

ナノマテリアルによる細菌遺伝子発現の制御と感染調節

北海道公立大学法人札幌医科大学

白土 明子

Some nanomaterials in cosmetic products act as UV-filters for skin. It is known, however, that some types of nanomaterials can induce skin inflammation. The inflammation is thought to be due to the harmfulness of the nanomaterials themselves. On the contrary, we considered another hypothesis on the action of nanomaterials in the skin damages. That is, nanomaterials would alter gene expression of indigenous bacteria in skin and they would induce inflammation indirectly. We investigated influence of some nanomaterials on the action of membrane receptors of *Escherichia coli*, and found level of two receptors activities were reduced by treatment of two nanomaterials ZnO and TiO₂. Lack of the receptors in *E. coli* altered bacterial virulence to model host *Drosophila*. These results suggested that some nanomaterials have roles for regulation of bacterial virulence through change the activity of the membrane receptors.

1. 緒言

近年、ナノマテリアルが利用されている化粧品が増えており、中でも、日焼け止めやファンデーションなどの、皮膚に直接に触れる面積の広い種類へ配合される例もある。そのため、ナノマテリアルの毒性評価は化粧品の安全性に重要な要素とされてきている。

近年、毒性が低いとされる細菌が、皮膚や傷に付着した際に皮膚炎や傷害、強い毒性を与える場合のあることが報告されるようになった。細菌には環境を感知する仕組みがあり、環境中の化学物質や宿主内の物質の認識により、遺伝子発現を変化させて環境変化に適応して生存生育する。皮膚表面には常在細菌を含め多くの細菌が存在しており、ナノマテリアルが細菌の生理状態を変化させることで、皮膚への炎症や傷害の状態に影響を与えている可能性が提唱されているが¹⁻³⁾、直接の作用はまだ十分に調べられてはこなかった。

本研究では、ナノマテリアルによる細菌の遺伝子発現変動と生理的性質の変化、および宿主組織への影響を解析することとした。細菌の細胞膜には環境物質を認識する膜受容体があり、これが活性化すると特定の転写調節因子の活性状態を変化させ、支配下遺伝子群の発現を正または負に調節する。また、特定の情報経路はストレス応答、輸送体群、呼吸関連、代謝などの、ひとまとまりの働きを発揮する遺伝子群を一括して制御する⁴⁾。特に、遺伝子発現制御系の解析が進んでいる遺伝学モデル細菌では、制御下遺伝子群

の実体や制御機構の知見の蓄積が多い。そのため、活性変化する情報経路がわかると、細菌の性質変化をある程度予測することも可能となる。また、細菌の情報経路は細菌種を超えて共通する種類も多く、各種のモデル細菌系で得られた成果は、他の細菌にも当てはまる可能性が高い。これらのことから、ナノマテリアルが細菌の情報経路に与える作用を評価した。

2. 方法

2.1. 材料

グラム陰性細菌のうち、遺伝子発現制御機構がもっともよく知られている大腸菌の実験株のBW 25113株を材料とし、また、これを親株とする遺伝子欠損菌株を、国立遺伝学研究所ナショナルリソースセンターより入手して用いた。大腸菌の環境感知を行う情報経路は二成分制御系と呼ばれ、細胞膜受容体と転写調節因子の2種類のタンパク質の組み合わせで構成され、約50の因子を持つ(Fig. 1 前が受容体、後が転写調節因子の名前を示す)。それぞれの経路により正に制御される遺伝子を選び、これらの転写プロモーター配列の制御下に緑色蛍光タンパク質(GFP)またはルシフェラーゼを発現するプラスミドpBR322を準備し、それぞれを保持させた大腸菌株を用意した(Fig. 2)⁴⁾。ナノマテリアルとして、サンスクリーン剤に利用されるMZ-500(ZnO)およ



Role for nanomaterials of bacterial gene expression and infectious state of host organisms

