

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700494

研究課題名（和文） ポリマー・アーキテクチャにもとづく高選択性抗菌剤の開発

研究課題名（英文） Development of highly-selective antimicrobial agents based on the concept of polymer architecture

研究代表者

安原 主馬（YASUHARA KAZUMA）

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：90545716

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、耐性菌の発生を誘導しにくい天然の抗菌ペプチドの構造及び作用機構にヒントを得てポリマー分子を設計し、ポリマー骨格構造を厳密にチューニングすることで、高抗菌活性かつ低毒性な抗菌ポリマーの開発を行った。その結果、ポリマーの有する分子構造の違いにより、細胞膜との相互作用様式が変わることがわかった。また、細胞膜との相互作用を制御することで抗菌活性および生体毒性を最適化できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed novel antimicrobial polymers inspired by the features of natural host-defense peptides. Membrane perturbation, which is utilized in this study, is promising approach to achieve antimicrobial activity with minimized production of drug-resistant bacteria. It was clarified that we can control interaction of the polymers with cell membranes by proper tuning of polymer structure. As a result, antimicrobial activity and toxicity to mammalian cells can be tuned by changing polymer structure.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学 生体機能材料

キーワード：抗菌ポリマー、ポリマー・アーキテクチャ、脂質二分子膜、両親媒性ポリマー、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

細菌による感染症の拡大は人類にとって依然として大きな脅威であり、世界死因の第1位（1500万人、WHO World Health Report 2003）を占める。また近年、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）や VRE（バンコマイシ

ン耐性腸球菌）といった薬剤耐性菌による院内感染の拡大がさらなる社会問題となっている。したがって、酵素等のタンパク質をターゲットとした従来の抗生物質とは全く異なるメカニズムで作用する新規な抗菌性物質の開発が急務である。

そこで本研究では、自然界に存在する抗菌活性をもったペプチドの仕組みからヒントを得て、細菌の細胞膜を選択的に認識して結合し、膜構造を攪乱することで抗菌活性を発現するポリマーの開発を行った。細胞膜を攻撃対象とする方法は、特定のタンパク質をターゲットする従来の抗生物質と比較して耐性菌が極めて出現しにくいと考えられている。これまでも単純なカチオン性ポリマーが抗菌活性を示すことが知られているが、同時に宿主に対する毒性が非常に高く、解決すべき大きな課題であった。これは、膜認識部位となるカチオン性基の配置をはじめとするポリマー構造の最適化が不十分であることに起因する。そこで本研究では、ポリマーの側鎖末端に存在する膜認識部位の構造や配置を最適化することで、細胞膜との相互作用を厳密に制御でき、抗菌活性および毒性が自在にコントロール可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題は、細菌の細胞膜を攪乱することで作用する抗菌ポリマーの分子設計指針を、ポリマー・アーキテクチャの観点から明らかにすることを目的とした。従来の抗生物質が全く効かない耐性菌による感染症の拡大は世界レベルの脅威であり、全く異なった機構で作用する新規抗菌剤の開発が急務である。ここでは、耐性菌の発生を誘導しにくい天然の抗菌ペプチドの構造及び作用機構にヒントを得てポリマー分子を設計し、ポリマー骨格構造を厳密にチューニングすることで、高抗菌活性かつ低毒性な抗菌ポリマーの開発を行った。

3. 研究の方法

本研究課題の目的を達成するために、以下の方法により検討を行った。

1) 抗菌ポリマーの設計および合成

ポリマー構造と生物活性の関係を明らかにするために、ポリマーライブラリの構築を行った。細菌の細胞膜に存在する負電荷脂質と効率的に相互作用するよう、アミノ基等のカチオン性側鎖末端を有する水溶性ポリマーを各種合成した。ポリマーの構造は、分子量や共重組成比を変化させることで多様性を付与した。また、より高い選択性を実現するために、末端官能基の構造最適化についても新規モノマーを合成し、重合することで検討した。

2) 生物活性試験

ポリマーの有する生物活性として、抗菌活性および溶血毒性試験を行った。抗菌活性は、*e. coli* ATCC25922 を用いた最小発育濃度 (MIC) 測定で評価し、溶血毒性は 3% (v/v) 羊赤血球を用いた 50%ヘモグロビン漏出濃度

