

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12314

研究課題名(和文)糖鎖と酸化チタンを組合せた感染菌を消滅させる製品の開発

研究課題名(英文)Preparation of materials carrying with glycans and titanium dioxide to capture and eliminate specific pathogens

研究代表者

古川 清(FURUKAWA, Kiyoshi)

長岡技術科学大学・工学研究科・名誉教授

研究者番号：10190133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：感染病原菌の多くは、我々の細胞の表面を覆う糖鎖と結合する。糖鎖を濾紙、ビーズ、繊維に固定し、大腸菌やピロリ菌を捕捉することができる。しかしながらこの手法では感染菌を捕捉するだけで、殺菌できない。本研究では酸化チタンを塗布したスライドガラス上に酵母ペーストを円形の島状に固定し、酵母に含まれる糖鎖で大腸菌(検出の目的で蛍光標識)を捕捉し、UVを照射した。その結果、ペーストに結合した蛍光円の大きさが対照に較べ有意に縮小した。以上の結果は、試料をUV照射すると酸化チタンからヒドロキシラジカル等が発生し、大腸菌を酸化チタンと隣接する外周部から殺菌し破壊したためであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A variety of toxic microorganisms such as bacteria and viruses bind to glycans with respective structures at cell surfaces. We prepared the filters and beads carrying glycans to trap bacteria. However, such materials can trap microorganisms but cannot eliminate them. In the present study, we first prepared a slide glass coated with titan dioxide on which yeast pastes were mounted in a disk shape. When it was incubated with fluorescence-labeled E coli, the bacterium was trapped on the yeast pastes showing a fluorescent disk with a diameter of 3.7 mm long on the glass. Then, it was irradiated with a black-lamp (UV) for 2 hours at room temperature, and the size of the fluorescent disk was 2.8 mm long. These results indicate that E. coli trapped at the peripheral zone of the yeast pastes was killed with hydroxyl radicals generated from titan dioxide by UV-irradiation, showing that the combination of glycans with titan dioxide is useful to eliminate specific pathogenic organisms.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：酵母ペースト 選択的捕捉 大腸菌 酸化チタン 光触媒 殺菌

1. 研究開始当初の背景

2014年西アフリカで流行した致死率の高いエボラウイルスによる感染が拡大し、決定的な治療薬や感染を阻止する手段がなく、一時世界をパニックに陥れた。我々の体を構成する約60兆個の細胞はどれもその表面をタンパク質や脂質に結合した糖鎖で覆われており、不幸にも感染症を引き起こす多くの病原菌は細胞表面の糖鎖に結合し、侵入する(感染の成立)。例えばヒト・インフルエンザウイルスは気道で発現するシアル酸(Sia α 2 \rightarrow 6Gal/GalNAc1 \rightarrow R)と、大腸菌はマンノース(Man α 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow R)と、ピロリ菌はルイスb型糖鎖[Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3(Fuc α 1 \rightarrow 4)GlcNAc β 1 \rightarrow R]と結合し、インフルエンザ脳症、出血性大腸炎、胃潰瘍や胃癌を誘発することが知られている。

我々は糖鎖を利用して感染症を防ぐ生活用品や食品を開発するプロジェクト(JST育成研究:H19年度~H21年度)を立ち上げ、*in vitro*でルイスb型糖鎖をビーズやコンニャクへ結合させた製品がピロリ菌を効率よく捕捉することを見だし、さらにマンナンを固定した濾紙やビーズ、マンナンの原料である酵母菌自身をレーヨン繊維に埋め込んだ酵母レーヨンが大腸菌を捕捉できることを報告してきた。実際、1mgのビーズで100万個の大腸菌を捕捉でき、糖鎖を囷としたデバイスの開発は、生活空間に浮遊する様々な病原菌を選択的に捕捉できる可能性を示している。

2. 研究の目的

上記のデバイスは単に特定の病原菌を捕捉するだけで殺菌効果はなく、逆に菌へ増殖環境を与える可能性もある。そこで本研究では糖鎖を固定した材料に光触媒反応により殺菌効果をもつ酸化チタンを担持させ、特定の病原菌(糖鎖の構造に依存)を捕菌し、殺菌する進化型の製品を作製し、その効果を評価する。感染病原菌を捕集し殺菌する製品を作製するため、通常実験室で使用できる大腸菌(K12株 W3110)、大腸菌と結合する高マンノース型糖鎖、酸化チタンを用い、まず糖鎖と酸化チタンを共存させたスライドガラス(両分子を表面に固定し易い)を作製する。この時、スライドガラス上で糖鎖と酸化チタンをどのように配置するかが課題(酸化チタンによる糖鎖の分解を防御)で、種々のアイ