Akiko Shiratsuchi

Sapporo Medical University

代謝	ストレス応答	物質輸送
AtoC-AtoD	BarA-UvrY	BaeS-BaeR
CitA-CitB	CpxA-CpxR	BasS-BasR
DcuS-DcuR	EnvZ-OmpR	CusS-CusR
UhpB-UhpA	QseC-QseB	EvgS-EvgA
NtrB-NtrC	YedV-YedW	HydH-HydG
PhoR-PhoB	呼吸	KdpD-KdpE
CreB-CreC	ArcB-ArcA	PhoQ-PhoP
走化	NarQ-NarP	
CheA-CheB	NarX-NarL	機能不明
	TorS-TorR	RstA-RstB

Fig. 1

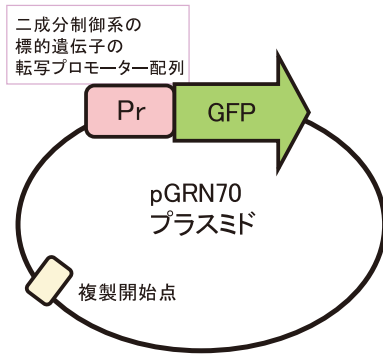


Fig. 2

びTiO₂を用いた。宿主との接触を模倣するために、宿主血液および血清を用いた。また、個体レベルの実験では、ヒトと同じ自然免疫機構を持つキロショウジョウバエの野生型として *Oregon R* 系統 (Kyorin Fly より供与) を用いた^{5,6)}。

2.2. 遺伝子転写プロモーター活性の測定

大腸菌株はLB液体培地で培養し、ここに様々な濃度のナノマテリアルを加えた試料も作成する。培養時間経過に伴う600nmの吸光度を測定して、細菌増殖に影響のない濃度を設定した。定常期まで培養した大腸菌は、バッファーで一度すすいでから、測定用の新たなバッファーに懸濁した一定濃度になるよう希釈してからマルチウエブプレートに分注し、ここに試料群を加えて共培養した。つづいて、GFPの蛍光強度、もしくは、ルシフェラーゼの酵素活性を、プレートリーダーを用いて測定した。それぞれをレポーターとして、測定値を転写プロモーター活性の指標とした⁴⁾。一方、細菌のそれぞれの受容体経路の下流には、当該経路でのみ、かつ正の制御を受ける遺伝子群が存在する。そのような遺伝子と内部コントロールとしてDNAポリメラーゼアルファサブユニットのmRNAレベルを解析して、受容体活性化のmRNAレベルでの指標とした⁶⁾。

2.3. モデル宿主を用いた *in vivo* 感染系での毒性解析

キロショウジョウバエ成虫オスを炭酸ガスで麻酔し、ハエの腹に窒素ガス制御性マイクロインジェクターに接続したキャピラリーを用いて、バッファーに懸濁した一定数の大腸菌、もしくはバッファーのみを注入した。覚醒後のハエは、餌を入れたバイアルに移し、29℃で飼育した。飼育時間に伴う生存率を調べて毒性の指標とした^{7,8)}。また、ハエをPBS中でホモジナイズして粗抽出液を調製し、LB寒天培地に塗布して得られたコロニーを計測して、コロニー形成菌数を生菌の指標とした⁶⁾。

