

令和元年6月18日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00806

研究課題名(和文) フィブロイン結合ペプチドを用いた絹繊維の1ステップ抗菌化

研究課題名(英文) Antibiotic silk fibroin fiber by using peptides

研究代表者

野村 陽子 (Nomura, Yoko)

沖縄科学技術大学院大学・サイエンステクノロジーグループ・サイエンス・テクノロジー・アソシエイト

研究者番号：90302794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗菌性ペプチドを用いた、新しい抗菌方法を検討した。従来の絹(フィブロイン繊維)のペプチドによる抗菌化は、大変、煩雑である。そこでまず、抗菌性とフィブロイン繊維結合性の2つの性質を持つペプチドを選択した。このペプチド溶液へのフィブロイン繊維の浸漬により、ワンステップで抗菌化できることを示した。特に、既報のペプチドよりも強くフィブロイン繊維に結合するペプチド配列は、次世代シーケンス法などにより、ペプチドライブラリ-から新規に選択した。今後、亜熱帯環境下での使用を目的として、高温高湿下でのフィブロイン繊維抗菌化試験を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌性とフィブロイン結合性の2つの機能を持つペプチドを使うことで、簡単に抗菌性繊維を作製できる可能性が示された。この研究がさらに進めば、抗菌化された絹繊維が入手しやすくなると考えられる。特に、沖縄など高温高湿下では、汗臭の抑制などへの応用が期待される。また、1つのペプチドで2つの機能を持つものが得られたことは、学術的にも興味深く、他の研究への展開が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Antibacterial treatments are desired for practical use of silk fibroin fibers. I demonstrated a very simple method for preparing antibacterial fibroin fiber with peptides that have two functions: fibroin binding and antibiotic abilities. First, fibroin binding peptides in our previous report were fused to several short antimicrobial peptides (SAMPs), and a most compatible SAMP was determined. Furthermore, peptides which can bind more strongly to fibroin fiber were selected by NGS data analysis, and these newly selected peptides were connected to the compatible SAMP. Also, The peptide sequences having antibacterial ability against both gram positive and negative bacteria were screened.

The screened peptides were applied to the one-step antibacterial treatment that is a simple fiber incubation in peptide solution. Antibacterial activity was investigated for these treatment fibers. Antibacterial fiber tests will be continued in subtropical climate conditions.

研究分野：家政学(被服)

キーワード：抗菌化 ペプチド フィブロイン繊維 亜熱帯

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

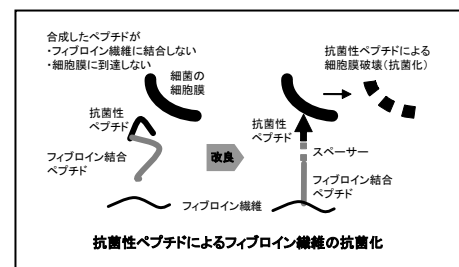
衣類として高い快適性が得られる絹や綿などの天然繊維は、生分解性、生体適合性が高いことから、ガーゼや縫合糸など医用材料としても用いられる。このような利点の一方で、微生物が繁殖しやすく衣類の悪臭や繊維の劣化などを引き起こす。このため、天然繊維の利用には抗菌化が望まれる。

従来の抗菌性物質である抗生物質の耐性菌は人体に深刻な影響をもたらす。また、ヒトが着用した衣服からはグラム陰性・陽性菌の両者が検出される。抗菌性ペプチドは、細胞膜に直接作用し抗菌作用に即効性があることから耐性菌ができにくく、グラム陽性菌と陰性菌の両者に作用するものもあり、新しい抗菌剤としての期待が高い。しかし抗菌性ペプチドによる繊維の抗菌化は、化学的処理や遺伝子工学的手法を必要として煩雑である。

一方で、研究代表者はこれまでに、絹（フィブロイン繊維）への機能性付与を目的として、フィブロイン繊維に結合するグルタミン-セリン-トリプトファン-セリン（QSWS）というペプチドモチーフを選定した（参考文献1）。そこで本研究では、被服材料・医用材料の両面から、抗菌化が望まれているフィブロイン繊維について、このフィブロイン結合ペプチド(FBP)を用いた、より簡単な新しい抗菌方法を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究では上記の背景を踏まえて、従来の煩雑なフィブロイン繊維抗菌化に代わる方法として、FBPを用いて1ステップで絹（フィブロイン）繊維の抗菌化を行うことを目的とした。図に抗菌化の原理を示す。さらに日常生活で抗菌化フィブロインを使用することを考慮し、以下を具体的な目的とした。①FBPと各種抗菌性ペプチドを組み合わせた新しいペプチド配列を設計し(平成28、29年度)、抗菌活性の有無を調べ、②候補となる配列のペプチド溶液にフィブロイン繊維を浸漬し抗菌化を行い(1ステップ抗菌化)、③得られた繊維に対して、グラム陰性・陽性菌を対象とした抗菌活性試験を、沖繩など日常的に微生物が繁殖しやすい亜熱帯環境下での評価を行う(平成29、30年度)。



