

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550065

研究課題名(和文) 酵母細胞におけるナノ粒子の取込現象の解明とその制御技術の開発

研究課題名(英文) Introduction of nanoparticles into yeast cells and development of the control technology

研究代表者

野村 俊之 (Nomura, Toshiyuki)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00285305

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)：酵母細胞と正帯電ポリスチレンラテックス(PSL)ナノ粒子をモデルとして、細胞壁を備えた細胞へのナノ粒子の導入について検討を行った。その結果、アニオン性カルボキシメチルセルロースを用いると、生きた酵母細胞へのPSLナノ粒子の導入が促進されることが分かった。また、PSLナノ粒子を取り込んだ細胞のRNA-Seq解析を行った結果、細胞は取り込んだナノ粒子からストレスを受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the introduction of nanoparticles into cells equipped with a rigid cell wall. Yeast cells were used as model microbial cells, and the positively charged polystyrene latex (PSL) nanoparticles were used as model nanoparticles. As a result, we successfully demonstrated that the introduction of the PSL nanoparticles into the living yeast cells could be promoted using anionic carboxymethylcellulose. In addition, the RNA-Seq analysis of the yeast cells which took in the PSL nanoparticles were performed. As a result, it was suggested that the cells were subjected to stress from the nanoparticles.

研究分野：微粒子工学

キーワード：ナノ粒子 酵母 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

工業的に製造されたナノ粒子の生体影響は未だ明らかにされておらず、環境中に拡散・蓄積されたナノ粒子が生態系に及ぼすメカニズムの解明は社会的急務である。研究代表者は、正帯電ポリスチレンラテックス (PSL) ナノ粒子が酵母細胞を被覆する際、周囲のイオン強度を変えるとナノ粒子が能動的に細胞内に取り込まれて細胞死を回避することを共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により発見した。緻密な網目構造の細胞壁を持つ細胞が能動的に異物を取り込むことは稀であり、『生きた酵母細胞にナノ粒子を導入できる』興味深い成果である。細胞壁を持つ酵母の場合、その成果は植物細胞への応用が期待できる。例えば、農業分野では、施肥や農薬散布は、人的負担が大きい上に、植物への吸収効率も低く、大部分を土壌や環境中 (生態系) に散布しているようなものである。しかし、狙った植物器官からそれらを吸収させることが出来れば、負担や無駄の軽減による高効率化が達成でき、画期的な環境負荷低減技術となる。以上のような学術的な背景と知見に基づき、『細胞壁を持つ細胞内へのナノ粒子の取込みが、超効率的な肥料・薬剤投与技術に発展できれば、農業分野における DDS (Drug Delivery System: 薬物送達システム) として確立でき、革新的な次世代農工連携技術に繋がる』と考えたのが本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

近年、ナノ粒子を応用した製品が多数市販されているが、工業的に製造されたナノ粒子の生体影響は未だ明らかにされておらず、その毒性とメカニズムの解明は社会的急務である。ナノ粒子の環境中への放出を製造段階で抑制することは可能である。しかし、製品を使用した消費者が、それらに含まれるナノ粒子を回収することは困難である。環境中に排出されたナノ粒子とその溶出イオンは、水中および土壌中を經由して微生物・植物細胞から食物連鎖内に取り込まると、人間を含めた上位生物に伝播して濃縮され、生態系に悪影響を与えることが危惧される。ナノ粒子はたとえ組成が同じものでも、粒子径、凝集性、形状、官能基、帯電性、比表面積などの多様性を有している。一方、生物も細胞構造や進化過程により多種多様に分類されるため、ナノ粒子の環境毒性は、化学物質のように 1 対 1 対応させることが困難である。そのため、ナノ粒子が生態系に及ぼすリスクに関する知見は圧倒的に不足しているのが現状である。研究代表者は、PSL ナノ粒子をモデル高分子ナノ粒子として用い、その生体影響について網羅的研究を推進してきた。その中で、真核生物のモデル生物である酵母細胞に対して正帯電 PSL ナノ粒子を暴露すると、周囲のイオン雰囲気により、ナノ粒子が能動的に細胞内に取り込まれて細胞死を回避すること

