

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04842

研究課題名（和文）真菌パンデミックを想定した耐性を持ちにくい革新的ナノバイオ抗真菌剤

研究課題名（英文）Nanobio antifungal agent for fungal pandemics

研究代表者

中澤 光（NAKAZAWA, HIKARU）

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40584991

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）：日本カビ（カンジダ・アウレアス）が海外で強毒化し、欧米やアジアで初めて真菌症パンデミック（世界的流行）を引き起こした。新たな作用機序の抗真菌剤が望まれている。本申請では、高い抗細菌、抗真菌および抗ウイルス活性を有し、耐性が起きにくい銀ナノ粒子を土台として、その表面に長年天然の抗真菌剤として機能しつつある酵素（キチナーゼ）を様々な比率でクラスター化することで、使用環境にあわせてオーダーメイド可能な、抗真菌活性を増強するナノバイオ抗真菌剤を提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、全く異なる安定性や機能、および反応環境を有する無機ナノ粒子とタンパク質という2種の物質の融合研究である。両方の性質を十分に活かす最適条件と構造を開発することで波及効果を見込む。社会的意義については、耐性を持ちやすい真菌症のパンデミックに対抗する手段として新たな作用機序の抗真菌剤を開発し社会に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Japanese mold (*Candida aureas*) has become poisonous overseas, causing the first mycotic pandemic (global epidemic) in Europe, the United States and Asia. The development of antifungal agents with a new mechanism of action that is difficult to have resistance is expected. In this study, we have developed a nanobio antifungal agent that exhibits antifungal activity by using the natural antifungal enzyme chitinase on the surface of silver nanoparticles that have high antifungal activity and are less likely to develop resistance.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質工学 無機ナノ粒子 酵素 表面提示

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本カビ(カンジダ・アウレアス)が海外で強毒化し、欧米やアジアで初めて真菌症パンデミック(世界的流行)を引き起こした。日本にも近いうちに持ち込まれると考えられており、早急な対抗策が求められている。一般の抗真菌剤は、真菌がすぐ耐性を持ってしまうため期待できないことから、新たな作用機序の抗真菌剤が望まれる。

### 2. 研究の目的

近年申請者は、セルロース分解酵素をモジュール単位に分割し再度混合するだけで無機ナノ粒子の表面に3次元的に再編成することによって、酵素活性を数十倍向上させることに成功した。本申請では、このクラスター化設計技術を利用して、もともと高い抗細菌、抗真菌および抗ウイルス活性を有し、耐性が起きにくい銀ナノ粒子を土台として、その表面に長年天然の抗真菌剤として機能しつづけている酵素(キチナーゼ)とその他補助タンパク質をライブラリー化し、様々な比率でクラスター化することで、使用環境にあわせてオーダーメイド可能な、抗真菌活性を増強するナノバイオ抗真菌剤を提案する。

### 3. 研究の方法

まず、酵素活性を示せる温和な HEPES 緩衝液環境で、抗菌活性の高い銀ナノ粒子の安価な合成法を開発するために、HEPES バッファーを用いて結晶成長を制限することによる粒子成長を試みた。ナノ粒子形成の確認を電子顕微鏡にて行った。次にデータベースから検索したキトサナーゼとキチナーゼへポリヒスチジンタグを融合させるように遺伝子構築と大腸菌での発現・精製を行い、最後に銀ナノ粒子表面へのキチナーゼクラスター化によるキチナーゼ活性の向上をキチン分解を指標に行った。作成したクラスター化酵素の抗菌活性を、大腸菌、酵母、コウジカビを用いて阻止円形成を指標に行った。

### 4. 研究成果

これまで、セルラーゼでは無機ナノ粒子表面へのクラスター化による活性向上を確認できていたが、キチナーゼでは未確認であったことから、これまでと同様の量子ドット表面に、キチナーゼをクラスター化によって活性向上できるのかを確認した。この確認は、すでに保有しているキチナーゼと類縁のキトサナーゼを用いて行った。その結果、クラスター化効果はみられ、クラスター化しないキトサナーゼに対して、約2倍に活性向上した(図1)。このことからキトサナーゼでもセルラーゼと同様に活性は向上するということが分かった。