(HC₅₀) を指標として評価した。

3) モデル細胞膜による作用機構評価

抗菌ポリマーと細胞膜の相互作用を物理化学的観点から明らかにするため、モデル細胞膜としてリン脂質ベシクルを用いて検討を行った。具体的には、ベシクル内水相に封入した水溶性蛍光色素の漏出挙動および細胞サイズベシクル (ジャイアントベシクル) の形態変化から、抗菌ポリマーによって誘導される脂質二分子膜の攪乱について評価を行った。また、相互作用をより詳細に評価できる新規なモデル系として脂質二分子膜ナノディスク (パイセル) の開発も行った。

4. 研究成果

1) カチオン性高分子と負に帯電した脂質二分子膜との相互作用解析

細菌の細胞膜は、ホスファチジルグリセロール等の負電荷脂質に富んでいるため、カチオン性基を有する高分子を用いることで、静電相互作用を利用して選択的に結合できると考えられる。そこで、静電相互作用を利用した脂質膜の認識および攪乱の一例として、正電荷を有する水溶性高分子であるポリエチレンイミン (PEI) と負電荷脂質によって形成されたベシクルの相互作用について検討した。蛍光分光法による脂質混合評価および動的光散乱法によるベシクル粒径の測定結果より、PEI は、系中の濃度に依存して異なる相互作用様式を示すことがわかった (図 1)。具体的には、低濃度領域より順に (i) 脂質膜の攪乱が顕著でない領域、(ii) 膜構成脂質の混合を伴って膜融合を誘導する領域および (iii) PEI がベシクル表面を覆うことで膜融合を阻害する濃度領域の 3 領域がそれぞれみられた。PEI 濃度に依存したこれらの挙動は脂質膜表面のゼータ電位と対応し、膜表面に結合したカチオン性ポリマーの密度が相互作用の様式を決定する重要な因子であることが明らかになった。また、PEI の分子量を変えることで、それぞれの相互作用様式に対応する濃度領域を可変できることもわかった。

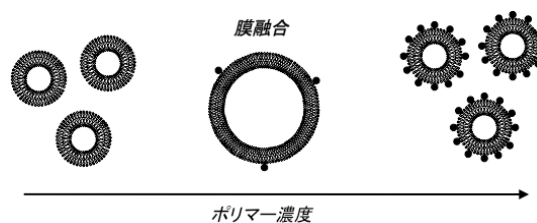


図 1. PEI と負電荷脂質ベシクルの相互作用

他のカチオン性高分子の例として、ポリメタクリレート誘導体とモデル細胞膜の相互作用についてもジャイアントベシクルを用いた顕微鏡観察により評価した。その結果、

カチオン性ポリメタクリレート誘導体は、その親疎水性バランスに応じて細胞膜との相互作用様式が異なり、疎水性側鎖を有するモノマーとカチオン性側鎖を有するモノマーを適切な組成比で重合することで、大腸菌モデル細胞膜のみを選択的に破壊することができることを明らかにした。また、ジャイアントベシクルを用いて得られた結果は、実際の抗菌活性および溶血毒性とよい一致がみられた。カチオン性ポリメタクリレート誘導体は、複数のベシクルが近接している場合においてより低濃度で膜を破壊することから、脂質組成のみならず膜構造の違いも認識して作用することがわかった。以上より、本研究課題で重要となる静電相互作用による脂質膜の認識に関する基礎的知見を得た。

2) 新規モデル細胞膜としての脂質二分子膜バイセル

ここで新たな新規モデル膜として用いたバイセルとは、疎水鎖長が異なる2種類の脂質分子の混合によって得られる脂質二分子膜ナノディスクである(図2)バイセルは、これまでにペプチドをはじめとする膜作用性分子と脂質二分子膜の相互作用解析において用いられてきたが、濃度や温度等の形成条件における制約が大きく、その適用範囲は極めて限定的であった。そこで、本項目ではバイセルの安定性を改善することでより幅広い条件に対応可能なモデル細胞膜の構築を試みた。具体的には、頭部に架橋部位を導入した人工脂質分子を用いてバイセル形成を行うことで、共有結合によるディスク構造の安定化を図った。用いた脂質分子は、頭部にアルコキシシリル基を有しており、水中での自発的なゾル-ゲル反応によってディスク表面にセラミックス様骨格を形成する。得られたバイセルは従来のリン脂質バイセルが構造を維持できない乾燥条件下等でもディスク構造を維持可能であり、これまで適用することのできなかつた実験条件(脂質膜が高い流動性を示す高温条件等)や測定手法(乾燥資料での原子間力顕微鏡観察等)も適用できることを明らかにした。