を明らかにした。しかし、ナノ粒子が細胞に取込まれる環境条件は限定されていた。したがって、ナノ粒子の細胞内への導入を人為的に制御できれば、薬物送達システム DDS への応用展開も期待できる。

そこで本研究では、細胞壁を備えた細胞にナノ粒子を導入する技術を開発することを目的として、酵母細胞をモデル細胞、正帯電 PSL ナノ粒子をモデルナノ粒子として、主に下記の事項について検討を行った。

- (1) 細胞に無害な高分子化合物を用いたナノ粒子の動的挙動の制御
- (2) 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたナノ粒子 - 細胞間に働く相互作用力の実測
- (3) 細胞内に導入したナノ粒子の遺伝毒性

3. 研究の方法

(1) 使用した微生物とナノ粒子

真核生物のモデル微生物として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255 株を用いた。YE 培地で培養した酵母細胞は、NaCl 水溶液で 3 回洗浄してから実験に用いた。また、モデルナノ粒子として、公称径 100 nm のアミノ基修飾した正帯電 PSL ナノ粒子 (PS-NH₂) を用いた。

(2) ナノ粒子の動的挙動の制御

分散媒として 5 mM NaCl 水溶液 (低イオン強度) を用いると、PS-NH₂ ナノ粒子が静電引力により酵母表面に付着して細胞は死滅することが分かっている。そこで、ナノ粒子の動的挙動を制御するために、水溶性高分子添加剤として、カルボキシル基を有するアニオン性のカルボキシルメチルセルロース (CMC) とノニオン性のメチルセルロース (MC) を用いた。洗浄した酵母細胞を、高分子添加剤を含んだ 5 mM NaCl 水溶液に分散して 1×10^6 cells/mL に調製した。同様に、高分子添加剤を含んだ 5 mM NaCl 水溶液に PS-NH₂ ナノ粒子を分散して 80 µg/mL に調製した。これらの溶液を 500 µL ずつマイクロチューブに分注し、ダググローターで 60 rpm、室温下で混合した。1 時間暴露後、懸濁液を YE 寒天培地に塗布して 30 °C で 2 日間培養した。培養後のコロニー数から生菌数を計測し、菌体生存率を算出した。菌体生存率は、ナノ粒子懸濁液を含まない分散媒を添加した対照実験を 100% として算出した。また、CLSM を用いてナノ粒子の局在を観察後、トリパブルーで死細胞を染色し、透過像から生死判別を行った。また、ゼータ電位・粒径測定システムを用いてナノ粒子と酵母細胞の粒子径と電気泳動移動度 (EPM) を測定した。

(3) ナノ粒子 - 細胞間に働く相互作用力

AFM を用いて、ナノ粒子 - 細胞間に働く相互作用力を直接測定するため、以下の方法により、チップ先端にナノ粒子を固定したカンチレバーを作製した。まず、カンチレバー (オリパス、TR400PSA、バネ定数 0.08 N/m) をクロロホルム、エタノール、純水の順に 15 分ずつ浸漬した後、プラズマ処理を行った。

次に、5 mM NaOH 水溶液に 15 分間浸漬することで表面に OH 基を浸出させた後、真空脱気することで溶媒を蒸発させ、チップ先端にナノ粒子を蒸着させた。(以後、ナノ粒子プローブと呼ぶ)。このナノ粒子プローブを用いて、5 mM NaCl 水溶液、および高分子添加した 5 mM NaCl 水溶液中における PS-NH₂ - 酵母細胞間に働く相互作用力を測定した。

(4) ナノ粒子の遺伝毒性

細胞内に取り込まれたナノ粒子が生体に及ぼす影響を下記の方法により検討した。

ナノ粒子暴露後の細胞を寒天培地で培養し、形成されたコロニーを液体培地で再培養した。増殖した酵母は、遠心分離により回収し、ナノ粒子を暴露した。以上の操作を複数回繰り返して、生存率とコロニー数を計測した。

