

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21064

研究課題名(和文)天然AtaAファイバー切り出し技術を用いた非特異的吸着機構の解明

研究課題名(英文) Study of a functional domain for nonspecific stickiness in native AtaA fiber protein obtained by enzymatic reaping method.

研究代表者

中谷 肇 (Nakatani, Hajime)

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号：80456615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：強い非特異的付着性を担う細菌由来のファイバー様タンパク質AtaAについて、特異的にタンパク質を切断するプロテアーゼを用いて、その機能を担うタンパク質ドメインの同定を試みた。AtaAが持つ5つのFGGドメインにそれぞれHRV3Cプロテアーゼにより切断される配列を付加した3CAtaA_FGG1-5コンストラクトを作成し、プロテアーゼ認識サイトを持ち且つ付着凝集性が低下しないコンストラクトの作成に成功した。これを発現させた細胞をHRV3Cプロテアーゼで処理し、ファイバー切断処理後の細胞凝集性と付着性の減少から、NヘッドドメインがAtaAファイバーの機能を担う重要なドメインであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Identification of a functional domain on the highly adhesive fiber protein on a bacterium, AtaA, was attempted by protease digestion of the fiber on cell surface with specific protease. The recognition sites for HRV3C protease were introduced into the five FGG domains existing in the fiber (3CAtaA_FGG1-5). Production of these mutant fibers on bacterial cells, and appearance of the adhesive and auto-agglutinative characteristics of those cells were confirmed. The disappearance of these characteristics by treatment with HRV3C protease was then observed, and as a result, N-head domain existing at the tip of the fiber was suggested to be important for the function of AtaA fiber.

研究分野：生物工学

キーワード：細菌付着 オートトランスポーター 接着分子 アドヘシン HRV3Cプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌であるアシネトバクター属 Tol 5 株はさまざまな非生物材質の表面に対して高い接着性を示すことが示されている。この高い接着性に関与している分子は、AtaA と名づけられたファイバー状の巨大なホモ三量体タンパク質分子 (1060 kDa) で、三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) と呼ばれる表層タンパク質ファミリーに属している。AtaA ファイバー上には多くのドメイン構造が連続しており、これらのうちどれかがファイバーの非特異吸着に関与する。AtaA タンパク質の接着性を応用することで、さまざまな担体への微生物の固定化が可能となると考えられるが、AtaA タンパク質の接着機構の解明に不可欠な、接着ドメインの種類や天然の AtaA タンパク質分子自体の性質に関してはまだよくわかっていない。

これまでの TAA の接着性に関する研究では、同種または異種の細菌に TAA を発現させて性質の変化を調べたり、大腸菌で組み換えタンパク質として発現させた TAA の断片的なドメインについて解析することで知見を得るといった手法が用いられてきた。しかしながらこれらの手法では AtaA のように巨大な分子を異種発現させること自体不可能であり、直接 TAA 分子の性質を解析することが困難である。また、天然分子とはサイズの異なる組み換えタンパク質が示す性質は、本来の TAA の性質を反映していない可能性が高い。これまでの研究から、AtaA タンパク質欠損したアシネトバクター属細菌に AtaA 遺伝子を導入して再発現させると正常に菌体表層にファイバーが生産され、機能を持つことが知られている。この AtaA ファイ

バーを精製するために、AtaA ファイバーの根元部分に特異性の高いプロテアーゼの認識アミノ酸配列を分子生物学的手法により導入しておき、AtaA 欠損株に発現させ、AtaA を細胞表層から切り出し精製することに申請者らは成功した (図1)。このようにして精製された AtaA ファイバーは、もともと AtaA の生産システムを持つホストで生産されているため、AtaA 本来の性質をほぼ完全に

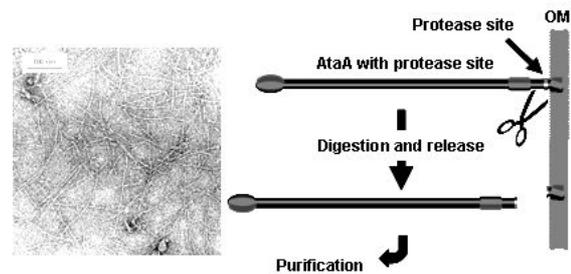


図1 AtaA タンパク質の細胞表層からの切り出し精製法

保持している。

2. 研究の目的

本研究では、アシネトバクター属細菌の表層に存在し、さまざまな非生物表面に強く付着する巨大なファイバータンパク質、AtaA から、強い付着に関与する機能部位を独自の「ファイバー切り出し精製技術」を駆使して天然状態のまま精製し、ファイバータンパク質を構成している個々の特長的なドメイン構造のどれが非生物表面への接着に関与するのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AtaA ファイバーへのプロテアーゼ認識部位の付加と改変 AtaA 発現細胞の取得

