

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05547

研究課題名(和文) ナノトポグラフィ金属表面における細菌の生命活動

研究課題名(英文) Bacteria on nanotopographic metals

研究代表者

袴田 昌高 (Hakamada, Masataka)

京都大学・エネルギー科学研究科・准教授

研究者番号：30462849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノポーラス金基板上で培養した大腸菌の生菌数を平滑金の場合と比較することで、金属のナノトポグラフィがもたらす抗菌性の起源を解明することを目的とした。ナノポーラス金を作製し、種々の相対湿度で抗菌性試験を行った結果、中間程度の湿度で抗菌活性が高まった。このことは、ナノポーラス金の抗菌作用には細菌とナノポーラス金基板の直接接触が必要であることを示唆している。タンパク質発現解析や弾性率評価、シミュレーション等も組み合わせ、ナノポーラス金の抗菌性の由来が物理的に細胞膜を破壊するような単純なものではなく、分子～原子オーダーの複雑な現象が影響していることを示した。

研究成果の概要(英文)：The origin of high antibacterial properties of nanoporous gold is examined by comparison with flat gold. The tests of antibacterial properties against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus epidermidis* under various relative humidity suggest that the direct contact between nanoporous gold substrate and bacteria is necessary for killing bacteria. This is different from conventional antibacterial metals and alloys which emits diffusive species such as reactive oxygen species and metallic ions. The measurement of elastic modulus of *E. coli* cultured on gold substrates revealed that the *E. coli* on nanoporous gold was more stiffened than that on flat gold, which is contrary to the expectation. Atomic simulation and gene expression analyses suggested that the antibacterial mechanism of nanoporous gold is not merely due to the mechanical fracture of cell membrane but originated from complex and subtle conformational change in component such as peptidoglycan and ion channels.

研究分野：工学

キーワード：ナノポーラス 金 抗菌

1. 研究開始当初の背景

ナノポーラス金属は nm オーダの微細孔径を持つスポンジのような金属材料であり、金属のナノ骨格とナノ気孔が 3 次元的に張りめぐらされた網目状構造を有している。電解液中で合金の特定の元素を溶出させる「脱合金化」という簡便なプロセスで作製可能なナノポーラス金属は、2001 年の報告 (*Nature* 410 (2001) 450) 以降、国内外で盛んに研究されている。その内容はナノポーラス構造の形成原理追求から力学・化学・電磁気学的特性などの特異性解明にまで及ぶ。

一方、細胞の増殖・分化・死滅等の活動はその周囲の環境に敏感である。特に、近年のナノ構造形成技術の発達により、nm スケールの微細な材料表面形状がそこに培養された細胞の生命活動に大きく影響することがわかってきた (*Science* 310 (2005) 1135)。例えばナノ溝パターンを有する高分子材料の表面で平滑筋細胞を培養した場合、材料種そのものよりも表面ナノ構造 (形状) の影響の方がはるかに大きいという報告もある (*Biomaterials* 26 (2005) 5405)。つまり、細胞は外界 (細胞外基質) に含まれるフィブロネクチン (細胞接着性糖タンパク質の一種) 等のタンパク質を認識し、それにもとづいて細胞分裂の際の遺伝情報を書き替えているが、そのタンパク質の認識過程にナノ構造が少なからず影響を与えている事実がわかりつつある。しかし異なる研究者の実験結果が相反するなど不明点も多く、細胞活性がナノ構造にどのように影響されるのか、活発に討議されている。

代表者の以前の研究で、ナノポーラス金の大腸菌および表皮ブドウ球菌に対する抗菌性が示され、ナノポーラス金の有機物に対する触媒的な特異性が影響していることが示唆された (科研費研究課題若手 B 24760572) が、詳細な抗菌メカニズムの解明にはなお研究の余地が大きい。大腸菌や表皮ブドウ球菌の生命活動のどの部分にナノポーラス金が影響して抗菌性能の発揮に至ったかを、追加分析等で考察する必要がある。

2. 研究の目的

ナノポーラス金基板上で培養中の細菌形状・細胞膜強度の「その場測定」を試み、遺伝子発現・タンパク質解析をも交え、平滑金の場合と比較することで、金属のナノトポグラフィがもたらす抗菌性の起源を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. ナノポーラス金・平滑金試料作製