酵母細胞をナノ粒子に暴露する時間を変化させ、コロニーカウント法により酵母の生存率を計測した。

マイクロウェルプレートに、液体培地 180 μ L とナノ粒子に暴露する時間を変化させた酵母細胞 20 μ L を添加し、プレートリーダーを用いて、吸光度の経時変化を測定した。

ナノ粒子の暴露時間を変化させた酵母細胞を遠心分離により回収し、タンパク質を抽出した。次に、TCA/アセトン沈殿法を用いて、プロテアーゼ活性を止めてタンパク質溶液を濃縮し、10 μ g/well の濃度でサンプルを 12% アクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った (SDS-PAGE)。

次世代シーケンサーを用いて、ナノ粒子を取り込んだ細胞の RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の動的挙動の制御

水溶性高分子を添加した 5 mM NaCl 水溶液中で酵母細胞に PS-NH₂ ナノ粒子を 1 時間暴露したときの菌体生存率と代表的な CLSM 像を図 1 に示す。高分子添加剤を含まない 5 mM NaCl 水溶液 (Control) では、細胞はナノ粒子に被膜されて死滅していたが、分散媒に CMC を 3 ppm 以上添加すると、ナノ粒子が細胞内に取込まれて大部分の細胞が生存していることが分かった。一方、分散媒に MC を添加しても、細胞はナノ粒子に被膜され死滅しており、高分子添加剤の効果は見られなかった。

次に、高分子添加濃度を変化させたときのナノ粒子と細胞の EPM を図 2 に示す。いずれの水溶性高分子を添加しても酵母細胞の EPM はほぼ一定であることが分かった。一方、ナノ粒子の EPM は、MC を添加してもほとんど変化しなかったが、CMC の添加濃度が 2 ppm から 3 ppm に増加すると、正から負に変化することが分かった。これは、PS-NH₂ ナノ粒子の表面電位が、CMC の添加により帯電極性が正から負に変化したことを意味している。CMC は、カルボキシル基を有したアニオン性高分子であるため、静電引力により PS-NH₂ 表面に吸着することで、ナノ粒子の動的挙動が付着

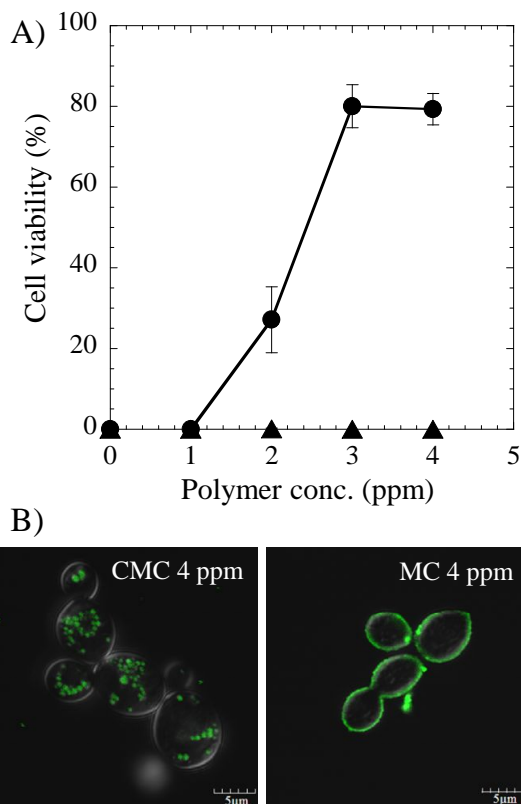


図 1 高分子添加した 5 mM NaCl 水溶液中で酵母細胞に PS-NH₂ ナノ粒子を暴露したときの A) 菌体生存率と B) CLSM 像 (CMC、MC)

