

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600030

研究課題名(和文)蛋白質マイクロチューブを用いた大腸菌トラップの創製

研究課題名(英文) Synthesis of Escherichia coli Trap using Protein Microtube

研究代表者

小松 晃之 (KOMATSU, Teruyuki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：30298187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質マイクロチューブの一次元内孔空間に微生物を効率よく取り込ませることに成功した。具体的には、多孔性ポリカーボネイト膜を用いた独自の鑄型内交互積層法によりヒト血清アルブミンからなる中空シリンドラ構造のマイクロチューブ(外径 $1.0\mu\text{m}$)を合成し、それが大腸菌(*E. coli* K12株)を捕捉できる“大腸菌トラップ”となることを明らかにした。病原性大腸菌の駆除にも応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Microorganism is efficiently captured into the one-dimensional pore-space interior of protein microtube. We synthesized cylindrical hollow structure composed of human serum albumin by layer-by-layer assembly technique using microporous polycarbonate membrane, and revealed that *Escherichia coli* (*E. coli* K12) is encapsulated into the microtubes (outer diameter: $1\mu\text{m}$). This microtube “*E. coli* trap” might be applicable to eliminate enterohemorrhagic *E. coli* O157.

研究分野：生命分子化学

キーワード：ナノ材料 蛋白質 マイクロチューブ 大腸菌 電子顕微鏡 アルブミン 交互積層法

1. 研究開始当初の背景

生命現象の根幹を支える蛋白質を用いたバイオナノマテリアルの開発に注目が集まっている。特に中空シリンダー構造のナノチューブは、内孔・管壁・外表面にそれぞれ望みの蛋白質を配置するだけで自由に機能設計できるので、応用範囲の広い材料として期待されている。2005年、C. Martinらは、多孔性酸化アルミナ膜を鋳型としたテンプレート合成により、グルコースオキシダーゼからなる蛋白質ナノチューブを初めて作成した¹⁾。しかし、テンプレートを除去する反応条件が過酷(10%リン酸水溶液)であったため、チューブのほとんどはその時点で崩壊してしまい、機能発現には至らなかった。

研究代表者は、収率高い蛋白質ナノチューブの調製法について研究を進め、極性有機溶媒によるポリカーボネイト(PC)膜の瞬間溶解と凍結真空乾燥により、チューブを収率100%で単離できる方法を見出した²⁾。これが端緒となり、一群の蛋白質ナノチューブを合成し、構造と機能の相関を明らかにした³⁾。中でも最内壁に抗体を配置したナノチューブが感染能力を有するヒトB型肝炎ウイルスを選択的に99.9%捕集することを実証した成果⁴⁾は、国際的にも高い評価を受けている(英国化学会 *Chemistry World* 誌、日経産業新聞 2013. 7. 24 など)で広く紹介)。

ナノチューブの分子捕捉に関する展開は清水らの系統的研究⁵⁾があるが、そのターゲットは、ナノ粒子、DNA、ウイルスなどに限られていた。研究者達の目は常に分子・原子レベル(nmワールド)に向けられてきた。しかし逆方向(μm ワールド)を見てみると、実に多くの興味ある対象が存在する。その代表例は最小の生物「バクテリア」である。微生物を“蛋白質中空管の中に捕まえる”という試みはこれまでなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者がこれまで蓄積してきたナノチューブに関する知見をマイクロメートルスケールに拡張し、バクテリアの一つである大腸菌(*Escherichia coli* (*E. coli*))グラム陰性桿菌)を効率よく捕捉できる蛋白質マイクロチューブ「大腸菌トラップ」(図1)を創製することである。中空管の中に“分子”ではなく“生物”を取り込ませる初めての挑戦といえる。捕捉率99%以上、捕えた大腸菌の完全殺菌を最終目標とした。これまでバクテリア捕捉能を有する蛋白質中空シリンダーの報告例はなく、“極微小サイズの生物トラップ”を構築する世界初の試みとなる。得られた成果は、バイオナノ・マイクロマテリアルの分子設計に新たな指針を与えるものと期待される。