3. 結果

3.1. 宿主遭遇時の大腸菌膜受容体経路活性の変化

ナノマテリアルの作用を知る前提として、宿主体液の存

在で活性化程度の高い二成分制御系を調べた。そのために、それぞれの受容体経路で活性化することの知られる遺伝子の転写プロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現するプラスミドを構築し、これを大腸菌に保持させたライブラリーを準備した。それぞれのプラスミド保持菌株をモデル宿主ショウジョウバエの体腹に注入し、蛍光強度を画像解析した。その結果、ストレス応答性遺伝子を制御するEnvZ-OmpRとCpxA-CpxR、代謝に関連するPhoB-YuhU/YpdA、呼吸に関連するEnvS-EvgAとPhoQ-PhoPを含む数種類の経路が高い活性を示した。このうち、細菌の毒性や免疫耐性を念頭におき、ストレス応答に関連する2種類の経路に着目した。EnvZ-OmpR, CpxA-CpxRのそれぞれで正に制御される遺伝子を選びその転写プロモーター活性を調べると、宿主の血液成分により活性化することがわかった(未発表データ)。つづいて、受容体が体液により活性化していることを、リン酸化を指標として調べた。そのために、当該受容体をFLAGとの融合タンパク質として発現させる大腸菌株を準備し、ここに体液を作用させたのち、抽出液を調製してPhos-tag-SDS-PAGEにより分離し、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットを行った。Phos-tagはリン酸基を捕獲してSDS-PAGEによる易動度を小さくする。大腸菌抽出液からは二本のバンドが得られ、易動度の大きいシグナルを非リン酸化体、小さいシグナルをリン酸化体として評価した。体液が存在すると、易動度の小さいシグナルの割合が大きくなったことから、EnvZのリン酸化体の割合が増え、活性化程度が亢進したと判断した (Fig. 3)。この結果は、体液から血球成分を除いた液性成分だけでも、さらにこれを100℃で5分間処理した成分でもこの性質が保持された (Fig. 4)。これら

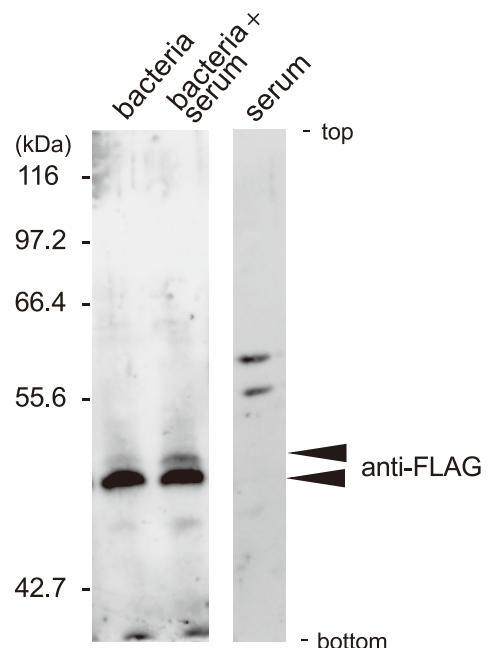


Fig. 3

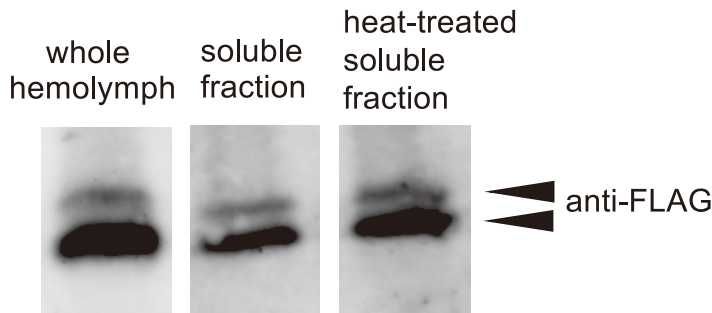


Fig. 4

のことから、体液中の加熱に耐性の液性成分の中に、二成分制御系の膜受容体EnvZを活性化する因子が存在すると考えられた。CpxA-CpxRについても同様の解析が進行している。

3. 2. 大腸菌の生存増殖に影響しないナノマテリアル処置条件の設定

LB液体培地に様々な濃度のナノマテリアル ZnO または TiO₂ を添加し、大腸菌 BW 25113 株を 37℃ で空気中でしんとう培養し、時間経過に伴う 600nm における吸光度を定常期に達するまで測定した。その結果、試料の吸光度は培養時間の経過に伴って増加し、5% (w/v) 以内の濃度では、両者ともにコントロールとした PBS との違いはなかった。また、大腸菌に ZnO または TiO₂ を添加して暴露させ、LB 寒天培地でのコロニー形成菌数を調べると薬剤なしとの顕著な違いはなかった。これより、ZnO および TiO₂ は、5% (w/v) で大腸菌の生存増殖を阻害しないと判断し、今後の実験ではこの濃度を用いて解析を行った。