市販の洗浄済みスライドガラスを基板としてスパッタリングと脱合金化を組み合わせることにより、ナノポーラス金を作製した。まずスライドガラスに金を所与の厚さスパッタリング製膜し、ついで金銀合金をスパッタリングした。このように積層した試料を 70

質量%硝酸に種々の温度で浸漬し (脱合金化) 孔径の異なるナノポーラス金を作製した。また、比較対象として、金のスパッタリングのみを行い、金銀合金のスパッタリングおよび脱合金化を行わないことで、ナノポーラス構造を有しない平滑金も作製した。作製した基板の微視構造を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

3-2. 抗菌性試験

抗菌性試験には JIS Z 2801 に準じた手法を用いた。すなわち、3-1. で作製したナノポーラス金基板および平滑金基板に菌液約 0.4 mL を滴下しその上にフィルムをかぶせ、308 K で 24 時間培養した。この培養の際の相対湿度を 15 ~ 90% で変化させた。培養後の菌液を洗い出して回収し、その洗い出し液から 10 倍希釈系列希釈液を作製し、寒天平板培養法により菌数を計測した。

なお上記 JIS では病原性の高い BSL (バイオセーフティレベル) 2 の細菌 (大腸菌・黄色ブドウ球菌など) の使用が指示されているが、研究設備の制限により BSL2 の細菌は扱えないため、代替として大腸菌 K-12 株 (NBRC 3301) および表皮ブドウ球菌 (NBRC 100911) を用いた。

3-3. 大腸菌の弾性率評価

3-2. の条件でナノポーラス金基板および平滑金基板上で培養したあとの大腸菌をリン酸緩衝溶液 (PBS) によって回収し、ポリリジン被覆を施したスライドガラス上に滴下した。20 分後水洗により余剰な大腸菌等を除去し、走査プローブ顕微鏡 (SPM) により観察し、大腸菌の中央部に SPM のプローブを押し込み、荷重変位曲線を取得することによる弾性率評価も行った。弾性率の計算は JKR モデルに基づいて行った。

3-4. 大腸菌の遺伝子発現解析

ナノポーラス金基板および平滑金基板上で培養した大腸菌をマイクロアレイ解析に供し、遺伝子オンロジーに基づく総体的な遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

SEM 観察により、ナノポーラス金基板表面に孔径約 20 ~ 50 nm のナノポーラス構造が形成されていること、また、平滑金基板表面にはナノポーラス構造が形成されていないことも確認した。

ナノポーラス金基板・平滑金基板の抗菌性試験の結果を図 1 に示す。相対湿度 60% の場合、大腸菌・表皮ブドウ球菌のいずれについても、平滑金基板の表面上での生菌数は対照試料であるポリエチレンフィルムと大差なかったのに対し、ナノポーラス金基板の表面上での生菌数は大きく減少した。特に、孔径が小さいナノポーラス金において生菌数が顕著に減少した。

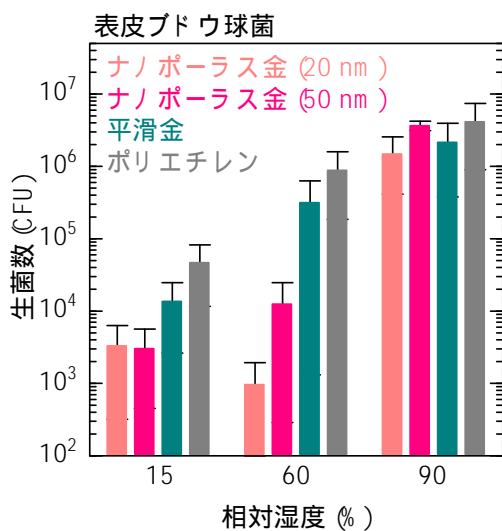
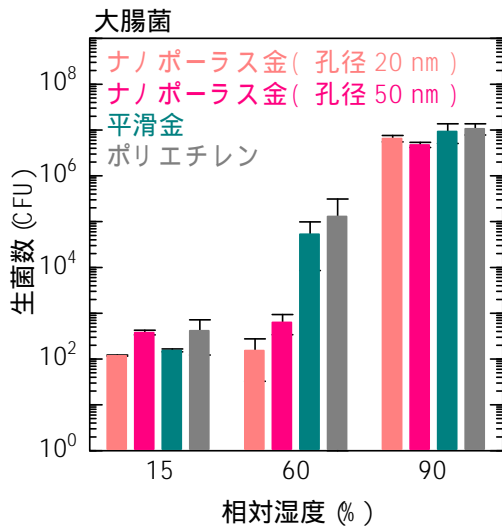