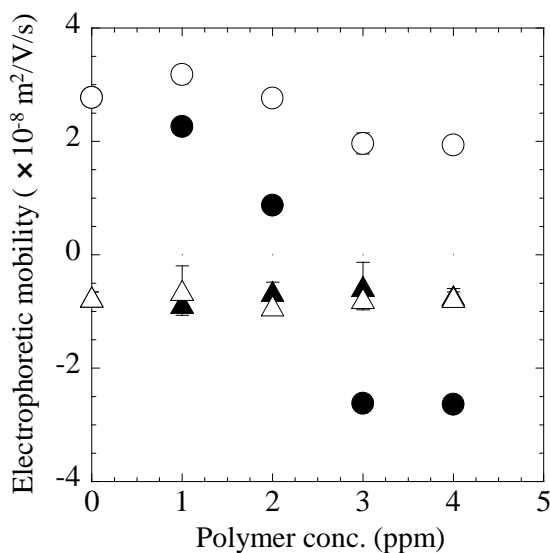


図 2 高分子添加した 5 mM NaCl 水溶液中における PS-NH₂ ナノ粒子と酵母細胞の電気泳動移動度 (PS-NH₂(CMC)、 PS-NH₂(MC)、酵母(CMC)、酵母(MC))

から取込へと変化したものと推察される。一方、ノニオン性の MC は、静電引力が作用しないため、ナノ粒子表面に十分吸着しなかったものと推察される。

(2) ナノ粒子 - 細胞間に働く相互作用力

AFM を用いて、5 mM NaCl 水溶液に水溶性高分子を添加したときにナノ粒子 - 細胞間に働く相互作用力の直接測定を行った。図 3A

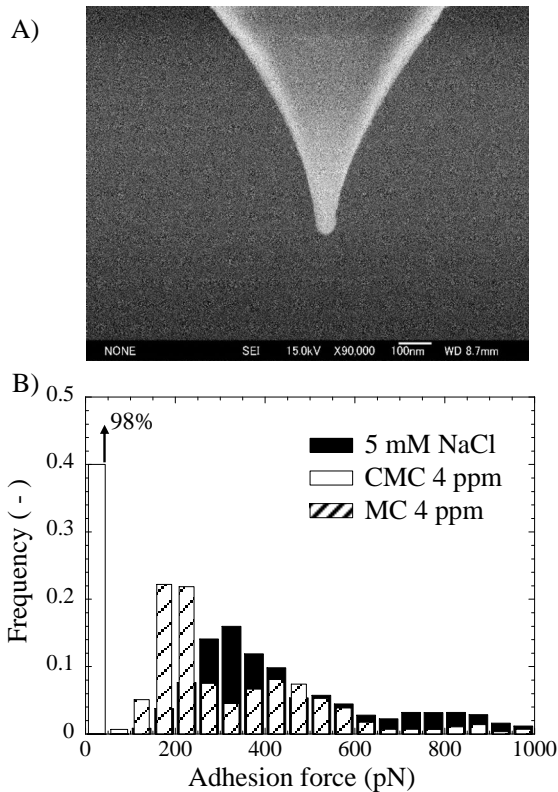


図3 A) ナノ粒子プローブのSEM像、B) 5 mM NaCl 水溶液に高分子を添加したときのナノ粒子 - 酵母細胞に働く付着力分布

に用いたナノ粒子プローブのSEM像を示す。これより、チップ先端にナノ粒子1個が固定されていることが確認できた。ナノ粒子 - 細胞間に働いた付着力のヒストグラムを図3Bに示す。5 mM NaCl 水溶液 (Control) では、約 400 pN の強い付着力が作用していたが、分散媒に CMC を 4 ppm 添加すると、付着力が劇的に減少して 20 pN 以下となることが分かった。一方、MC を 4 ppm 添加しても、260 pN と強い付着力が作用していた。以上より、アニオン性高分子を分散媒に添加し、正帯電 PSL ナノ粒子表面に吸着させることで、生きた細胞内へのナノ粒子の導入が可能であることが分かった。

