

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19560775
 研究課題名（和文） バクテリアの細胞間関係を遮断し感染症を予防する高分子ナノファイバーの開発
 研究課題名（英文） Development of polymer nanofibers that prevent infectious diseases due to interception of bacterial cell-to-cell communication
 研究代表者
 加藤 紀弘 (KATO NORIHIRO)
 宇都宮大学・工学研究科・教授
 研究者番号：00261818

研究成果の概要：緑膿菌などヒトへの健康被害の大きいグラム陰性細菌は、細胞間情報伝達機構クオラムセンシングを利用し日和見感染症を引き起こす。抗生物質を用いる感染症対策は薬剤耐性菌の出現を誘引することから、新しい感染症予防法が切望される。本研究では、本機構の阻害による病原性発現抑制に着目した。ナノファイバー不織布、多孔性ヒドロゲルシートなどの高分子担体合成に成功した。例えば多孔性を制御したヒドロゲルシートを用いて関連遺伝子の転写をほぼ完全に抑制可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：クオラムセンシング・高分子ゲル・シクロデキストリン・高分子ナノファイバー・エレクトロスピンニング・細胞間情報伝達機構・包接複合体・高分子不織布

1. 研究開始当初の背景

日和見感染菌による病原性因子の発現プロセスでは、クオラムセンシングと呼ばれる細胞間伝達機構が利用され

る例が多く報告されている。このバクテリア間の情報伝達機構を人為的に制御できれば病原菌を殺すことなく発病を予防できると申請者は考えている。従来行われている

方法では、細菌感染症を封じ込めるために抗生物質や抗菌剤を多量に投与しており、これら薬物の過剰投与は耐性菌の発生を招く危険性をはらんでいる。MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）による発病などが社会問題として注目されたのは記憶に新しい。日本国内の病院においても、抗生物質のきかない多剤耐性緑膿菌に院内感染した患者の死亡報道もあり問題は深刻度を増している。抗生物質に頼らない新しい感染症予防技術の開発が望まれており、新しいアプローチが必要とされる。

このクオラムセンシング機構を人為的に制御する方法としては、1)クオラムセンシングシグナル（シグナル物質）の構造類似化合物を設計し、これを投与することでレセプタータンパク質（R-タンパク質）との複合体形成を拮抗阻害する方法、2)細菌の中にはクオラムセンシングシグナルの分解酵素を生産するものも知られており、遺伝子レベルで分解酵素をコードする遺伝子を組み込み自己分解させる方法、3)系からクオラムセンシングシグナルをトラップ除去する方法などが考えられる。クオラムセンシング機構の抑制技術に関する研究例は少なく、特に3)のトラップ法を原理とする研究報告例はほとんど見当たらず、優れたシグナルトラップ剤は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

抗生物質投与に代わる新しい感染症予防材料を開発することが本研究の最終目標である。

微生物が集団になると微生物間の情報伝達物質（シグナル物質）が累積し濃度が上昇する。濃度が閾値を越えると、特定遺伝子の転写活性が高まり病原性因子発現の引き金となる。ヒトが感染症を発症する原因細菌の多くが、病原性因子の発現に関連して「細胞間情報伝達機構：クオラムセンシング」をたくみに利用していることが明らかになりつつある（図1）。ヒトへの健康被害の大きい緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* やセラチア菌 *Serratia marcescens* はグラム陰性細菌に分類されており、このシステムにより関連遺伝子の発現が調節されている。これらの細菌ではシグナル物質としてアシル鎖の構造のみが異なるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を生産しシグナリングしている。

この AHL を系から効率良く除去することで、細胞間情報伝達機構を人為的に攪乱し、関連遺伝子の発現を抑制可能であると考えられる。そこで、本研究では高分子担体を用いる AHL トラップ技術を検討し、感染症予防効果のある材料設計を目指した。

3. 研究の方法

用いる高分子担体に望まれる特性は、1) 培養液中で安定であり細菌の分泌する酵素などで分解しないこと、2) 内部表面積が大きくトラップするゲスト化合物 AHL の物質移動が容易であること、3) 用いる材料が人体に安全であること、などの要件を満たすことが重要である。本研究では、高分子としてセルロースエーテル類、ポリエチレングリコールなどを選択し、内部表面積の大きい多孔性高分子担体として高分子ナノ・マイクロファイバーから調製した不織布、マイクロ相分離を誘引しファイバー状にポリマー繊維が三次元網目