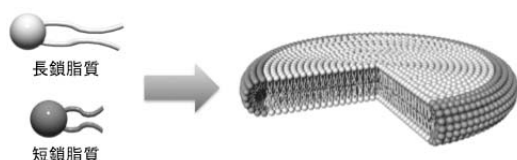


図2. 混合脂質によるバイセルの形成

3) 脂質膜のマイクロ構造制御による低毒性かつ高抗菌活性なポリマーの設計と評価

本項目では、脂質膜のマイクロ構造であるドメイン構造を制御することで達成した低毒性かつ高抗菌活性なポリマーについて述べ

る。ジピコリルアミン(DPA)-亜鉛錯体は、負電荷を有するリン脂質に対して高い親和性を示すことが知られている。ここでは、細胞膜認識部位として側鎖末端にDPAを導入した水溶性ポリマーの合成を行った。得られたポリマーは亜鉛イオンと錯体を形成することで大きく抗菌活性を向上させることがわかった(図3)。得られたポリマー(D-5k)の抗菌活性は天然の抗菌ペプチド(Magainin-2)を遙かに凌駕しているにもかかわらず、溶血毒性を示さないことが明らかになった。また、抗菌活性はポリマーの分子量に依存し、モノマー単体では全く抗菌活性を示さないことが明らかになった。大腸菌の脂質組成を模倣したリン脂質ベシクルを用いた検討結果より、DPA側鎖を有するポリマーは、亜鉛イオン共存下において、マイクロ相分離構造である脂質ドメインの形成を誘導することが明らかになった。このことより、抗菌性ポリマーの活性発現および毒性低減においては、脂質膜におけるマイクロ構造の制御が有効な手法であることを明らかにした。

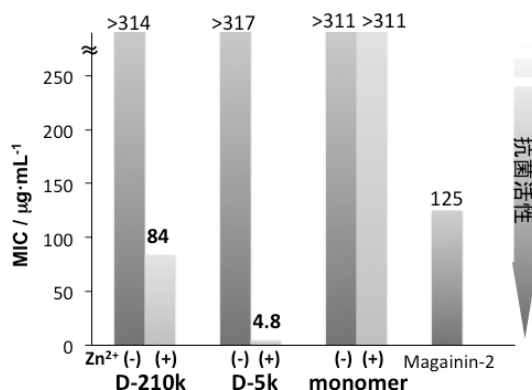


図3. DPAポリマーの抗菌活性

4) まとめと今後の展望

以上より、本研究課題においてはポリマー骨格構造を厳密にチューニングすることで、高抗菌活性かつ低毒性な抗菌ポリマーを得られることを明らかにした。ポリマー構造の最適化により、細胞膜との相互作用が自在に制御可能であり、それにともなって抗菌活性や溶血毒性といった生物活性を調節できることがわかった。本研究で得られた知見は、抗菌ポリマーの開発のみならず、膜透過や細胞接着等の細胞膜との相互作用を伴う生体機能性高分子の設計においても幅広く応用可能であると期待される。

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7件)

- ① K. Yasuhara, (他3名, 1番目), Unique concentration dependence on the fusion

of anionic liposomes induced by polyethyleneimine, *Colloid and Surfaces A*, in press. 査読有

- ② K. Yasuhara, (他 9 名, 4 番目) Advantages and Potential of Lipid Membrane- Incorporating Fullerenes Prepared by the Exchange Reaction Method, *Chemistry an Asian Journal*, **7**(3), 605-613, (2012). 査読有
- ③ 安原主馬, 細菌の細胞膜に作用するポリマー抗菌剤の設計, *バイオマテリアル-生体材料*, **29**(4), 282-286, (2011). 査読無
- ④ K. Yasuhara, (他 4 名, 1 番目), Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Bicelles - Lipid Bilayer Nanodiscs Encompassed by Siloxane Surfaces, *Chemical Communications*, **47**, 4691-4693 (2011). 査読有
- ⑤ K. Yasuhara, (他 7 名, 1 番目), Specific delivery of transport vesicles mediated by complementary recognition of DNA signals with membrane-bound oligonucleotide lipids, *Supramolecular Chemistry*, **23**(3-4), 218-225 (2011). 査読有
- ⑥ K. Yasuhara, (他 5 名, 4 番目), Switching of the Enzymatic Activity Synchronized with Signal Recognition by an Artificial DNA Receptor on a Liposomal Membrane, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **9**, 2397-2402 (2011). 査読有
- ⑦ K. Yasuhara, (他 2 名, 2 番目), Remarkable Long-term Stability of Cerasome as an Organic-Inorganic Hybrid Nano-container for Water-soluble Macromolecules, *Chemistry Letters*, **40**(5), 461-463, (2011). 査読有

[学会発表] (計 28 件)