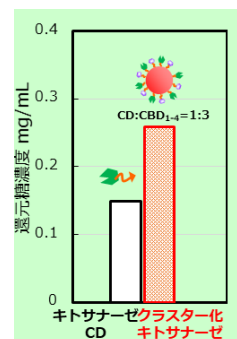


図1. 金属ナノ粒子を支持体としたキトサナーゼ活性の向上

次に酵素が活性を示す温和な条件での銀ナノ粒子合成を行った。HEPES 緩衝液と銀イオン溶液の混合濃度比を様々に変え、混合した。濃度は HEPES 緩衝液と銀イオン溶液がそれぞれ終濃度 0, 2.5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mM になるように調整した。手順としては、96 ウェルプレートに milliQ 水を加えた後、HEPES 緩衝液を加えてピペティングで混合し、そこに銀イオン溶液を加えて室温で数時間静置したところ溶液色の変化がみられた。電子顕微鏡 TEM 画像から、濃度にほとんど関係なく 20~100 nm 程度の大きさの銀ナノ粒子が作製できたことが示唆された。また、HEPES 緩衝液と銀イオン溶液がそれぞれ終濃度 250 mM ずつの溶液中では凹凸が多く、表面積が大きい粒子が観察できた(図2)。これまでの経験からクラスター化効果を発揮しやすい粒子は 100nm 程度であるため理想的な粒子ができていると判断した。

キチナーゼの発現を行った(図3)。キチナーゼは銀ナノ粒子にクラスター化するためにC末端にポリヒスチジンタグ融合した融合タンパク質として発現した。先行研究を参考にして大腸菌 BL21(DE3)株 or Origami B(DE3)株 or Rosetta-gami B(DE3)株をキチナーゼ発現プラスミドで形質転換し、大腸菌の培養温度を 30 or 37 °C、発現誘導に使用するイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)の終濃度を 1mM、タンパク質の発現温度を 15 or 30 °C の各条件においてキチナーゼを発現させ、タンパク質発現誘導後 5 あるいは 20 時間で菌体を回収し、上清画分、可溶性画分、不溶性画分に分離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットティング(W.B.)によって検出した。

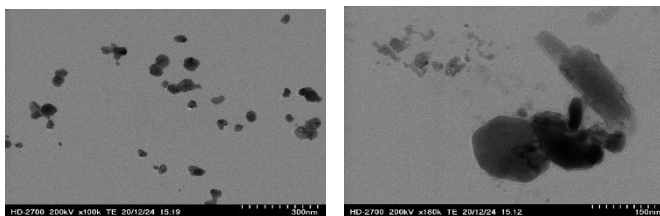


図2. 合成した銀ナノ粒子のTEM画像

その結果、BL21(DE3)株を用いて培養温度 30、IPTG 終濃度 1 mM、発現温度 15 で培養し、20 時間にて回収したキチナーゼのバンドが可溶性画分にバンドが観測できた、W.B.の結果からはいずれも pHis タグが目的通り融合されていることがわかった。

調製したキチナーゼが酵素活性を有するか調べるために、酵素分解で蛍光特性をもつ基質 4MU- (GlcNAc)<sub>3</sub> を用いた活性測定を行った。この基質は酵素による分解で 4-メチルウンベリフェロンが遊離し、淡い青色から青紫色に蛍光発色する。調製したキチナーゼ、また比較として PBS 緩衝液に基質を加えたと同時にこの蛍光強度を測定し、時間変化で記録した(図 4)。その結果、キチナーゼの方は時間変化で活性が向上し続けたことから酵素活性を発現できていることが分かった。銀ナノ粒所と酵素の確認が取れたことから、実際に銀ナノ粒子へのクラスター化効果を調べた(図 5)。ポリヒスチジンタグと金属との相互作用により、クラスター化を行い、常温で銀ナノ粒子と 30min 混合をしたのち遠心分離し、沈殿側の酵素活性を調べた。その結果クラスター化することによって活性向上をすることに成功した。しかしながら、活性向上の度合いはそれほど大きいものではなく、詳細な最適化は必要であることが分かった。YPD, PDA, LB プレート培地を作製し、それぞれに酵母、カビ、バクテリアを植菌し、銀ナノ粒子あるいは IMAC 精製後のキチナーゼ溶液を右上から反時計回りに 1, 1/5, 1/25, 1/125 倍に希釈して 10 μL ずつスポットし、生育の様子を観察した(図 6)。銀ナノ粒子のみの場合は阻止円を形成し強い抗菌活性が示されたが、一方でキチナーゼは阻止円が現れなかった。キチナーゼが酵母、カビ、バクテリアいずれに対しても、抗菌活性を示さなかったということを示している。クラスター効果による活性向上がわずかであった理由は、キチナーゼ活性が小さすぎたためと考えられる。