3. 3. ナノマテリアルによる大腸菌情報経路活性への作用

ここまでで得られた知見を元に、大腸菌液に ZnO および TiO₂ を添加して EnvZ-OmpR 経路への働きを調べた。宿主導入時の当該経路下流遺伝子の転写プロモーターの活性は、ナノマテリアルの存在により抑制傾向を示し、コントロール群と比較して TiO₂ 添加群では 91%、ZnO では 72% であり (n=3, 有意差あり) その働きは ZnO の方が大きかった。このことから、ナノマテリアルは EnvZ-OmpR 経路を抑制し、この経路による細菌遺伝子発現の変化を通じ宿主への作用を変化させる可能性がある。

3. 4. 大腸菌膜受容体経路の宿主毒性への作用

次に、宿主体液で活性化する EnvZ-OmpR および CpxA-CpxR の宿主感染時の働きを調べるために、キイロショウジョウバエ *Oregon R* 系統の成虫オスの腹に *envZ-ompR* 遺伝子、*cpxA-cpxR* 遺伝子のそれぞれを欠損した大腸菌株を注入した。その結果、*envZ-ompR* 遺伝子欠損菌株は

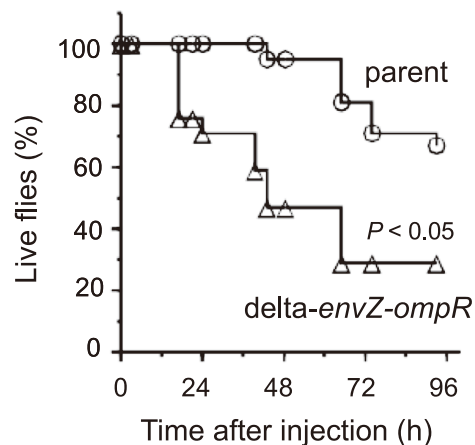


Fig. 5

親菌株 BW 25113 株と比較して、多くのハエを殺すとわかった (Fig. 5)。一方、*cpxA-cpxR* 遺伝子欠損菌株は親菌株 BW 25113 株と比較して、ハエの生存率が低い傾向があり、また、マクロファージにより早く貪食殺菌されることがわかった (未発表)。これらのことより、EnvZ-OmpR は宿主への毒性に抑制的に働き、CpxA-CpxR は宿主の免疫へ抵抗に働くと考えられた。今回解析に用いたナノマテリアルにより活性変動する受容体経路の中に、宿主への毒性を調節するものが見出された。

4. 考察および総括

大腸菌は体液成分を感知して情報経路の活性を変化させて遺伝子発現パターンを変えることが示され、宿主への毒性や免疫感受性を変化させる。そして、ZnO および TiO₂ は、これらの経路の働きを変化させる作用を有することが判明した。皮膚表面には多くの常在細菌を含む細菌が付着しており、サンスクリーン剤に含まれるナノマテリアルは、細菌の情報経路の活性変化を通じて、遺伝子発現を変化させる作用を持ち、これが細菌の性質を変化させる可能性がある。今後は、例えば、宿主への傷害に関連する細菌遺伝子の働きを抑える作用など、これまでに見出されたこなかった、ナノマテリアルの働きが見出される可能性がある。

(引用文献)

- 1) Kinoshita, R., et al. Yakugaku Zasshi, 132, 319-324 (2012)
- 2) Lee, N-Y., et al. Front. Pharmacol., 10, 1153 (2019)
- 3) Yallet-Regi, M., et al. Int. J. Mol. Sci., 20, 3806 (2019)
- 4) Pukklay, P., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 438, 306-311 (2013)
- 5) Nainu, F., et al. Journal of Center of Medical Education, Sapporo Medical University 10, 21-32 (2019)
- 6) Hashimoto, Y., et al. J. Immunol., 183, 7451-7450 (2009)
- 7) Shiratsuchi, A., et al. J. Immunol., 192, 666-675 (2014)
- 8) Shiratsuchi, A., et al. J. Immunol., 197, 1298-1307 (2016)