デアで最適な条件を確立する。このデバイスが実際に大腸菌を捕捉し、紫外線による光触媒反応で殺菌する能力があることを示す。また素材や糖鎖を代え、他の病原菌も殺菌できること、安価であることや汎用性があることを目指す。特に糖鎖の調製には原材料が高価なので、安価な糖鎖リガンドの探索を試みる。将来的に、糖鎖の代わりにエボラウイルスの受容体と考えられるHSR5をデバイスに組み込めば、ウイルスの感染拡大を阻止できるデバイスも作ることができるかもしれない。

3. 研究の方法

糖鎖を濾紙(セルロース)やコンニャク(グルコマンナンの多糖)に固定する方法として、糖鎖の還元末端糖をヒドラジド化し、多糖をベースとした素材を過ヨウ素酸で酸化しアルデヒド化し、これらの中で形成されるシッフベースを還元して固定を行ってきた。しかしながらこれら多糖の素材を酸化チタンでコートすることはできないので、まずは糖鎖と酸化チタンをコートできるガラス板(スライドガラス)を用いて、糖鎖と酸化チタンの配置/配合の最適化を検討する。本研究では実験室で扱い易い大腸菌と大腸菌が結合する糖鎖(高マンノース型)を用い、大腸菌を捕集し殺菌できるかどうかを解析し、製品の機能を評価する。

方法1):スライドガラスをプラズマ照射しガラス面の疎水性を増大させる。これに高マンノース型糖鎖が結合したウシ・リボヌクレアーゼB(糖タンパク質)(市販)を固定する(水溶液を滴下し風乾させる)。この時ガラス面は全て糖鎖で覆われるのではないので、酸化チタンをデップ法により処理し、隙間をコートする。

方法2):スライドガラスを最初に酸化チタンでデップ法によりコートし、次に酸化チタン表面に親水性領域を創出し、その親水性領域に糖鎖を結合させる。この酸化チタン表面に親水性領域を創出する。

方法3):スライドガラスに一定間隔で穴(直径2-3mm/大きさは変更化)を開けたシリコンポリマーを作製し、スライドガラスに張り付け、プラズマを照射し、穴の空いた部分のガラス面に疎水性を増大させ、そこに糖タンパク質を固定する。次にシリコンポリマーを剥がし、穴の直径分だけ移動させてスライドガラスに貼付ける。ここで穴に当たる部分は糖タンパク質が結合していないガラス面で、ここに酸化チタンをコートする。この手法ではスライドガラス表面には糖タンパク質と酸化チタンがキメラ模様を出現させる。

次にスライドガラスを大腸菌懸濁液に浸し、糖鎖で大腸菌を捕捉する。このスライド

ガラスを水洗し（水溶液中にスライドガラスを浸し繰り返す）、black lamp を用い紫外線照射を行い、大腸菌の殺菌効果を評価する。評価にはスライドガラスを光学顕微鏡下で検鏡し定性的に判断するか、使用する大腸菌を予め蛍光色素（PKH2 試薬）で標識し、スライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡下で定量的に解析する。

4. 研究成果

(1) 糖鎖リガンドの選定：大腸菌はマンノースに結合することが知られており、まずグリコシド結合を含めた結合特異性を解析した。有機合成した Man α 1-2Man α 1-R, Man α 1-3Man α 1-R, Man α 1-4Man α 1-R, Man α 1-6Man α 1-R をビーズに共有結合で固定し、これらのビーズと蛍光標識をした大腸菌の結合を解析（ビーズ1個当たりに結合した蛍光ドット（大腸菌1個に対応）を計測）すると、大腸菌は Man α 1-2Man α 1-R に強く結合するが、Man α 1-3Man α 1-R や Man α 1-6Man α 1-R にも有意に結合することが判明した（図1）（業績1）。