【まとめ】キチナーゼを銀ナノ粒子表面上にクラスター化することによって活性向上することに成功した。しかしながらその活性向上度合いは高くなく考えられることとして金属ナノ粒子上で安定的に保持できてない可能性がある。条件の更なる検討が望まれる。一方で、実験の過程でキチナーゼ活性に対して銀ナノ粒子の抗菌活性が非常に高いことが判明した。酵素と銀ナノ粒子の抗菌活性の相乗効果を得るためには酵素自身の大幅な活性向上が必要であることが分かった。

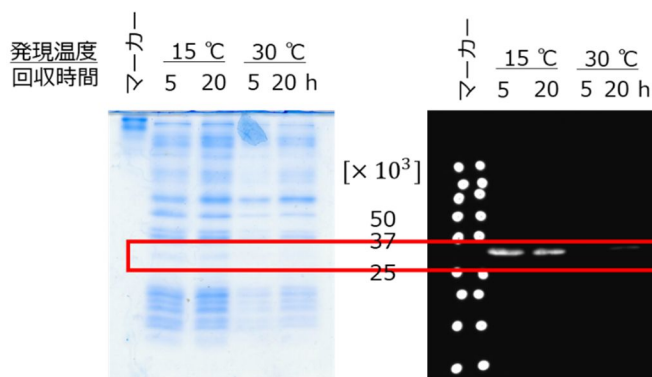


図 3, 抗真菌活性を持つことで知られるのキチナーゼの発現

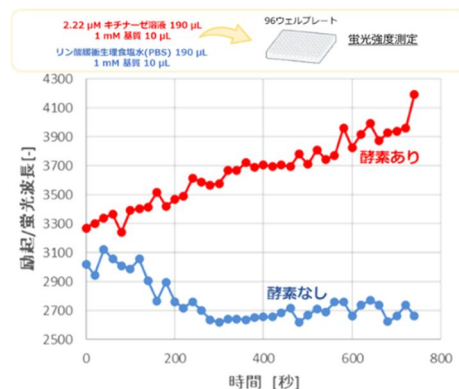


図 4, キチナーゼの活性検出

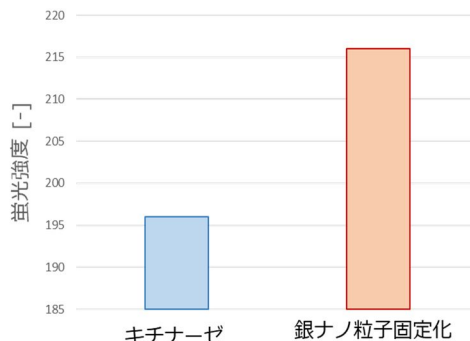


図 5, 銀ナノ粒子表面へのクラスター化によるキチナーゼの活性向上

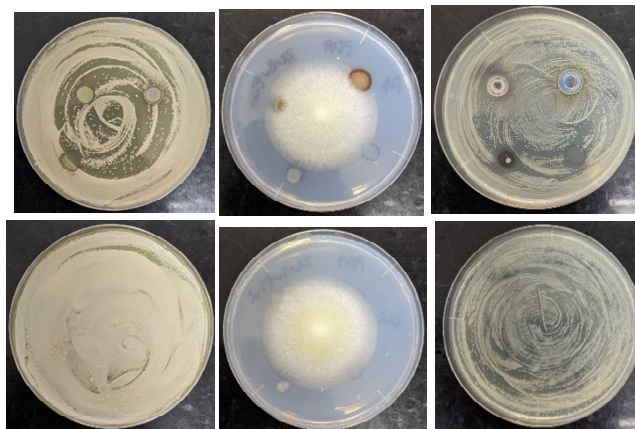


図 6, 抗真菌効果の検証

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Asami, Umetsu Mitsuo, Nakanishi Takeshi, Hashikami Kentaro, Nakazawa Hikaru, Hattori Shuhei, Asano Ryutarou, Kumagai Izumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemically Crosslinked Bispecific Antibodies for Cancer Therapy: Breaking from the Structural Restrictions of the Genetic Fusion Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 711-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21030711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim Kyongwan, Subramaniam, Selvaraj, Galaleldeen Ahmad, Nakazawa Hikaru, Umetsu Mitsuo, Winfried Teizer, Bhattacharyya Sanjib	4. 巻 2
2. 論文標題 Nanoparticle assisted remodeling of proteotoxic SOD1 mutants alters the bio-interface of the functional interaction of microtubules and kinesin motors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Appl. Bio Mater.	6. 最初と最後の頁 4121-4128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Hirose Tatsuya, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai	4. 巻 1
2. 論文標題 Identification of Indium Tin Oxide Nanoparticle-Binding Peptides via Phage Display and Biopanning Under Various Buffer Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein and peptide letters	6. 最初と最後の頁 27-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929866526666191113151934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Ryota, Saito Yutaro, Nakazawa Hikaru, Hattori Takamitsu, Kumagai Izumi, Umetsu Mitsuo, Makabe Koki	4. 巻 164
2. 論文標題 Impact in stability during sequential CDR grafting to construct camelid VHH antibodies against zinc oxide and gold	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 21 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yutaka, Oikawa Misaki, Nakazawa Hikaru, Niide Teppei, Kameda Tomoshi, Tsuda Koji, Umetsu Mitsuo	4. 巻 7
2. 論文標題 Machine-Learning-Guided Mutagenesis for Directed Evolution of Fluorescent Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2014 ~ 2022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niide Teppei, Manabe Noriyoshi, Nakazawa Hikaru, Akagi Kazuto, Hattori Takamitsu, Kumagai Izumi, Umetsu Mitsuo	4. 巻 35