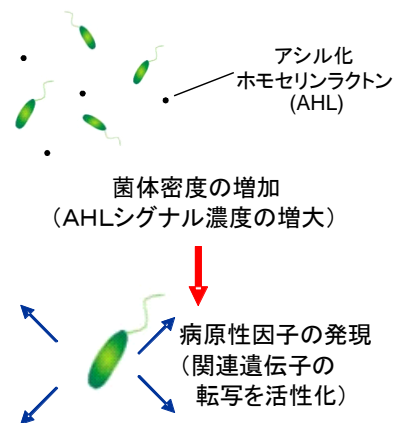


図1 細胞間情報伝達機構・クオラムセンシングによる感染菌の病原性因子発現

構造を形成した多孔性高分子担体の合成を検討した。

ナノ・マイクロファイバーの合成には、高压電源、可動式シングルノズル、紡糸原液噴霧用の速度可変ポンプ及びドラム式ターゲット電極を装備したエレクトロスピンニング法による紡糸装置を用いて、高分子ファイバーの合成条件を検討した。ポリエチレングリコールなど水系に可溶性な各種高分子を用いてファイバー合成に適する最適条件を検討し、ポリマーの分子量、濃度、紡糸条件などの基礎的条件を決定した。スピニングにより得られた高分子ファイバー及び不織布は、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。SEM像より、合成されるファイバーの平均直径と、ファイバーと共に固定される高分子ビーズの有無を評価した。

相分離構造を導入した高分子担体の合成では、熱誘導相分離法 (Temperature-Induced Phase Separation) を下限臨界溶液温度(LCST)を有する 2-ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)などのセルロースエーテル

から調製するヒドロゲルシート合成に応用し、相分離時間の制御により異なる多孔性を得た。

細胞間シグナル AHL の細胞内濃度は nmol/dm^3 レベルの低濃度であると考えられており、AHL を菌体から単離し実験に供するのは困難である。そこで *P. aeruginosa* および *S. marcescens* で生産されるアシル鎖長の異なる AHL を有機合成し、その構造を $^1\text{H-NMR}$ により確認し実験に用いた。菌体により生産された AHL の検出は、AHL 合成遺伝子破壊株で外部添加された AHL にのみ応答してクオラムセンシング機構を活性化し、紫色色素ピオラセインを生合成するレポーター株 *Chromobacterium violaceum* CV026 を利用した。合成した AHL トラップ高分子材料を、*P. aeruginosa* あるいは *S. marcescens* AS-1 の培養液に浸漬しながら振とう培養し、培養液から抽出した AHL を CV026 レポーター株の培地に添加して得られたピオラセイン生産量から AHL の濃度減少を見積もった。本方法で AHL トラップ材料の AHL トラップ性能を判定可能である。

S. marcescens のクオラムセンシング機構抑制に及ぼす効果は、LB 液体培地でヒドロゲルシートを浸漬しながら所定時間振とう培養した後の赤色色素プロデジオシン生産量により評価した。*S. marcescens* のクオラムセンシングが活性化されるとプロデジオシン合成酵素をコードする遺伝子発現が活性化し、合成されたプロデジオシンは細胞内に蓄積し培養液は赤色を呈色する。菌体破碎液からプロデジオシンを抽出し 534 nm の吸光度を測定し、濁度 OD_{600} により見積もった単位菌体量当たりのプロデジオシン生産量を評価した。

一方、*P. aeruginosa* のクオラムセンシング抑制効果の検討には、*N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone [3-oxo-C12 HSL]により活性化される *lasB* 遺伝子を利用した。*lasB* プロモーターの下流に β -ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* を配置した転写融合プラスミドを導入したレポーター株 *P. aeruginosa* PAO1(pQF50-*lasB*) を作成し、ヒドロゲルシートを浸漬しながら振とう培養した。所定時間後の単位菌体量当たりの β -ガラクトシダーゼ活性を定量し、その減少量からクオラムセンシング抑制効果を評価した。

4. 研究成果

S. marcescens AS-1 が生産する *N*-

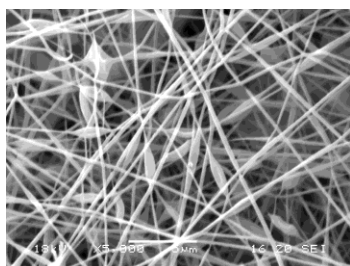


図2 エレクトロスピンング法で調製したファイバーのSEM像

hexanoyl-L-homoserine lactone (C6 HSL)、*N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8 HSL)、*N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6 HSL)、ならびに *P. aeruginosa* PAO1 が生産する 3-oxo-C12 HSL、*N*-butyryl-L-homoserine lactone (C4 HSL) を有機合成し構造を確認した。また、それぞれの培養液から AHL を抽出し逆相 TLC で展開した後に、*C. violaceum* CV026 株による AHL の特異的検出法と、TLC の R_f 値解析の組み合わせから培養液中に含まれる AHL 種を確認した。