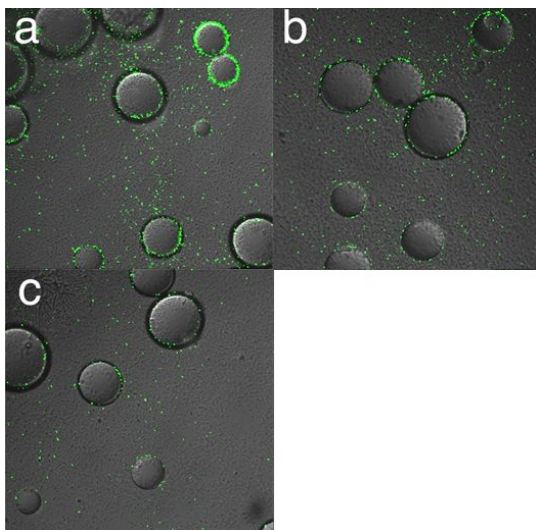


図1 マンノピオースが固定されたビーズへの大腸菌（蛍光標識）の結合。パネル a, b, c は Man α 1-2Man α 1-R, Man α 1-3Man α 1-R, Man α 1-6Man α 1-R が固定されたビーズを含む。

Man α 1-2Man α 1-R は高マンノース型糖鎖に含まれているので、糖タンパク質でこの糖鎖を含むウシリボヌクレアーゼBをスライドガラスに固定し、蛍光標識をした大腸菌の結合度を蛍光の強弱で判定した。その結果、このタンパク質を 10 mg/ml の濃度で固定しても蛍光は弱く、今後の解析に不向きであった。次に Man α 1-3Man α 1-R や Man α 1-6Man α 1-R を含む酵母マンナンをスライドガラスに固定し、同様な実験を行った。しかしながら、リボヌクレアーゼBと同じように強い蛍光を得ることが出来なかった。そこでマンナンの原料である酵母菌を水で膨潤させ乳鉢で摺り潰し（酵母ペースト: 0.1 g/ml）、これをス

ライドガラスに塗布し、固定した。この試料で大腸菌を捕捉すると、強い蛍光が観察され、以降の研究に適することが判明した。

(2) アッセイ系の確立：酸化チタンをスライドガラスにコートする上で単にデップ法により処理しても、スライドガラス上に有意な酸化チタンの層を形成することができなかった。従って、手法1)は採用することができず、本研究では手法2)と3)を改良することから進め、以下のアッセイ系を確立した。まずスライドガラスを酸とアルカリで洗浄後、光触媒ゾル（三菱ガス化学・株）に浸し、最後に加熱焼成した。酸化チタンをコートしたスライドガラス（Matsunami APS コート）の上に直径 8 mm の穴の開いた poly dimethyl siloxane (PDMS)の薄膜（厚さ 2 mm）を張り付け、その中に外径 7 mm/内径 4 mm のドーナツ型のマスキングテープを置き、中心の穴の部分を PDMS でコートした（図2）。中心の PDMS 上に酵母ペーストを固定した（overnight）。この周りを内径 8 mm/外径 10 mm のドーナツ型の PDMS 薄膜（厚さ 0.5 mm）を載せ、このドーナツの穴へ蛍光で標識した大腸菌の懸濁液（100,000 個/50 μ l）を加え 15 min 静置する。その後マスキングテープを剥がし、UV を照射（black lamp, 1.5 mW/cm², 距離 7 cm）し、2 時間後全体にホルマリン（50 μ l）を加え大腸菌をスライドガラス上に固定し（2-3 分）、その蛍光をオールインワン蛍光顕微鏡で観察した。

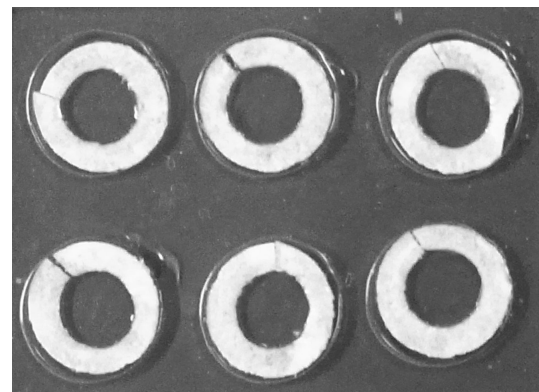


図2 酸化チタンをコートしたスライドガラス上に貼付けたドーナツ型 PDMS 薄膜とマスキングテープ（白）の配置。マスキングテープ内側に酵母ペーストを固定。

(3) 光触媒効果の評価：酸化チタンをコートしていないスライドガラス（対照）に固定した円形の酵母ペースト（直径 4 mm）に捕捉された大腸菌の蛍光の広がりや 2 時間後に蛍光顕微鏡で測定すると、3.7 mm であった（6 試料の平均値）（図3）。酵母ペーストは 4 mm の円内に固定されているが、ペーストの固定（overnight）やその後の 2 時間の照射でペーストの若干の縮小や辺縁部の剥離が見られた。次にもう一つの対照として酸化チタンをコートしていないスライドガラス上の試料に UV を 2 時間照射すると、蛍光円の大きさは

