

称号及び氏名	博士（工学） 木下 隆将
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 31 日
論文名	「Development of Optical Antenna Using Gold Nanoparticles for Bacterial Analysis」 「細菌分析のための金ナノ粒子光アンテナの開発」
論文審査委員	主査 長岡 勉 副査 井上 博史 副査 久本 秀明

論文要旨

細菌は効率的かつ機能的な生物機構を有しており、微生物資源としての有効利用に関する研究が活発に行われている。例えば、乳酸菌や納豆菌などの発酵菌は食品やサプリメントとして、根粒菌などの土壌細菌は野菜の有機栽培に利用されている。さらに、光合成細菌や異化的金属還元細菌などを用いた微生物燃料電池の開発が期待される。一方、細菌の一部には食中毒や流行性感染症の要因となる菌種がある。集団食中毒や院内感染などを抑制するためには、様々な現場において危害要因を迅速に検出し、被害拡散を抑制することが重要である。しかし、菌数計測法や酵素結合免疫吸着法、ポリメラーゼ連鎖反応法などの従来検出法は十分な選択性、感度を得るために分離や増菌などの培養工程を必要とするため、判定までに最低でも数日を要し、いずれも熟練技術や高価な装置が必要である。

本研究では金属ナノ粒子を用いた迅速な細菌分析法の開発を行った。金属ナノ粒子は局在表面プラズモン共鳴（LSPR）に基づき可視領域の光を吸収、散乱するなど特徴的な光学特性を有する。特に、化学的に安定である金は分子修飾が容易であり生体適合性にも優れていることから、本論文では金ナノ粒子を用いた細菌への光アンテナ形成について検討した。さらに、感度、確度、選択性や生菌率などの観点から、細菌分析における有用性について検討を行った。

第1章では本論文の背景や概要について述べた。

第2章では細菌表面に吸着した金ナノ粒子が発現する光学特性について調査し、その効率的な利用法について検討した。食中毒や感染症の危害要因となる細菌のほとんどはグラム陰性菌であり、その最外膜はリポ多糖により構成される。リポ多糖の脂質部は膜内部に位置し、コア多糖、O多糖（O抗原）から成る親水性多糖部位が膜の外側に突き出た形で存在する。O多糖の種類や配列は菌種により特異的であるが、細胞はコア多糖に結合したリン酸基に基づき負のゼータ電位を生じる。したがって、正電荷をもつ金ナノ粒子の分散液にグラム陰性菌を添加すると、細胞表面に金ナノ粒子が静電的に吸着すると考えられる。アミノ基導入した金ナノ粒子分散液にグラム

陰性菌の一つである *Pseudomonas aeruginosa* を添加した。得られた混合液を導電基板に滴下，乾燥させたのち電子顕微鏡観察したところ，金ナノ粒子が細胞表面に吸着した様子が観察された。暗視野顕微鏡観察では，金ナノ粒子が疎に吸着した細胞からは緑色の弱い散乱光が観察された。一方，密に吸着した細胞は強い赤色の光散乱スポットとして観察された。これは金ナノ粒子の集合により LSPR カップリングが生じたことに起因する。これらの結果より，細胞の散乱強度は表面に吸着した金ナノ粒子の分散状態に強く依存することが明らかとなった。そこで，金ナノ粒子がマトリクスポリマ内部において高密度に集合したラズベリー状の構造体を作製した。ラズベリー構造体を静電吸着させた細胞の暗視野観察では，白色の著しい散乱光が観察された。また，ラズベリー構造体が少量吸着した細胞の散乱強度は金ナノ粒子が高密度に吸着した細胞の 10 倍以上であった。