HRV 3C プロテアーゼ認識サイトを AtaA ファイバーの N 末端側から順次導入し、これを発現させたアシネトバクター属細菌をプロテアーゼ消化することで、AtaA の各ドメインを含む N 末端側フラグメントを取得した。プロテアーゼ認識サイトを導入する部位は、こ

れまでの研究から得られている AtaA の部分的な結晶構造解析の情報を活用し、分子表面に接しているペプチドのループ部分（5 つある各 FGG ドメインのループ）をそれぞれターゲットとし、HRV3C プロテアーゼの認識サイトを N 末端に近いほうから順に導入した（3CFGG1~5）。変異を入れた AtaA 遺伝子は AtaA がノックアウトされた Tol 5 細胞で発現させ、それぞれの発現株について付着機能と凝集性に変化がないか確認した。

（2）プロテアーゼ消化によって得られた AtaA 断片の精製

樹立した発現細胞からプロテアーゼ消化によって、さまざまなドメイン構成をもつ AtaA 断片の精製を試みた。精製方法は 30% 飽和硫酸沈殿と限外ろ過で行った。精製された AtaA ファイバー断片は Native-PAGE で多量体を維持していることを確認し、透過型電子顕微鏡（TEM）や CD スペクトル測定によってファイバー構造や二次構造を保持していることを確認した。

（3）精製した AtaA ファイバー断片の吸着性の解明と機能ドメインの同定

精製した適切な構造を保持した状態の AtaA ファイバー断片を用いて、修飾した非生物表面に対する吸着性を QCM センサーを使った測定法によって評価した。

（4）精製した AtaA ファイバー断片の吸着性に関与する分子修飾の同定

吸着性に関与するドメインについて、糖鎖修飾が存在しないかをレクチンブロッキングと質量分析で確認した。

4．研究成果

AtaA ファイバーの強い非特異的付着性を担うタンパク質の構造を明らかにするために、Tol 5 細胞表面から AtaA ファイバーを切り出す技術を用いて、様々なファイバー上のタンパク質ドメインを含む AtaA ファイバー断片の精製を試みた。すでに構造が明らかと

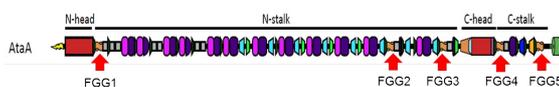
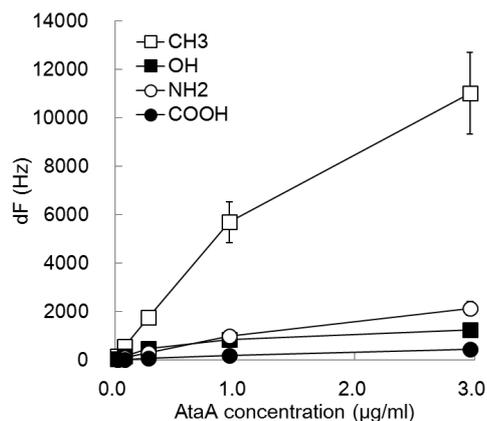


図2 AtaA ファイバー上のプロテアーゼサイトの挿入部位

なっているファイバー上の 5 つの FGG ドメインにそれぞれ HRV3C プロテアーゼにより切断される配列を付加した 3CAtaA_FGG1~5 コンストラクトを作成（図 2）、あらかじめ AtaA をノックアウトした Tol 5 細胞に発現させた。その結果、5 つのうち 4 つは野生型と同様の付着凝集性を示すも、N 末端のヘッドドメインの根元付近にある FGG ドメインにプロテアーゼサイトを導入した 3CAtaA_FGG1 は顕著な付着凝集性の低下が見られた。3CAtaA_FGG2~4 についてはプロテアーゼ処理により AtaA ファイバー断片が得られたが精製後の収量は FGG5 にプロテアーゼサイトを導入したものと比べて低かった。FGG5 については、収量良く精製ファイバーの断片が反応上清から得られ、Native-PAGE, TEM および CD スペクトル測定によって 3 量体形成やファイ



Functional group	Property	Kd [M]
-CH3	Hydrophobic	2.6×10^{-9}
-OH	Hydrophilic	6.8×10^{-10}
-NH2	Positive charged	3.9×10^{-9}
-COOH	Negative charged	9.0×10^{-9}

図3 様々な官能基をもつ表面への AtaA 分子の付着

バー構造、二次構造の保持が確認されたため、これをもちいて AtaA 分子の物性および付着性を検討したところ、様々な特性をもつ表面

に付着することが QCM を用いた解析により確認された(図 3)。

また、加熱や pH の変化に対しては、pH12 の緩衝液や希塩酸で処理しても二次構造を維持していること、二次構造の変性には 80 以上を要するといったことから、ファイバー構造の堅牢性が明らかとなった。ファイバーの付着性に関しては、熱変性の実験から、変性したファイバーには付着性がないことが確認された。したがって AtaA ファイバーの付着性は非特異的なものであるにもかかわらず、その立体構造の形成が不可欠であることが示された(発表論文)。