高分子溶液の電界紡糸 (エレクトロスピンニング) には、カトーテック製ナノファイバー

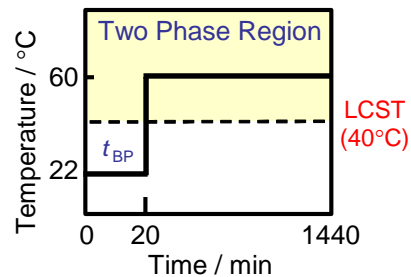


図3 熱誘導相分離法の温度制御プロファイル

エレクトロスピンニングユニットを用い、ターゲットドラム電極への印加電圧を $0 \sim 30 \text{ kV}$ の範囲でコロナ放電が起こらない条件下で各種試験した(図2)。

一方、2-ヒドロキシプロピルセルロース (HPC, Mw:100,000) は水中で LCST を 40°C 付近に有しそれよりも低温では水溶液に溶解、高温では析出し溶液は白濁する。LCST よりも低温の 22°C でヒドロゲルの合成反応を開始し、所定時間 t_{BP} (before phase separation)後に LCST よりも高温の 60°C に温度ジャンプしゲルシートを合成した。この熱誘導相分離法 (Temperature-Induced Phase Separation: TIPS 法)における温度プロファイルを 図3 に示す。得られたゲルシート表面を走査型電子顕微鏡 SEM (日本電子ハイテック JMS-5610) で観察すると、明らかに t_{BP} に応じて異なる多孔構造が得られていることが判る。熱誘導相分離法により合成したヒドロゲル表面の SEM 像を図4に示す。ファイバー状のポリマーネットワークがジャングルジムのように発達した三次元構造が得られていることが判る。

例えば、HPC と 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CD) の混合水

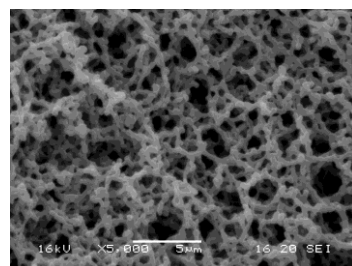


図4 熱誘導相分離法 (Temperature-Induced Phase Separation 法) で調製した多孔性ゲルのSEM像

溶液から架橋反応途中に TIPS 法を適用すると、 t_{BP} に応じて CD の固定化量、得られるヒドロゲルの有効多孔質度に差が現れた。CD 固定化量は TIPS 法未適用の場合で 0.30 mmol/g-dry gel 程度であったのに対し、例えば $t_{BP} = 20.0$ min の条件では 0.15 mmol/g-dry gel と約 2 分の 1 まで CD 固定化量は減少する。CD の固定化量は、調製直後の高分子ゲルシート洗浄液中に含まれる未固定の CD を HPLC の示差屈折率測定により見積もった。水で膨潤させたヒドロゲルに外部から圧力を印加しスクイズされる水の重量から有効多孔質度 ϵ を見積ると、TIPS 法の適用前後で ϵ は 0.08 から 0.57 まで増大しており、互いにポアが貫通した連続性の高い空孔がゲル内に形成していることが判る。

S. marcescens AS-1 を 25°C で 10 h 振とう培養し、その際に上記ヒドロゲルシートを浸漬し AHL のトラップ法の効果を検討した。図 5 に、10 h 経過後の培養液の状態を写真で示す。

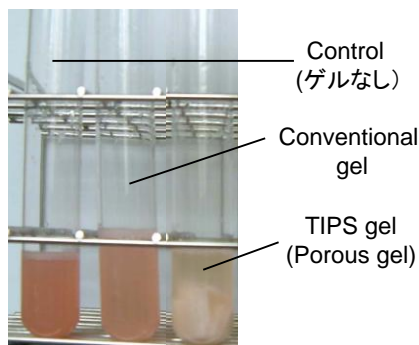


図5 熱誘導相分離法 (Temperature-Induced Phase Separation法) で調製した多孔性ゲルを用いたセラチア菌のプロディジオシン生産に及ぼす効果