第 3 章ではラズベリー構造体を光アンテナとした食中毒原因菌の特異検出について検討した。ラズベリー構造体分散液に所定量の細胞を添加し，単一細胞あたりの吸着数を見積もった。ラズベリー吸着数の増加に伴い単一細胞の散乱強度は増大し，未吸着の 100 倍以上となった。このとき，散乱波長は吸着数や吸着密度によらず一定であり，ラズベリー内部の金ナノ粒子の分散状態は変化しない。これらのことから，ラズベリー構造体は高感度かつ正確な光アンテナとして機能することが明らかになった。抗 *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 抗体を導入したラズベリー分散液に *E. coli* O157，および他種 O 抗原を持つ *E. coli* O26，O111 をそれぞれ添加したところ，*E. coli* O157 にのみ吸着が確認された。吸収スペクトルにおいて，*E. coli* O157 の添加により分散液の波長 600 nm の吸光度が減少した。吸光度は分散液中の細胞濃度が 10 cells/mL のときに最小となり，細胞濃度の増大に伴い増大した。これは少量の細胞への高密度な吸着がラズベリーの分散性をより低下させるためである。これらの結果は，ラズベリー構造体が光学顕微鏡を用いた菌種判別，および分散液中における極少量細菌の簡易検出に応用可能であることを示唆した。

第 4 章では金ナノ粒子をポリマで被覆したハイブリッドへの分子鋳型形成による特異結合性の付与について検討した。第 3 章で述べたように，抗体は特定抗原に対する優れた結合能を示す。しかし，所望の抗体を得るためには生物の免疫応答に基づいた多くの工程を要するため，1 か月以上の期間が必要となる。一方，分子鋳型は標的分子の構造をマトリクスポリマに転写する簡易な合成により迅速に形成される。本章では，温度感応性を示す *N*-イソプロピルアクリルアミドを基幹とした共重合ポリマをマトリクスとし，*E. coli* O157 より抽出したりポ多糖を標的とした鋳型を形成した。重合反応溶液に塩化金酸を共存させることで，複数の金ナノ粒子をポリマで被覆したハイブリッドが形成された。さらに，ポリマが 32°C 以下で親水性を示すことに着目し，25°C で重合することにより標的分子をポリマに取り込んだ。続いて，加熱によりアルキル基の分子内凝集に基づくポリマの疎水化を誘導し，標的分子の吐き出しを行った。このようにして，標的分子に相補的な鋳型をもつハイブリッドを形成した。このハイブリッドは 25°C の水溶液中において *E. coli* O157 に自発的に吸着し，細胞の散乱強度を増大させた。一方，*E. coli* O26 や *E. coli* O-rough への結合は確認されなかった。これはハイブリッドに形成された分子鋳型が O157 抗原を構成する糖の種類や配列を識別したことを示している。40°C に温度制御したハイブリッド分散液に *E. coli* O157 を添加し暗視野観察を行ったところ，細胞は弱い光として観察された。ポリマの相転移に伴い分子鋳型が消失し，ハイブリッドが *E. coli* O157 に結合しないためである。再度分散液の温度を 25°C に制御し，同様の操作を行ったところ，細胞はハイブリッドの結合を意味する強い白色散乱光として観察された。この温度サイクルを 5 回行いポリマの相転移を繰り返しても，ポリマに形成された分子鋳型は消失せず，高い形状記憶性を示した。特定菌種への安定な結合性を有する光学標識を工業的に大量生産できるだけでなく，分子鋳型のテーラーメイドにより新しい微生物脅威にも迅速な対応が可能な方法として有用である。

第 5 章では金ナノ粒子の光学特性を利用した生菌率の評価について検討した。アミノ基導入金ナノ粒子を異なる生存率の細胞懸濁液にそれぞれ添加したところ，生菌率減少に伴い懸濁液の色は赤～紫～青と変化した。死菌を含む懸濁液を導電基板に滴下して電子顕微鏡観察したところ，金ナノ粒子は細胞と離れた箇所によく凝集体を形成していることが分かった。吸光分析の結果，