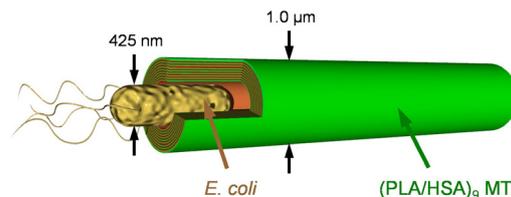


図1. 蛋白質マイクロチューブからなる大腸菌トラップ

3. 研究の方法

(1) 蛋白質マイクロチューブの精密合成と微細構造解析

多孔性PC膜(孔径 $1.2\mu\text{m}$)を鋳型とした交互積層法により蛋白質マイクロチューブを合成した。まず、シリンジポンプを用いてポリカチオン[ポリ-L-アルギニン(PLA)]水溶液(pH 7.1)をPC膜に通過させ正電荷層を作成、続いてヒト血清アルブミン[HSA, Mw: 66.5 kDa、等電点(pI) = 5.0]水溶液(pH 7.1)を通過させ負電荷層を形成した。これらの操作を計9回繰り返した後(合計18層構造)、得られた複合膜をDMF溶液に浸漬すると、瞬時にテンプレートが溶解しLayer-by-Layer構造の蛋白質マイクロチューブ[(PLA/HSA)₉]が得られた。最後に凍結真空乾燥により粉末として単離した。

中空管の外径、内径、管壁厚、長さを走査電子顕微鏡(FE-SEM)、透過電子顕微鏡観察イメージから測定。さらに、酸化鉄(Fe_3O_4)ナノ粒子を第一層に配置した Fe_3O_4 (PLA/HSA)₉マイクロチューブも合成した。

(2) 大腸菌捕捉能の評価

大腸菌(EK1 *E. coli* K12株、外径約425 nm)をLB Broth培地中で培養し(37°C)、遠心分離後、沈殿成分を水に懸濁させ、大腸菌分散液を調製した。それに(PLA/HSA)₉マイクロチューブを加え([MT] = 1.6×10^7 tubes/mL、[*E. coli*] = 1.1×10^7 CFU/mL)、室温で0、15、30分間回転攪拌した後、それぞれLB agarプレートに播種し37°Cで培養、16時間後のコロニー形成数を測定した。

また、フルオレセイン標識HSA(F-HSA)を用いて合成した(PLA/HSA)₇(PLA/F-HSA/PLA/HSA)マイクロチューブを純水に分散し、5-シアノ-2,3-ジトリルテトラゾリウムクロリド(CTC)で蛍光染色した大腸菌(CTC-*E. coli*)を加え([CTC-*E. coli*] = 1.1×10^7 CFU/mL、[MT] = 1.6×10^7 tube/mL)、30分間静置した後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察を行った。

捕捉された大腸菌の生存率は、WSTアッセイにより評価した。

(3) 銀ナノ粒子含有蛋白質マイクロチューブの合成

既報⁶⁾に従い、硝酸銀、クエン酸三ナトリウムを原料として、均一な銀ナノ粒子 (AgNP、粒径 20 nm) を合成した。得られた AgNP を用いて上記 (1) と同様の PC 膜を用いた鋳型内交互積層法により、AgNP を階層成分として含むマイクロチューブを調製した。

4. 研究成果

(1) 蛋白質マイクロチューブの精密合成と微細構造解析

得られた (PLA/HSA)₉ 粉末の FE-SEM 観察から、外径 $1.0 \pm 0.02 \mu\text{m}$ 、管壁厚 $148 \pm 5\text{nm}$ 、長さ約 $25 \mu\text{m}$ の均一なマイクロチューブの形成を確認した (図 2a, b)。単離したマイクロチューブを水中へ分散させると管壁が膨潤し、厚みは 2 倍 (250nm) に増大、内孔径は約 500nm に狭まった (図 2c)。本研究で用いる大腸菌は短径約 425nm 、長さ約 $2 \mu\text{m}$ なので、チューブの内孔に捕捉可能なサイズであるといえる。