図 1 ナノポーラス金基板および平滑金基板上で培養した大腸菌および表皮ブドウ球菌の生菌数

一方で、相対湿度が約 15%および 90%で培養した場合のナノポーラス金の抗菌活性は、特に大腸菌の場合では平滑金の場合と大差なかった。

相対湿度約 15%での培養後には蒸発（乾燥）により菌液がほとんどなくなっており、ナノポーラス金基板・平滑金基板のいずれにおいても生菌数が少なくなっていた。相対湿度が低い場合には（基板の影響でなく）乾燥によってナノポーラス金・平滑金のいずれにおいても菌が死滅したことが示唆される。ただし、乾燥により強い表皮ブドウ球菌では、生き残った菌がナノポーラス金の直接接触（後述）を必要とする抗菌作用で死滅した結果、平滑金よりも有意に生菌数が少ないものと推測される。

また、相対湿度約 90%での培養後は菌液が培養開始後とほぼ同じ量だけ残っており、一方、相対湿度約 60%での培養後に残っていた菌液の量は蒸発によりある程度減少してい

た。湿度が 90%と高く菌液が十分にある場合、細菌の基板への接触頻度が低く、それに対し、中間程度の湿度で菌液がある程度減少すると、細菌の基板への接触頻度が高くなると考えられる（図 2）。

中間程度の湿度でナノポーラス金の抗菌活性が高まったことは、ナノポーラス金の抗菌作用には細菌とナノポーラス金基板の直接接触が必要であることを意味している。これは従来の金属の抗菌機構、すなわち金属イオンや活性酸素等の拡散種による抗菌と大きく異なり、ナノポーラス金独自の抗菌機構があることを強く示唆する。

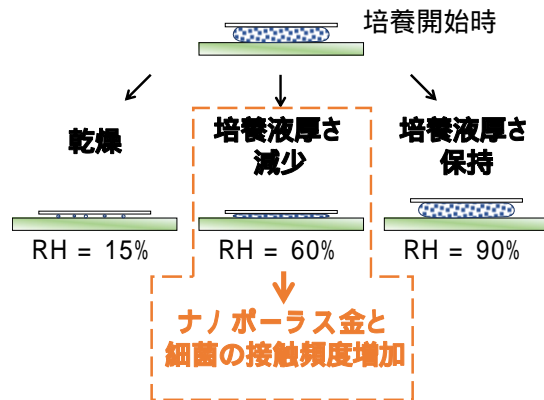


図 2 相対湿度と菌液厚さ、基板と細菌との接触頻度の関係

両基板上で培養された大腸菌のマイクロアレイ解析の結果を表 1 に記す。ナノポーラス金基板によって、平滑金に比べて大腸菌の膜機能が影響を受けていることが示された。図 2 に示した基板との接触頻度と湿度の関係からも、ナノポーラス金が菌体と直接接触し、細胞膜に影響を直接及ぼすことで抗菌性が発現することが示唆される。

表 1 マイクロアレイ解析結果（ダウンレギュレーション）

GO 分類	遺伝子数
リボソーム	5
膜・ペリプラズム	19
代謝	12
DNA 結合	10
イオン結合	6

ナノポーラス金基板ならびに平滑金基板上で培養した大腸菌の細胞壁の弾性率を評価した。本研究では当初、液中 SPM を用いて培養液中での弾性率のその場測定を目指し検討を行ったが、大腸菌の運動によりプローブの押し込み位置決定が困難であるなど、研究期間内にその場測定を可能にすること

ができないと判断し、基板で培養したのちに大腸菌を PBS で回収し、ポリリジンによりスライドガラス上に固定したうえで SPM による弾性率測定に供した。

その結果、図 3 に示すように、平滑金上で培養した大腸菌の細胞膜の弾性率は無垢の (= 基板上での培養を經ていない) 大腸菌のものと有意な差がなかったが、ナノポーラス金上で培養した大腸菌の細胞膜の弾性率は無垢の大腸菌のそれより大きくなった。