死菌細胞より核酸の溶出が確認された。さらに、核酸染色を用いた蛍光分析により、核酸への金ナノ粒子の吸着が確認された。これらのことから、アミノ基導入金ナノ粒子は死菌から溶出した核酸のリン酸エステルと静電的に結合することで凝集体を形成したものと考えられる。また、クエン酸修飾金ナノ粒子を用いて同様の検討を行った。アミノ基導入金ナノ粒子と異なり、死菌懸濁液中において分散状態を示す赤色を呈し、生菌率の増大に伴い徐々に紫へと変化した。暗視野顕微鏡によりクエン酸修飾金ナノ粒子分散液中における生菌の挙動を追跡したところ、時間経過に伴い集合体を形成していく様子が観察された。電子顕微鏡によると、この細胞集合体が多く金ナノ粒子を包括していることが分かった。生菌は自身の保護や細胞間での情報伝達のためにバイオフィルムを形成する。クエン酸修飾金ナノ粒子は、このバイオフィルムに取り込まれることで凝集したものと考えられる。このように、金ナノ粒子の分散状態に基づく色変化に着目することで、目視により簡便に生菌率を評価することが可能となる。細菌の機能や毒性の多くは生菌によってのみ発現されるため、本法は生物機能の有効利用や抗生物質の性能評価など細菌に関連する様々な研究へ貢献することが期待される。

第6章では本論文から得られた結論を総括した。

本論文では金ナノ粒子の光学特性に着目した細菌への光アンテナの形成について、およびその分析化学的応用における有用性について述べた。既存法における種々の課題を克服する新しい細菌分析手法としての今後の発展が期待される。

審査結果の要旨

本論文は、金ナノ粒子の光学特性に着目した細菌への光アンテナの形成と分析化学的応用に関する研究成果をまとめたものであり、以下のような成果を得ている。

(1) 暗視野顕微鏡下において、金ナノ粒子が疎に吸着した細菌細胞は緑色の弱い光散乱スポットとして、密に吸着した細胞は強い赤色の光散乱スポットとして観察された。これらの結果から、細菌細胞から生じた散乱光の強度が吸着した金ナノ粒子の分散状態に強く依存することを明らかにした。そこで、金ナノ粒子がマトリクスポリマー内部で高密度に集合した構造をもつハイブリッド粒子を作製した。ハイブリッド粒子が吸着した細胞は白色の強い散乱光として観察され、ハイブリッド粒子が高感度な光アンテナとして機能することが分かった。

(2) 抗 *Escherichia coli* O157 抗体を導入したハイブリッド粒子の分散液に *E. coli* O157、および異なる O 抗原を持つ *E. coli* O26, *E. coli* O111 を添加したところ、ハイブリッド粒子は *E. coli* O157 にのみ吸着した。吸光度は分散液中の細菌濃度が 10 cells/mL のときに最小となり、細菌濃度の増大に伴い増大した。ハイブリッド粒子を用いた菌種判別、および分散液中における細菌の定量が可能になった。

(3) ハイブリッド粒子表面に O157 抗原の分子鋳型を形成した。このハイブリッドは 25°C の水溶液中において *E. coli* O157 に自発的に吸着した。一方、*E. coli* O26 や *E. coli* O-rough への結合は認められなかった。これはハイブリッドに形成された分子鋳型が O157 抗原を構成する糖の種類や配列に特異的であることを示している。

(4) 金ナノ粒子の光学特性を利用した生菌率の評価について検討した。アミノ基導入金ナノ粒子は死菌から溶出した核酸と結合することで凝集体を形成することが分かった。一方、クエン酸修飾金ナノ粒子は、バイオフィルムに取り込まれて凝集することが明らかになった。細菌懸濁液

中におけるこれらの金ナノ粒子の分散状態に基づいて、目視により生菌率を評価することが可能となった。

以上の研究成果は、金ナノ粒子を用いた細菌への光アンテナ形成によって、感度、確度、選択性や生菌率など、様々な観点から細菌分析の発展に大いに貢献するものである。また、申請者が自立して研究活動を行うのに十分な能力と学識を有することを証したものである。