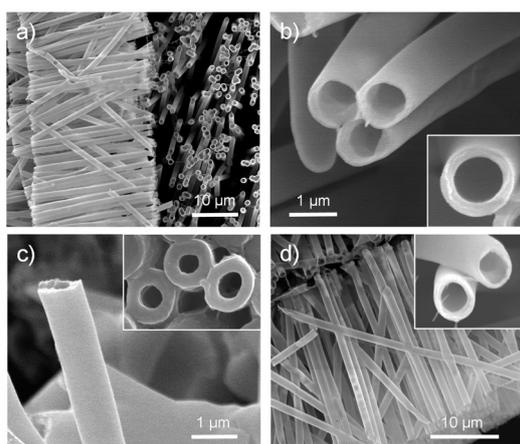


図 2. (PLA/HSA)₉ マイクロチューブの FE-SEM イメージ。a)、b) 凍結乾燥直後の試料。c) 水に分散させて、再度凍結乾燥した試料。d) Fe₃O₄ ナノ粒子を管壁に導入した Fe₃O₄(PLA/HSA)₉ マイクロチューブ。

(2) 大腸菌捕捉能の評価

まず、大腸菌分散液に内径 200nm の (大腸菌の短径より狭い) (PLA/HSA)₃ ナノチューブを加え、コロニーの形成を観測した。16 時間後、多くのコロニーが現れ、形成率は何も入っていないコントロール群と同等であった (図 3a, b)。一方、大腸菌分散液に (PLA/HSA)₉ マイクロチューブを加えた場合、混合時間依存的にコロニー数が減少し、30 分間混合した試料ではコロニーが一つも見られなかった。チューブの内径に依存した明確なコロニー形成率の減少が見られたことから、大腸菌はマ

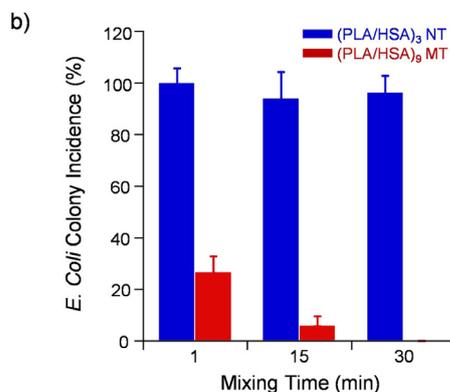
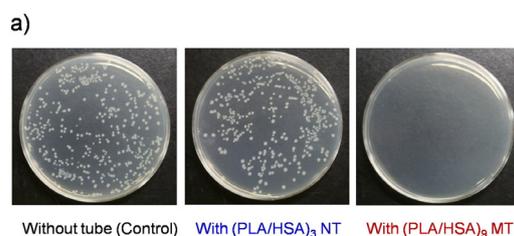


図 3. a) 大腸菌分散液を (PLA/HSA)₉ マイクロチューブまたは (PLA/HSA)₃ ナノチューブと混合した後、LB agar プレートに播種し、37°C で培養、16 時間後に現れた大腸菌コロニーの様子。b) チューブとの混合時間とコロニー形成率の関係 (n=3)。

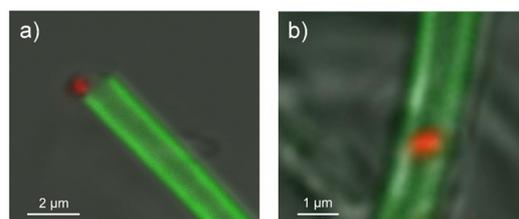


図 4. CTC-*E. coli* を捕捉した (PLA/HSA)₇(PLA/F-HSA/PLA/HSA) マイクロチューブの CLSM イメージ。a) 管口付近に大腸菌を捕捉したマイクロチューブ、b) 管内部に小さな大腸菌を捕捉したマイクロチューブ。

イクロチューブの中に 100% 捕捉されているものと考えられる。

実際に大腸菌がチューブ内部に捕捉されている様子を確認するため、蛍光標識した (PLA/HSA)₇(PLA/F-HSA/PLA/HSA) マイクロチューブと大腸菌 (CTC-*E. coli*) を混合し、30 分間静置後、CLSM 観察を行った。興味深いことに、大腸菌がマイクロチューブの管口部に蓋をするように捕捉されている構造が数多く見られた (Fig. 4a)。これはマイクロチューブの内孔径 (約 500nm) が大腸菌の短径より大きいものの、サイズにあまり差がなく、孔の奥まで侵入することが難しいためと考えられる。まれに小さな大腸菌がチューブ内部に捕捉されている様子も観察された (図 4b)。