通常の培養(control)では、対数増殖期を過ぎ定常期になった頃から AHL の培養液中への放出量が増大する。その濃度が閾値を越えるとプロディジオシン合成酵素をコードする遺伝子に関連するタンパク質合成系のスイッチがオンとなり、細胞内にプロディジオシンが蓄積していく。プロディジオシンは濃い赤色を呈するため培養液全体も赤色を呈する。TIPS 法未適用のコンベンショナルゲルを LB 液体培地に浸漬しながら培養してもプロディジオシン生産量の変化は少ないものの、TIPS 法適用ゲルを浸漬すると明らかに培養液の赤色は減少しプロディジオシン生産量が減少した。この結果は、ヒドロゲルシートに培養液中の AHL がトラップされ、系

の AHL 濃度が閾値よりも低濃度に保持されたために、クオラムセンシング機構が不活性な状態を保持できたためであり、AHL トラップ法がクオラムセンシング関連遺伝子の発現を抑制したことを示唆している。

S. marcescens AS-1 の検討では良好な結果を示したものの、クオラムセンシング関連遺伝子の転写プロセスそのものが抑制されたかどうかは依然として不明である。そこで、*P. aeruginosa* PAO1 (pQF50-*lasB*) レポーター株を用いて、*lasB* 遺伝子の発現が添加したヒドロゲルシートにより影響を受けるか検討した。*P. aeruginosa* PAO1 では、AHL 濃度依存性の *las* 系クオラムセンシングの存在が知られている。この実験系では、クオラムセンシング機構が正常に活性化されるとレポーター酵素である β -ガラクトシダーゼ活性が上昇する。液体培地中にゲルシートを浸漬した場合に AHL のトラップ効果によりクオラムセンシング機構が抑制を受ければ、酵素活性は低下する。そこで、37°C で 18 h 振とう培養した *P. aeruginosa* PAO1 (pQF50-*lasB*) の培養液からゲルシートを分離し更に菌体を破砕した。この菌体破砕液中の β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、菌体懸濁液の濁度 OD₆₀₀ から、単位菌体量当たりの β -ガラクトシダーゼ活性 (Relative β -galactosidase activity) を算出した(図 6)。

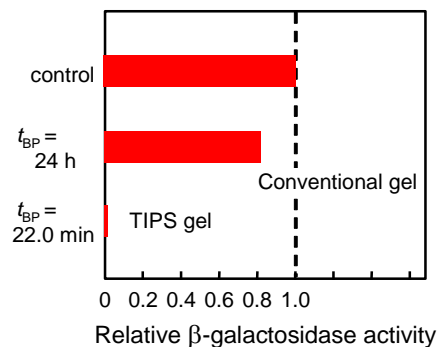


図6 熱誘導相分離法 (Temperature-Induced Phase Separation法) で調製した多孔性ゲルを用いた緑膿菌のクオラムセンシング制御効果

TIPS 法未適用のゲルシートを浸漬しても Relative β -galactosidase activity は 80% 程度にまでしか減少しなかったのに対し、TIPS 法適用ゲル ($t_{BP} = 22$ min) では Relative β -galactosidase activity は 1% 程度まで劇的に減少することを見出した。化学架橋したポリマーネットワークに多孔構造を導入したことで、ゲルの内部表面積が劇増したことで、ゲルシート内部の物質移動が容易になったこ

と、更に AHL をトラップする宿主化合物 CD を固定化する際にポリマーネットワークによる立体障害が大幅に改善されたことが要因であると推察される。

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 2 件)

① Norihiro Kato, Yu Ozonoe, Eri Umebayashi, Tomohiro Morohoshi, and Tsukasa Ikeda, Artificial control of the bacterial cell-to-cell communication with autoinducer recognition gel, *Advances in Science and Technology*, 査読有り, **57**, 94-98 (2008).

② Norihiro Kato, Azumi Kobayashi, Hiroshi Motohashi, Yu Ozonoe, Tomohiro Morohoshi, and Tsukasa Ikeda, Development of a novel hydrogel to prevent bacterial infectious diseases, *Progress in Colloid and Polymer Science*, 査読有り (2009) in press.

[学会発表] (計 15 件)

① Norihiro Kato, Toru Tanaka, Tomohiro Morohoshi, and Tsukasa Ikeda, Quorum sensing control based on the cyclodextrin inclusion complex of bacterial signals, The 4th Asian Cyclodextrin Conference (ACC2007), 19. May. 2007 (Doshisha Univ., Kyoto).