すなわち、抗菌化に最適なペプチド配列を決定し、研究の成果を学会発表などで社会へ発信・還元することを最終的な目的とした(平成30年度)。

## 3. 研究の方法

### ①ペプチド配列の設計（平成28年度）

文献1のFBPのC末端に5-8残基の抗菌性ショートペプチド（文献2、3）を連結した新たなペプチド配列を設計した。例えば、配列はSYTFHWHQSWSSAAWRWRWR-NH<sub>2</sub>となる(AAはスペーサー、下線が抗菌性ペプチド配列)。このようにデザインした各種ペプチド配列と、そのコントロールとなるペプチド合成を外注し、下記③のタイムキルテストを行った。

### ②ペプチド配列の改良(平成29、30年度)

本研究では、フィブロイン繊維結合と抗菌性という、2つの全く別の機能を持つペプチドを組み合わせる。それぞれの機能が十分に発揮されるように、既報のフィブロイン結合モチーフ QSWs をタンデムにつなげてフィブロインへの結合を強めたり、適当なスペーサーを設けて相互作用しないように試みた。さらに、より厳しい条件で(結合時間の短縮や、高温による繰り返し洗浄等)、新規の FBP の探索を行った。このときに、直接 PCR 法や次世代シーケンシング (NGS) 法などにより配列の確認を行った。

#### ③タイムキルテスト(平成 28、29、30 年度)

FBP 連結後のペプチドに抗菌活性が残存するかを確認するために、タイムキルテストを行った。典型的な方法として、培養液 0.1 OD に対して終濃度でペプチド 5、10、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように調整した反応液 60  $\mu\text{L}$  を 37°C で 2 時間保温した後に、寒天培地に 30  $\mu\text{L}$  塗布し、1 晩培養してコロニー数をカウントした。

#### ④フィブロイン繊維への結合の確認(平成 28、29 年度)

ペプチド配列の C 末端をビオチン化し、文献 1 に記載した ELISA でフィブロイン繊維への結合を確認した。

#### ⑤1 ステップ抗菌化と繊維の抗菌性確認(平成 29 年度、平成 30 年度)

③タイムキルテストで抗菌性が確認されたペプチドを用いて、1 ステップでフィブロイン繊維を抗菌化した。すなわち、ペプチドを終濃度が 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように 0.1% TBST 緩衝液(500  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、これに約 2 mg のフィブロイン繊維を浸漬して 100 rpm、25°C でしんとうしてペプチドを繊維に結合させた。この繊維を水で 3 回洗浄・脱水した。

この抗菌化繊維に、希釈したログフェイスの培養液を 12.5  $\mu\text{L}$  添加し、37°C、2 時間反応させた。この繊維を培養し、コロニー計測(寒天培地)と液体培地の濁度の観察を行った。また JIS 法をもとにした繊維からの細菌抽出法による評価も行った。

#### ⑥実使用に即した抗菌活性試験(平成 29、30 年度)

得られたペプチドについて、③タイムキルテストをグラム陽性菌(スタフィロコッカス・エピデルミディス)と陰性菌(大腸菌)の両者について行った。さらに、沖縄のように高温多湿であるという環境(例えば温度 30°C、湿度 80%)での培養条件下で抗菌活性試験を行うことを計画した。将来は汗臭の抑制にこの抗菌繊維を用いることを考え、汗臭の原因菌の 1 種であるスタフィロコッカス・エピデルミディスを用いて汗臭発生の培養条件を検討した。LB、TSB、これに汗臭の原因である短鎖脂肪酸に分解される Tween80 を 0.4% 加えた培地により検討した。

## 4. 研究成果

本事業では、主として 3 つの成果が得られた。

①本事業は家政学的見地から実生活への応用を目指すものであるが、FBP 連結後もグラム陽性菌、陰性菌の両者に抗菌活性を持つ配列が得られた。グラム陽性菌、陰性菌の両者に作用するペプチドが得られたことは、実生活での利用に有利である。

②今後の評価方法の検討が必要ではあるものの、フィブロイン繊維を 30 分間程度でワンステップで抗菌化できることが示された。

③1本のペプチドで、2つの異なった機能（フィブロイン繊維への結合と、抗菌作用）を持つものが得られたことは、基礎科学的な点で興味深い。以下に詳細を示す。

平成28年度：フィブロイン繊維に結合可能な抗菌性ペプチドの探索

設計・外注合成した12種類の配列から、RRRWWW-NH<sub>2</sub>を用いたときにいくつかの配列で抗菌活性が残存することがわかった。この結果を平成29年度日本家政学会の九州支部大会で口頭発表した。また、学内の研究者向けのフォーラムで本研究の紹介を行ったので、5の発表論文等〔学会発表〕に加えた。