(PLA/HSA)₉ マイクロチューブの内孔に大腸菌が捕捉される要件を確かめるため、最内層を HSA からポリスチレンスルホン酸 (PSS) またはポリ-L-グルタミン酸 (PLG) に変えたマイクロチューブを合成し、同様の手順で大腸菌捕捉能を評価した。大腸菌分散液に最内層が PSS、PLG であるマイクロチューブを加えた場合、コロニー形成率はコントロールと変わらず、大腸菌はチューブに捕捉されなかった (図 5)。HSA は細菌表面に発現する様々な物質と結合することが知られている。大腸菌をマイクロチューブ内に取り込むためには、最内層を HSA にする必要があることが明確となった。

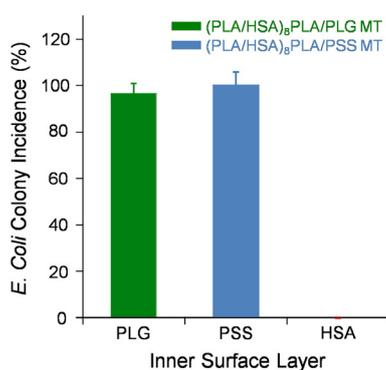


図 5. 大腸菌分散液を再内層が PLG または PSS のマイクロチューブと混合した後、LB agar プレートに播種し、37°C で培養、16 時間後における大腸菌コロニー形成率。

大腸菌の生存率を WST アッセイにより測定した。(PLA/HSA)₉ マイクロチューブとの混合時間が 30 分を超えると、取り込まれた大腸菌はすべて死滅することがわかった。

また、実際の応用スケールを想定して、10⁷ CFU/mL の大腸菌を含む水 1.0 L を用いて同様な実験を行った。(PLA/HSA)₉ マイクロチューブ (150 μg) を添加し、3 時間静置すると、水中か大腸菌は完全になくなった。

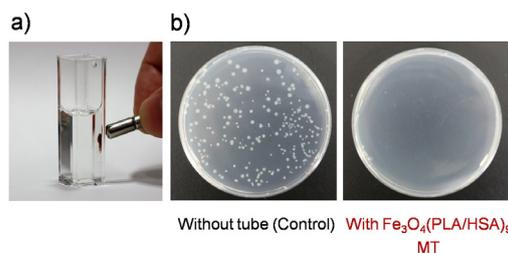


図 6. a) 磁石に引き寄せられた Fe₃O₄(PLA/HSA)₉ マイクロチューブ。b) 大腸菌分散液を Fe₃O₄(PLA/HSA)₉ マイクロチューブと混合した後、LB agar プレートに播種し、37°C で培養、16 時間後に現れた大腸菌コロニーの様子。

最外層に Fe₃O₄ ナノ粒子を配置したマイクロチューブの形態は (PLA/HSA)₉ マイクロチューブと同等であった (図 1e)。そこで、大腸菌分散液に Fe₃O₄(PLA/HSA)₉ マイクロチューブを加え、30 分間混合後、ネオジウム磁石でマイクロチューブを集めた (図 6a)。その上澄みを LB agar プレートに播種し培養したところ、コロニーは一つも観測されなかった (図 6b)。管壁に酸化鉄を導入することにより、大腸菌を捕捉したマイクロチューブを磁石で集めることができるようになった。

(3) 銀ナノ粒子含有蛋白質マイクロチューブの合成

AgNP は負電荷層として使用したが、AgNP 溶液のみでは、形態安定性の高いチューブが得られなかった。そこで、HSA と AgNP の混合溶液を用いて蛋白質マイクロチューブ [(PLA/HSA-AgNP)₉] を作成した。内径、外径、管壁厚、長さを FE-SEM 観察により測定。得られた銀ナノ粒子含有蛋白質マイクロチューブは、さらに高い大腸菌殺菌能を有すると期待される。

以上の成果から、大腸菌を効率よく捕捉できる蛋白質マイクロチューブ すなわち“極微小サイズの生物トラップ”の合成法、構造、有効性を明らかにすることができた。本成果は、病原性大腸菌の駆除にも応用できると考えられ、人類の健康・福祉に与える意義はきわめて大きい。

<引用文献>

- 1) S. Hou, J. Wang, C. Martin, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 231-234.
- 2) X. Qu, T. Komatsu, *ACS Nano* **2010**, *4*, 563-573.
- 3) T. Komatsu, *Nanoscale* **2012**, *4*, 1910.
- 4) T. Komatsu, X. Qu, H. Ihara, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3246-3248.
- 5) T. Shimizu, M. Masuda, H. Minamikawa, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401-1443.
- 6) A. Pyatenko, M. Yamagushi, M. Suzuki, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21608-21611.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nanotube Reactor with a Lipase Wall Interior for Enzymatic Ring-Opening Oligomerization of Lactone. Y. Amano, T. Komatsu, *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 1646-1648. 査読有
DOI: doi.org/10.1246/cl.150789