② Norihiro Kato, Yu Ozonoe, Shota Nakagawa, Tomohiro Morohoshi, and Tsukasa Ikeda, Remote control of gene expression by autoinducer recognition gel, GelSympo2007, 7. Aug. 2007 (Tokyo Univ., Tokyo).

③ 中川翔太, 田中徹, 小園江ゆう, 諸星知広, 池田幸, 加藤紀弘, シクロデキストリン固定化ゲルシートを利用するバクテリアの細胞間シグナリング制御, 第 25 回シクロデキストリンシンポジウム, 2007 年 9 月 11 日 (鳥取大学, 鳥取) .

④ 中川翔太, 田中徹, 小園江ゆう, 諸星知広, 池田幸, 加藤紀弘, グラム陰性細菌のクオラムセンシング制御を目指したシクロデキストリン固定化ゲルシートの開発, 日本化学会第一回関東支部大会, 2007 年 9 月 27 日 (首都大学東京, 東京) .

⑤ Norihiro Kato, Tomohiro Morohoshi, Yu Ozonoe, Shota Nakagawa, Toru Tanaka, and Tsukasa Ikeda, Quorum sensing control in opportunistic human pathogens with autoinducer recognition gel, 3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in

Bacteria, 9. Oct. 2007 (Austin, USA).

⑥ Tomohiro Morohoshi, Masashi Kato, Katsumasa Fukamachi, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda, Long-chain acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, in contrast to well-known CV026 biosensor, 3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, 8. Oct. 2007 (Austin, USA).

⑦ 加藤紀弘, バクテリアの細胞間情報伝達機構を制御する新規高分子ヒドロゲルの開発, 第 18 回日本 MRS 学術シンポジウム, 2007 年 12 月 8 日 (日本大学, 東京) .

⑧ 小園江ゆう, 中川翔太, 諸星知広, 池田幸, 加藤紀弘, クオラムセンシングシグナルを認識するヒドロゲルを用いた日和見感染菌の遺伝子発現制御, 第 19 回高分子ゲル研究討論会, 2008 年 1 月 16 日 (東京大学, 東京) .

⑨ Yu Ozonoe, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Norihiro Kato, Control of virulence gene expression due to the inclusion complex formation between immobilized cyclodextrins and bacterial quorum sensing signals, 14th International Cyclodextrin Symposium, 9. May. 2008 (Doshisha Univ., Kyoto).

⑩ Tsukasa Ikeda, Tomohiro Morohoshi, and Norihiro Kato, Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria using cyclodextrins, 14th International Cyclodextrin Symposium, 9. May. 2008 (Doshisha Univ., Kyoto).

⑪ 加藤紀弘, 小林愛雲, 本橋拓志, 諸星知広, 池田幸, 細菌感染症予防能力を有するヒドロゲルの設計, 田中豊一記念シンポジウム, 2008 年 9 月 11 日 (アルカディア市ヶ谷, 東京) .

⑫ 加藤紀弘, 池田幸, 諸星知広, 小園江ゆう, 本橋拓志, 小林愛雲, オートインデューサー認識ゲルを用いる日和見感染菌の遺伝子発現制御, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 25 日 (大阪市立大学, 大阪) .

⑬ 本橋拓志, 小林愛雲, 小園江ゆう, 諸星知広, 池田幸, 加藤紀弘, シクロデキストリン固定化ヒドロゲルを用いるセラチア菌のクオラムセンシング制御, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 25 日 (大阪市立大学, 大阪) .

⑭ Norihiro Kato, Azumi Kobayashi, Yu Ozonoe, Hiroshi Motohashi, Tomohiro Morohoshi, and Tsukasa Ikeda, Regulation of bacterial cell-to-cell communication with autoinducer recognition gel, IUMRS-International Conference in Asia 2008, 11. Dec. 2008 (Nagoya).

⑮ 池田幸, 伊藤智志, 佐藤智哉, 富永みのり,

諸星知広, 加藤紀弘, 修飾シクロデキストリン類を用いたグラム陰性細菌の Quorum Sensing 阻害技術に関する研究, 化学工学会第74年会, 2009年3月19日 (横浜国立大学, 神奈川)

〔図書〕 (計1件)

① 加藤紀弘, シーエムシー出版, 医療用ゲルの最新技術と開発, 2008, 226-237.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 紀弘 (KATO NORIHIRO)

宇都宮大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号： 00261818

(2) 研究分担者

諸星 知広 (MOROHOSHI TOMOHIRO)

宇都宮大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号： 90361360