新しいFBPの探索については、ファージディスプレイ法で既報よりも厳しい条件で選択したファージのDNAを直接PCR法で増幅させたが、この方法では既報よりも強く結合するものは得られなかった。そこで、既知のペプチド配列YN42のWHQSWSS部分を繰り返したところ、より強くフィブロイン繊維に結合することが明らかになった。

平成29年度：新規FBPの探索と抗菌活性への影響

次世代シーケンシング (NGS) により、これまでよりはるかに多くの配列を解析して新規FBPを探索した。新しく得られた配列のいくつかは、既報の配列よりフィブロイン結合能力が高いことが示されたので、このペプチド配列のC末端に抗菌性ショートペプチドRRRWWW-NH<sub>2</sub>を連結させた。タイムキルテストでは、ペプチド無添加では30 μL 中に10-20 x 10<sup>3</sup>CFUの大腸菌（グラム陰性菌）が計測されるが、抗菌性活性の高いペプチドが添加された場合には、5 μg/mLでもほとんどコロニーは確認されなかった。この高い抗菌活性のあるものの中から、スタフィロコッカス（グラム陽性菌）にも抗菌活性を有するペプチドを探索できた。

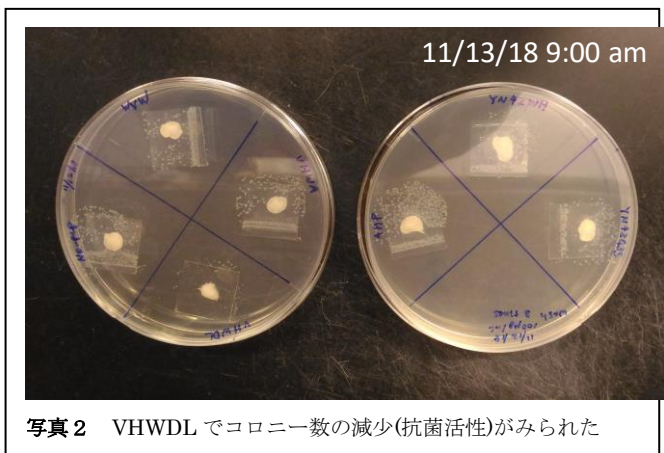
平成30年度：抗菌活性試験と実際への応用

引き続きにNGSによって得られた配列にRRRWWW-NH<sub>2</sub>を連結させて、その抗菌活性を調べた。その結果、本研究でタイムキルテストを行ったペプチド配列は、合計25種類となった。

これのうち、グラム陰性菌、陽性菌の両者のタイムキルテストで良好な結果を示した、YN42WHG3SRRRWW-NH<sub>2</sub>、YN42WHG3SRRRWW-NH<sub>2</sub>、YN42WHG3SG3RRRWW-NH<sub>2</sub>、NGS解析で得られた新規のFBP5種類にG3SRRRWW-NH<sub>2</sub>を連結した配列

について、ワンステップで抗菌化繊維を作製した。この結果、写真2に示すように、NGS解析から得られた、VHWDLモチーフを持つ配列で抗菌活性のある繊維が得られた。しかし、JIS法を参考にした繊維からの残存微生物抽出試験による抗菌活性試験を行ったところ、再現性の問題が生じた。このため、温度30℃、相対湿度80-90%でフィブロイン繊維に残存するコロニーの直接観察を開始した。これは、平成30年度に購入した恒温恒湿インキュベーターの初期不良から年度内には十分に進まなかったが、今後も引き続き行っていく。

また、汗臭抑制の予備実験として、スタフィロコッカス・エピデルミディスを種々の条件で培養したところ、しんとう培養しかつ数日間常温で放置した場合に汗臭(酢酸臭)が確認された Tween80の添加の有無による汗臭発生の違いは認められなかった。



## 参考文献

- 1、Y. Nomura et al, Biotechnol. Lett., 33,1069-1073, 2011.
- 2、M. B. Strom et al, Journal of Medical Chem., 46, 1567-1570, 2003.
- 3、F. Abbassi et al, Journal of Biological Chem, 285, 16880-16892, 2010.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- 1, 口頭発表, Yoko Nomura, Discovery and Applications of Silk Binding Peptides  
沖縄科学技術大学院大学, Science and Technology Group Forum, 5/30/2016.
- 2, 口頭発表, 野村 陽子, ペプチドによるフィブロイン繊維の抗菌化, 家政学会 九州支部  
大会, 10/6/2018.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。