- ① K. Yasuhara, Antimicrobial action of polymethacrylate derivatives with dipicolylamine sidechains, 243rd ACS National Meeting, 2012. 3. 27, San Diego, CA, USA
- ② K. Yasuhara, Antimicrobial action of amphiphilic polymer through membrane perturbation, 1st International Symposium for Next Generation Macromolecular Science, 2012. 3. 21, 奈良県生駒市
- ③ K. Yasuhara, Organic-inorganic Hybrid Vesicle "Cerasome" as Self-assembled Semipermeable Nanocapsule, 2012 International

Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, ISMSC-7, 2012. 1. 30, 2. 1, Dunedin, New Zealand

- ④ K. Yasuhara, Model Membrane Study on the Action Mechanism of Antimicrobial Polymers, 2012 International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, ISMSC-7, 2012. 1. 30, 2. 1, Dunedin, New Zealand
- ⑤ 安原主馬, 細菌の細胞膜に作用する抗菌性ポリマーの設計と作用機構, 第 60 回高分子討論会, 2011. 9. 29, 岡山県岡山市
- ⑥ 安原主馬, 脂質二分子膜を有する有機-無機ハイブリッドナノディスクの形成とバイオ応用, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011. 9. 12, 茨城県つくば市
- ⑦ 安原主馬, ジャイアントベシクルを用いた抗菌性ポリマーによる膜攪乱挙動の可視化, 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 2011. 9. 7, 京都府京都市
- ⑧ 安原主馬, 透過型電子顕微鏡を用いた分子集合体の可視化と評価, 京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク技術講習会, 2011. 8. 1, 奈良県奈良市 (招待講演)
- ⑨ 安原主馬, シロキサン骨格を有する脂質二分子膜ナノディスクの形成, 日本ゾルーゲル学会 第 9 回討論会, 2011. 7. 29, 大阪府吹田市
- ⑩ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質 2 分子膜ナノディスクの形成, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011. 5. 26, 大阪府大阪市
- ⑪ K. Yasuhara, Organic-inorganic hybrid bicelles as supramolecular scaffolds for reconstitution of membrane proteins, 6th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2011. 7. 3, 5, Brighton, UK
- ⑫ K. Yasuhara, Biomimetic Design of Non-toxic Antimicrobial Polymers, Eleventh International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP11), 2011. 1. 27, 愛知県名古屋市 (招待講演)
- ⑬ K. Yasuhara, Fabrication of well-defined organic-inorganic hybrid nanodiscs by the self-assembly of organoalkoxysilane lipid, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010. 12. 16. Honolulu, HI, USA
- ⑭ K. Yasuhara, Interaction of

- amphiphilic polymethacrylate derivatives with lipid membrane and their antimicrobial action, 18th International Symposium on Surfactants in Solution, 2010. 11. 16, Melbourne, Australia
- ⑮ 安原主馬, 両親媒性ポリマーによる細胞膜の認識と抗菌活性第4回バイオ関連化学シンポジウム, 2010. 9. 24, 大阪府豊中市
- ⑯ K. Yasuhara, Formation of organic-inorganic hybrid bicelles and their characteristics, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010), 2010. 9. 20, 千葉県千葉市
- ⑰ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッドナノディスクの形成とその特性, 日本ゾルゲル学会 第8回討論会, 2010. 7. 30, 愛知県名古屋市
- ⑱ K. Yasuhara, Modification of Carbon Nanotubes with Amphiphilic Polymers and Its Bioactivity, Joint Symposium of Post 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular chemistry and The 6th symposium on Host-Guest Chemistry, 2010. 6. 11, 大阪府大阪市
- ⑲ K. Yasuhara, Selective recognition of bacterial membrane by amphiphilic polymers and their antimicrobial activity, 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC2010), 2010. 6. 7, 奈良県奈良市
- ⑳ 安原主馬, 両親媒性ポリマーによる抗菌活性発現とモデル膜による相互作用解析, 第59回高分子学会年次大会, 2010. 5. 27, 神奈川県横浜市
ほか8件

[図書] (計2件)

- ① K. Yasuhara, (他1名, 2番目), Microscopy & Micro/Nano Imaging Techniques: TEM, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, J. W. Steed and P. A. Gale (Eds.), John Wiley & Sons, 633-646 (2011).
- ② K. Yasuhara, (他1名, 2番目), Cerasome: Artificial Cell Membrane with Ceramic Surface, in *Advances in Biomimetics*, A. George (Ed.), INTECH, 231-250 (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安原 主馬 (YASUHARA KAZUMA)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号: 90545716