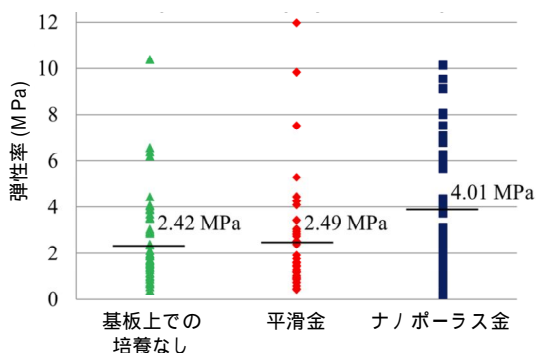


図 3 平滑金基板およびナノポーラス金基板上で培養した大腸菌の細胞膜の弾性率 (示された数値は平均値)

別途行った、ナノポーラス金表面の特異な電子状態 (分極) を考慮した第一原理計算によっても、ナノポーラス金が細胞膜 (壁) を構成するペプチドグリカンの弾性率を上昇させることが示された。これらのことから、物理的にナノポーラス金が大腸菌の膜構造を破壊するという単純なメカニズムではないことがわかる。

さらに別途行った、膜電位をモニタリングする蛍光プローブ物質を用いた蛍光観察から、ナノポーラス金がペプチドグリカンの過度な分極を引き起こしていることが示唆され、また、分子動力学計算によれば、ナノポーラス金表面の影響で分極したペプチドグリカンがカリウムイオンチャネルの機能を阻害することが示された。

以上のように、ナノポーラス金の抗菌性の由来は物理的に細胞膜を破壊するような単純なものではなく、分子~原子オーダーの複雑な現象が影響していることが示された。

その他の研究として、別のナノトポグラフィ金属素材として開発したナノデンドライト金を電極として電解殺菌を行うと、平滑金、またナノポーラス金に比べて効率よく大腸菌液を滅菌できることを示した。

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 3 件)

- [1] Masataka Hakamada, Seiji Taniguchi and Mamoru Mabuchi, “Antibacterial activity of

nanoporous gold against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*”, *Journal of Materials Research* **32**(9), 1787–1795, 2017. (査読有)

DOI: 10.1557/jmr.2017.157

- [2] Naoki Miyazawa, Masataka Hakamada and Mamoru Mabuchi, “Antimicrobial mechanisms due to hyperpolarization induced by nanoporous Au”, *Scientific Reports* **8**, 3870, 2018. (査読有)

DOI: 10.1038/s41598-018-22261-5

- [3] Soichiro Deguchi, Masataka Hakamada and Mamoru Mabuchi, “Sterilization by a pulsed electric field with dendritic gold electrodes”, *Materials Transactions*, 掲載可・印刷中 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- [1] Masataka Hakamada and Mamoru Mabuchi, “Antibacterial properties of nanoporous gold”, 9th International Conference on Porous Metals and Metallic Foams, 2015.

- [2] 袴田昌高、谷口清二、馬淵守、ナノポーラス金の抗菌特性、日本金属学会秋期 (第 157 回) 講演大会、2015 年

- [3] 袴田昌高、加藤直樹、龍田星奈、新宮淳平、馬淵守、ナノポーラス金属と細菌・細胞、日本金属学会秋期 (第 159 回) 講演大会、2016 年

- [4] 新宮淳平、袴田昌高、馬淵守、ナノポーラス金上での HeLa 細胞の活性、日本金属学会秋期 (第 159 回) 講演大会、2016 年

- [5] 龍田星奈、袴田昌高、馬淵守、ナノポーラス金の抗菌性評価とメカニズム解明、日本金属学会秋期 (第 159 回) 講演大会、2016 年

- [6] 宮澤直己、袴田昌高、馬淵守、抗菌性ナノポーラス金と細菌細胞壁の相互作用の原子・電子シミュレーション、日本金属学会秋期 (第 159 回) 講演大会、2016 年

- [7] 袴田昌高、馬淵守、ナノ構造金属と細菌・細胞、日本金属学会春期 (第 160 回) 講演大会、2017 年

- [8] 宮澤直己、袴田昌高、馬淵守、抗菌性ナノポーラス金がイオンチャネルに及ぼす影響の分子動力学計算、日本金属学会秋期 (第 161 回) 講演大会、2017 年

- [9] 新宮淳平、袴田昌高、馬淵守、ナノポーラス金による細胞培養液中フィブロンectin 濃度の減少、日本金属学会秋期 (第 161 回) 講演大会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

袴田昌高 (HAKAMADA, Masataka)

京都大学・大学院エネルギー科学研究科・准教授

研究者番号 : 30462849