検討は困難を極めた。元来、「カビの量は繁殖などにより経時的に増殖してしまうこと」、「本活性は抗カビ活性であり、元々カビが存在している条件下での殺カビ活性を期待しているものではないこと(殺カビ効果と抗カビ効果は非なるものである)」などから、実際に効果を有するか否かは、現実の日常条件下で経時的に進めるのがよいのではとも言える。現在、日常条件下での抗カビ効果の検証を月単位で進めているが、これまでにカビが繁殖することはなく、また固定化されている化合物量が経時的に若干ではあるが減少している傾向がみられている。この化合物量の減少が、抗カビ活性発揮のためにリリースされたためなのか、単純な経時的な化合物崩壊によるものかを詳細に検討するまでには至っていないが、当初デザインしたような抗カビ作用が働いている可能性は示唆されたと考えている。

4. 研究成果

本研究を進めることで、実際にカビの増殖に伴って放出される酵素がトリガーとなって必要時に必要量、必要な場所に抗カビ活性物質を放出するという、オートリリースシステムの確立までには至らなかった。しかし、ガラス表面やモデルとして利用した樹脂ビーズの上に、天然から得られた抗カビ活性物質を固定化することには成功した。固定化量を重量バランスから定量するには至っていないが、分光学的な検証は可能であり、また日常条件下では防カビ効果が発揮されていると示唆する結果も得られた。総括として、挑戦的萌芽研究としてこの計画が十分実証可能であるという結果を得ることはできたと言えよう。今後も継続して本研究を進め、実

用化に近づけたいと考えている。

< 引用文献 >

Langmuir,2011,27(20),12521-12532

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

清水弘樹、マイクロ波を化学反応に利用する～加熱特性ではない特有の効果に迫る～、2018年度第1回 HiNT セミナー (2018年)

清水弘樹、マイクロ波が齎す化学反応への作用が見えてきた、平成30年度第58回 GIC セミナー (2018年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 正秀

ローマ字氏名：(SASAKI, masahide)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生物プロセス研究部門

職名：研究グループ長

研究者番号(8桁)：60357126

研究分担者氏名：清水 弘樹

ローマ字氏名：(SHIMIZU, hiroki)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生物プロセス研究部門

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：30343716

研究分担者氏名：西村 麻里江 (2015～2016年度)

ローマ字氏名：(NISHIMURA, marie)

所属研究機関名：国立研究開発法人農業生物資源研究所

部局名：植物科学研究領域

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：30370670

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：