(3) ナノ粒子の遺伝毒性

PS-NH₂ ナノ粒子を取り込んだ酵母細胞の培養と PS-NH₂ ナノ粒子の暴露を繰り返したときの生存率とコロニー数を図4に示す。細胞の生存率は、繰り返し回数によらず一定であったが、寒天上に形成されるコロニー数は、徐々に減少することが分かった。このことは、細胞がナノ粒子を取り込むことで、何らかの悪影響を受けていることを示唆している。次に、酵母細胞をナノ粒子に暴露する時間を変えたときの生存率を図5に示す。暴露時間が12時間以上となると、生存率が急激に減少することが分かった。さらに、これらナノ粒子暴露後の酵母細胞を新しい液体培地に植菌し、プレートリーダーを用いて計測した増殖曲線を図6に示す。細胞の比増殖速度と最終菌体濃度はほぼ影響は見られなかったが、誘

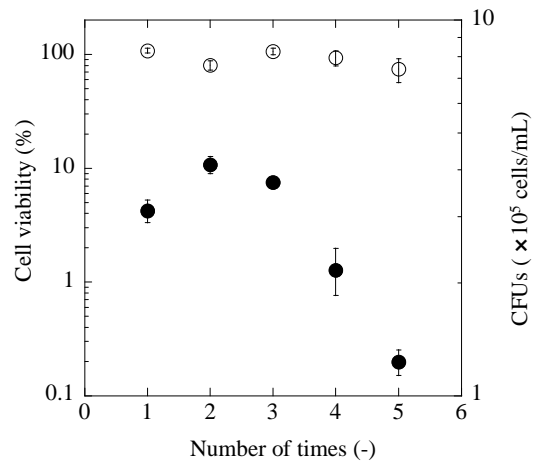


図4 PS-NH₂ ナノ粒子を取り込んだ酵母細胞を繰り返し培養したときの菌体生存率 (○) とコロニー数 (●)

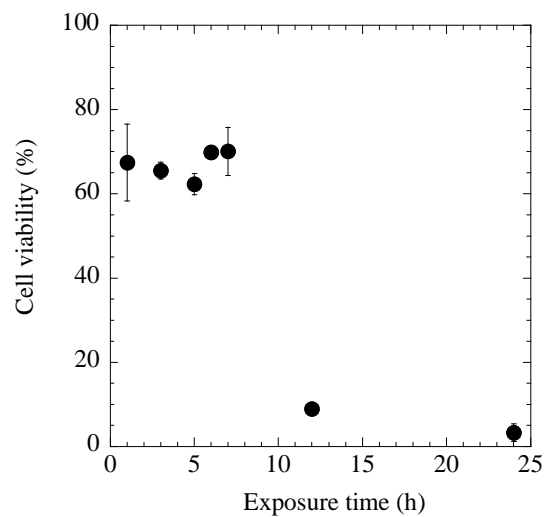


図5 菌体生存率と暴露時間の関係

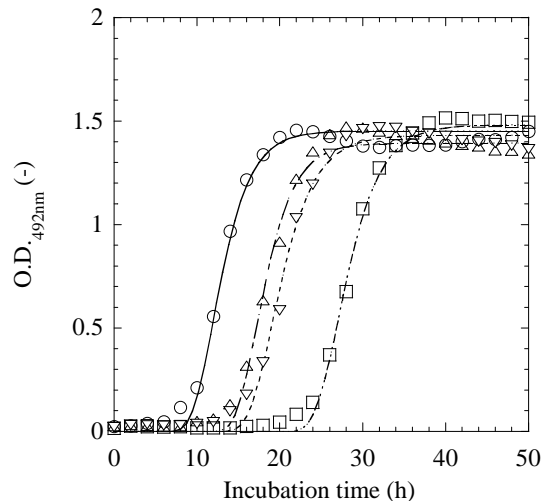


図6 PS-NH₂ ナノ粒子に暴露した酵母細胞の増殖曲線 (1時間、6時間、12時間、24時間)

導期が長くなることが分かった。これは、暴露時間が長くなると、生菌数が減少するためと考えられる。図7に SDS-PAGE の結果を示す。タンパク質の発現バンドに大きな違いは