2. 論文標題 Complementary Design for Pairing between Two Types of Nanoparticles Mediated by a Bispecific Antibody: Bottom-Up Formation of Porous Materials from Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 3067 ~ 3076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.8b03687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中澤 光
2. 発表標題 タンパク質の自動設計は可能になるのか? : ドメインライブラリーアプローチと機械学習支援
3. 学会等名 日本化学会 バイオ関連化学若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤 光
2. 発表標題 蛋白質機能を向上するためのドメインライブラリー設計
3. 学会等名 日本化学会 東北支部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤 光
2. 発表標題 分子認識アプタマー開発における進化分子工学操作の新しい展開
3. 学会等名 日本分析化学会第79回分析化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤 光, 杉山在生人, 二井手哲平, 浅野竜太郎, 梅津光央
2. 発表標題 Dlag Art法を用いた迅速確実なT-cell recruiting抗体スクリーニングプロセス
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikaru Nakazawa, Yuri Ishigaki, Teppei Niide, Mitsuo Umetsu
2. 発表標題 太陽光で活性化される光応答型人工セルラーゼ設計
3. 学会等名 生物工学会若手の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Nakazawa, Yuri Ishigaki, Teppei Niide, Mitsuo Umetsu
2. 発表標題 光に応答して活性化するハイブリッド酵素デザイン
3. 学会等名 酵素工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中澤 光, 石垣友理, 張 鈺爽, 坪井宏和, 幸田明生, 坊垣隆之, 梅津光央
2. 発表標題 CBH触媒モジュール高発現型 人工セルロソームの設計
3. 学会等名 生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Nakazawa, Yuri Ishigaki, Zhang Yushuang, Hirokazu Tsuboi, Akio Koda, Takayuki Bogaki, Mitsuo Umetsu
2. 発表標題 A design of artificial cellulosome with high expression of CBH catalytic module
3. 学会等名 化学工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Nakazawa, Tatsuya Hirose, Takamitsu Hattori, Izumi kumagai, Mitsuo Umetsu
2. 発表標題 Identification of Indium Tin Oxide Nanoparticle-binding peptides by Using Phage display and Biopanning
3. 学会等名 第174委員会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中澤 光	4. 発行年 2019年
2. 出版社 生物工学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 生物工学会誌 バイオメディア 酵素はメカ化できるのか?	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ダイアボディ型BsAbを発現・分泌するビフィドバクテリウム属細菌	発明者 中澤 光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-155792	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 プラスミド一周PCR法を用いたランダム遺伝子プラスミドライブラリー作成方法、それを用いた形質転換体作成方法、および、その方法に使用するキット	発明者 柳沢美貴、中澤光、 二井手哲平、服部峰 充、梅津光央	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-190330	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------