3.5 mmであった(6 試料の平均値)。これは UV 照射により試料の乾燥が若干促進され、辺縁部から大腸菌の一部が僅かに剥がれるためと考えられた。結果的にこれらの影響は、いずれも全体の解析に大きな影響を与えなかった。

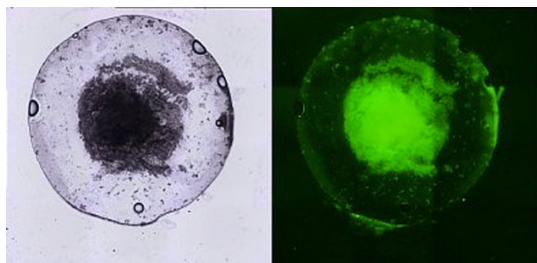


図 3 酵母ペースト上に捕捉された蛍光標識した大腸菌。実験終了 2 時間後もほぼ円形の蛍光体を示していた。

この円形蛍光体の外周は酸化チタンで覆われており、ここに UV を照射すれば光触媒反応により酸化チタンからヒドロキシラジカル等が生じ、近傍(蛍光体の外周)の大腸菌を殺傷し、その部位の蛍光が消失し、最終的には円形蛍光体の直径が縮小するはずであり、その縮小は効果と相関する。そこで酸化チタンをコートしたスライドガラス上の酵母ペーストに捕捉された大腸菌に UV を 2 時間照射し、蛍光円の大きさを測定した。その結果、6 つの試料の蛍光円の大きさの平均値 2.8 mm であった。これは予想通り酵母ペーストに捕捉された大腸菌が酵母ペーストの外側にコートされた酸化チタンから UV 照射により生じたヒドロキシラジカルの攻撃を受け、大腸菌が死滅しその結果蛍光も消失したものと考えられた。同様の実験を独立に 2 回繰り返し、ほぼ同一の結果が得られた(論文投稿準備中)。

今後は試料が乾燥しない条件下で、UV ランプの強さや照射時間を変え、より効果的な殺菌効果を得られる条件を確立する。また糖鎖リガンドを酵母ペーストからルイス b 型糖鎖(大量に調製することが難しい)に代えることでピロリ菌なども殺菌できるかどうかを検討したい。いずれにしても今回糖鎖を用いて選択的に大腸菌を捕捉し、同時に酸化チタンの光触媒反応で殺菌をすることができる系を確立したので、これをベースに集菌・殺菌能力をもつ新たな資材を開発したい。

<引用文献>

Sunada, K., Kikuchi, Y., Hashimoto, K., Fujishima, A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. Environ. Sci. Technol., 32 (1998) 726-728.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Ajisaka, K., Yuki, K., Sato, K., Ishii, N.,

Matsuo, I., Kuji, R., Miyazaki, T., and Furukawa, K. Preferential binding of *E. coli* with type 1 fimbria to D-mannobiose with the Man α 1 \rightarrow 2Man structure. 査読有り Biosci. Biotechnol. Biochem., 80 (2015) 128-134.

DOI: 10.1080/09168451.2015.1075863

[学会発表](計 3 件)

古川 清、結城 薫、佐藤 佳織、石井 希実、松尾 一郎、久慈 諒、宮崎 達雄、鰐坂 勝美:1 型繊毛をもつ大腸菌の D-マンノピオース異性体への結合特異性の解析。平成 27 年度日本生化学会関東支部例会・第 56 回新潟生化学懇話会、6.20, 2015、新潟

鰐坂 勝美、結城 薫、佐藤 佳織、石井 希実、松尾 一郎、久慈 諒、宮崎 達雄、古川 清: D-マンノピオース異性体の合成と 1 型繊毛をもつ大腸菌への結合特異性。第 9 回東北糖鎖研究会、9.5, 2015、仙台

佐藤 佳織、佐藤 まゆみ、古川 清: パン酵母を用いた 1 型繊毛をもつ大腸菌の捕捉とその応用。BMB2015 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会、12.1, 2015、神戸

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古川 清 (FURUKAWA, Kiyoshi)

長岡技術科学大学・工学研究科・名誉教授
研究者番号: 10190133

(4) 研究協力者

西川 雅美 (NISHIKAWA, Masami)