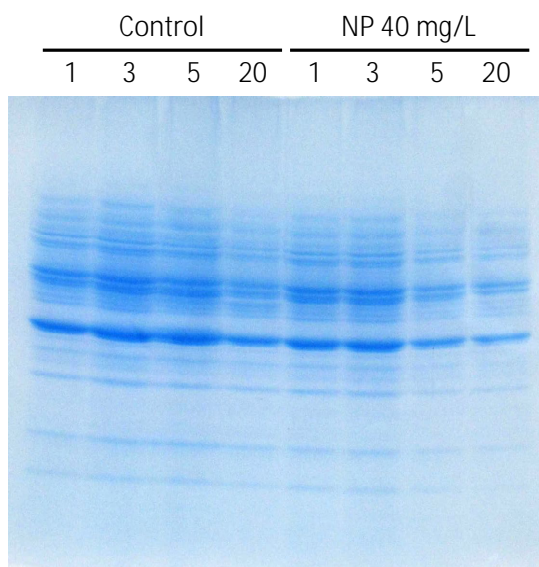


図7 SDS-PAGE

見られなかったが、対照実験では 20 時間でタンパク質の発現量に減少が見られた。これは、分散媒に栄養源がないため、ATP が枯渇して飢餓状態となりオートファージ（自食作用）が起こったと推察される。一方、ナノ粒子を暴露した条件では 5 時間においてタンパク質の発現量が減少することが分かった。以上より、ナノ粒子の暴露時間が 3 時間を超えてくると、細胞内に取り込まれたナノ粒子は生体に何らかの悪影響を及ぼしていることが分かった。最後に、ナノ粒子を取り込んだ細胞の RNA-seq 解析を行った。その結果、細胞壁合成、膜構造維持、サイトスケルトン形成、ストレス応答関連遺伝子の発現がナノ粒子の暴露により亢進しており、細胞内に取り込んだナノ粒子からストレスを受けていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

J. Miyazaki, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Cytotoxicity and behavior of polystyrene latex nanoparticles to budding yeast, *Colloids and Surfaces A*, 469, 287-293, 2015, 査読有
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.046

〔学会発表〕(計 8 件)

弓山翔平, 小西康裕, 野村俊之, 水溶性高分子を用いた PSL ナノ粒子の酵母細胞への付着・取込現象の制御, 2013 年度 LSC 研究成果発表会, 2016/3/5, 福岡大学 (福岡県福岡市)

弓山翔平, 小西康裕, 野村俊之, 酵母細胞へのナノ粒子の付着・取込現象の制御, 2015 年度粉体工学会秋期研究発表会, 2015/10/13-14, 大阪南港 ATC (大阪府大阪市)

S. Toyoda, Y. Kuriyama, Y. Konishi, T. Nomura, Colloidal behavior of

polystyrene latex nanoparticles and their cytotoxicity toward yeast, The 6th Asian Particle Technology Symposium (APT2015), 2015/9/15-18, COEX (Seoul, Korea)

野村俊之 (特別講演), 微生物の界面現象の解析とその利用技術の開発, 先導的重点課題「微粒子の界面制御とスマート接合」第 2 回シンポジウム, 2015/3/6, 大阪大学荒田記念館 (大阪府茨木市)

野村俊之 (依頼講演), バイオコロイド (生きた微生物) の界面現象の解析とその利用, NEPTIS-23, 2014/12/19, ステーションコンファレンス東京 (東京都千代田区)

野村俊之, 栗山雄太, 小西康裕, 谷 修治, 高分子ナノ粒子の酵母細胞への取込現象の解明, 第 5 2 回粉体に関する討論会, 2014/9/25-27, じばさんびる (兵庫県姫路市)

栗山雄太, 小西康裕, 野村俊之, 酵母細胞への高分子ナノ粒子の付着・取込現象の評価, 第 4 6 回化学工学会秋季大会, 2014/9/17-19, 九州大学 (福岡県福岡市)

栗山雄太, 小西康裕, 野村俊之, 生きた酵母細胞へのナノ粒子の付着・取込メカニズムの解明, 2014 年度粉体工学会春期研究発表会, 2014/5/29-30, メルパルク京都 (京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)
大阪府立大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 00285305

(2) 研究分担者

谷 修治 (TANI SHUJI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号: 80405357