上記のように FGG5 で切断した AtaA ファイバーの分子量は約 1000 kDa にも達する。このようなほぼ天然の性質を保持した巨大な TAA 分子を精製し、直接その特性を解析したのは本研究が世界で初めてである。このような結果を得ることは、従来のような大腸菌にてリコンビナントタンパク質として発現精製する方法や、細菌細胞表面に分子を発現させて、発現細胞の表現型を解析する方法では

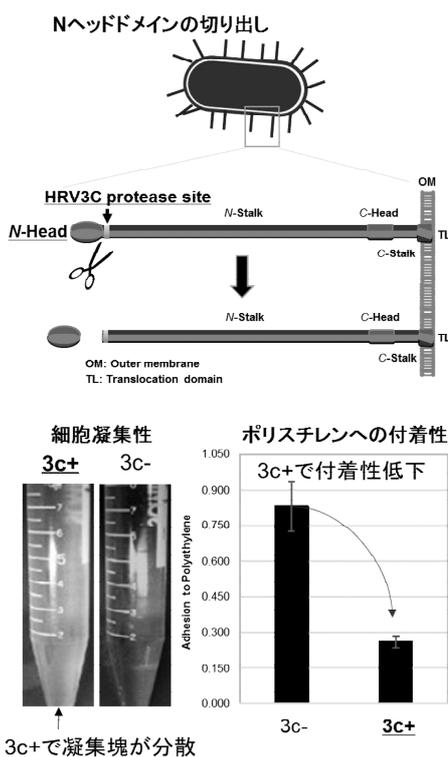


図 4 Tol 5 細胞における AtaA N ヘッドドメインの特異的切断と、切断による細胞の付着凝集性の変化

到底実現不可能であった。

N ヘッドドメインの根元付近に存在する FGG ドメインについて、プロテアーゼ認識サイトの導入部位を再検討し、最終的にはプロテアーゼ認識サイトを持ち且つ付着凝集性が低下しない 3CAtaA_FGG1 の作成に成功した。これを発現させた細胞を HRV3C プロテアーゼで処理し、N ヘッドドメインを反応上清中に遊離させることに成功した。また切断処理後の細胞は凝集性と付着性が顕著に減少することが明らかとなった。このことは N ヘッドドメインが AtaA ファイバーの機能を担う重要なドメインであることを示唆していた(図 4)。

従来 TAA に存在するヘッドドメインは動物の生体分子であるコラーゲンやフィブロネクチンに結合することが報告されていたが、本研究によって、様々な非生物表面への付着についてもヘッドドメインが関与する可能性が示された。今後はプロテアーゼ処理後の反応上清より N ヘッドドメインを精製し、その特性を調べる予定である。

最後に天然の AtaA ファイバーに存在する翻訳後修飾に関して、糖鎖修飾の有無を検討した。FGG5 および FGG1 で切断して得られたファイバー断片をもちいて、レクチンプロットを行ったところガラクトースや N アセチルガラクトサミンを認識するレクチンと反応性があることが示唆された。また質量分析に供した結果、上記の糖が付加している可能性が示された。しかしながらこれらの糖が AtaA ファイバーの付着性や凝集性にどのように関与しているのか現在のところ不明であるが、TAA の糖鎖がその機能の発揮に必要であるという報告がなされている。

< 引用文献 >

Ishikawa M, Shigemori K, Suzuki A, & Hori K (2012) *J Biosci Bioeng* 113(6):719-725.

Ishikawa M, Nakatani H, & Hori K
(2012) *PLoS One* 7(11):e48830

Zhang P, *et al.* (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37):13630-13635

Valle J, *et al.* (2008) *J Bacteriol* 190(12):4147-4161.

Lyskowski A *et al.* (2011) *Adv Exp Med Biol*.715:143-158.

Rempe KA *et al.* (2015) *MBio*.6(4):
e01206-15

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)

An Acinetobacter trimeric autotransporter adhesin reaped from cells exhibits its nonspecific stickiness via a highly stable 3D structure.

Yoshimoto S, Nakatani H, Iwasaki K, Hori K.

Sci Rep. 2016 Jun 16;6:28020.

doi: 10.1038/srep28020.

査読有

[学会発表] (計 3 件)

吉本将悟, 中谷肇, 堀克敏

Characterization of a Trimeric Autotransporter Adhesin from a highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol5
The III International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2014) マドリッド (スペイン)

2015 年 10 月 01 日

中谷 肇

バイオフィルムの形成メカニズムと細胞表面分子の役割

膜工学サロン講演会 神戸大学 (神戸市)

2016 年 3 月 17 日

[その他]

ホームページ等

名古屋大学 プレスリリース

http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20160616_engg.pdf

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 肇 (NAKATANI Hajime)

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号 : 80456615