- ② An *Escherichia coli* Trap in Human Serum Albumin Microtubes. S. Yuge, M. Akiyama, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9640–9643. 査読有
DOI: doi.org/10.1039/C4CC03632H

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 安達 諒、秋山元英、小松晃之、グルコースオキシダーゼを階層成分として有する蛋白質マイクロチューブの合成、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学(京都)、2016 年 3 月 25 日
- ② 中井葉子、小早川聡史、秋山元英、小松晃之、自走する蛋白質マイクロチューブの合成とその大腸菌捕捉能、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学(京都)、2016 年 3 月 25 日
- ③ C. Yamada, M. Akiyama, T. Komatsu, Synthesis and Anticancer Activity of Doxorubicin-Loaded DNA Nanotubes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), Hawaii (USA), 18 Dec. 2015.
- ④ 山田知佳、秋山元英、小松晃之、ドキシソルピシンを導入した DNA ナノチューブの合成と抗がん活性、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、タワーホール船堀(東京)、2015 年 10 月 13 日
- ⑤ T. Komatsu, Protein Nano- and Micro-tubes as Smart Biomaterials, IMS Asian International Symposium “Supramolecular Dynamics at the Interface of Chemistry and Biology”, 分子研(岡崎) 13 June 2015. (招待講演)
- ⑥ M. Akiyama, C. Yamada, T. Komatsu, Preparation and Anticancer Activities of Doxorubicin-loaded DNA Nanotubes、第 64 回高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター(札幌)、2015 年 05 月 29 日
- ⑦ 小早川聡史、小松晃之、自走する蛋白質マイクロチューブの合成、日本化学会第 95 春季年会、日本大学(船橋)、2015 年 3 月 28 日
- ⑧ 山田知佳、秋山元英、小松晃之、ドキシソルピシンを導入した DNA ナノチューブの合成と抗癌活性、日本化学会第 95 春季年会、日本大学(船橋)、2015 年 3 月 28 日

- ⑨ T. Komatsu, “Protein Nanotubes as Smart Biomaterials”, 10th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis (NMS-X), Zhengzhou (China), 12 Oct. 2014. (招待講演)

- ⑩ 小松晃之、タンパク質を用いた機能分子・材料の創製-人工血液からナノチューブまで-、2014 年度 東京理科大学総合研究機構「分子連関相乗系研究部門」セミナー：「生体分子を利用した分子連関相乗系の化学」、東京、2014 年 7 月 26 日(招待講演)
- ⑪ 弓削秀太、秋山元英、小松晃之、大腸菌捕捉能を有する蛋白質マイクロチューブ、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2014 年 5 月 30 日

[図書] (計 1 件)

- ① タンパク質ナノチューブの合成と応用展開。 小松晃之、秋山元英、*超分子材料の設計と応用展開*、監修：原田 明、p. 64-71、シーエムシー出版(2014)

[その他]

- ① 本成果がイギリス化学会のニュース Chemistry World (2014 年 6 月 25 日) で紹介された
<http://www.rsc.org/chemistryworld/2014/06/human-serum-albumin-microtubes-escherichia-coli-drinking-water>
- ② 本成果が日本経済新聞(2014 年 10 月 22 日) で紹介された
「雨水浄化、設備要らず たんぱく質で大腸菌除去 中央大」
http://www.nikkei.com/article/DGXLASDG2201L_S4A021C1CR0000/
- ③ 生命分子化学研究室ホームページ
日本語版：<http://www.chem.chuo-u.ac.jp/~komatsu-lab/index.html>
英語版：<http://www.chem.chuo-u.ac.jp/~komatsu-lab/en/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 晃之 (KOMATSU, Teruyuki)
中央大学・理工学部・教授
研究者番号：3 0 2 9 8 1 8 7

(2) 連携研究者

秋山 元英 (AKIYAMA, Motofusa)
中央大学・理工学部・助教
研究者番号：9 0 4 6 7 6 9 7