

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14062

研究課題名（和文）材料非特異接着タンパク質AtaAの接着機構の理解

研究課題名（英文）Elucidation of the adhesion mechanism of the non-specific adhesion protein AtaA

研究代表者

吉本 将悟（Yoshimoto, Shogo）

名古屋大学・工学研究科・研究員

研究者番号：90806291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、材料非特異的でありながら高い接着性を示すAtaAの接着機構を明らかにすることである。AtaAの接着機能部位と接着駆動力の解析を行い、以下の成果を得た。水晶共振子マイクロバランス（QCM）を用いた接着解析により、接着駆動力を明らかにした。AtaAの変異体を構築しその接着性を評価することで、機能に深くかかわる部位を明らかにした。上述の知見を基にAtaAの接着特性を示すタンパク質を再構成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非特異的ながら迅速かつ強固であるというAtaAの水中接着特性は他に類をみない。既知のメカニズムでは説明しにくいAtaAの非特異的接着機構に関する知見は、生体分子と材料表面との相互作用を理解し制御する上で重要なものである。また、AtaAを利用することで細菌やペプチド、酵素、リボソームなどのバイオ材料を任意の材料表面に対して簡便に固定化・修飾できるため、その接着を理解することは応用技術の発展をもたらす。水中かつ温和な条件で取り扱う必要のあるバイオ材料のための新規固定化法として、バイオデバイス開発の加速を後押しすることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is clarification of the adhesion mechanism of AtaA, which exhibits non-specific and high adhesiveness. Through the analysis of the functional sites and the adhesion-driving force of AtaA, the following results were obtained. (1) Adhesion analysis using a quartz crystal microbalance (QCM) revealed the adhesion-driving force of AtaA. (2) By constructing mutants of AtaA and evaluating their adhesive properties, the functional sites were determined. (3) Based on the above findings, we succeeded in reconstructing a protein that exhibits AtaA-like adhesion properties.

研究分野：生物工学

キーワード：接着 吸着 タンパク質 微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドやタンパク質、核酸、細菌、細胞といったバイオ材料は、基盤表面に固定化することで効率よくその機能を利用することができる。しかし従来の固定化法では固定化に伴う失活や脱離、包括用ゲル中での物質の拡散律速などが問題となっていた。トルエン分解菌として単離された高接着性細菌 Tol 5 はプラスチックやガラス、金属など様々な表面に対し強固に接着する。研究代表者はこれまでに、Tol 5 の接着因子であるファイバー状タンパク質 AtaA が分子レベルで高い接着性を示すことを明らかにしてきた。AtaA を接着タグとして用いることで、バイオ材料を任意の基盤表面に簡便に固定化・修飾できるため、従来法の問題を解決する革新的な固定化技術として期待されるが、AtaA がどのように接着性を発揮しているのかはわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、AtaA の接着機能部位と接着駆動力を詳細に解析することで、材料非特異的でありながら高い接着性を示す AtaA の接着機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、変異体解析により AtaA 中の接着機能部位を、物理化学的解析により接着駆動力を明らかにした。そこで得られた知見を基に、非接着性の類似タンパク質に変異を加えることで AtaA と同様の非特異かつ高い接着性を再現し、AtaA 接着の構成的理解を目指した。

#### 1. 接着駆動力の解明

材料表面に対する AtaA の接着に重要な相互作用、すなわち接着駆動力を明らかにするため、接着の熱力学的解析を行った。QCM センサーに対する精製 AtaA タンパク質の親和性を 15 から 40 まで 5 ごとに測定し、van't Hoff プロットを作成した。プロットの傾きから、接着が水素結合や静電相互作用に起因するエンタルピー駆動なのか、疎水相互作用や AtaA の構造変化に起因するエントロピー駆動なのかを解析した。さらに、溶液に塩または有機溶媒(アセトニトリル、DMSO など)を加えることでそれぞれ静電相互作用、疎水相互作用を弱めることができるため、これらを添加した溶液中で同様に親和性を測定することで、接着に重要な相互作用を解析した。

#### 2. 接着機能部位の解明

接着に関わるアミノ酸残基を明らかにするため、AtaA の分子表面に露出したアミノ酸残基の点変異体を構築した。水晶発振子マイクロバランス(QCM)によりセンサー表面に対する各変異体の親和性(Kd)を、原子間力顕微鏡(AFM)により各変異体とカンチレバープローブ間に働く接着力の強さを定量的に測定することで、どの残基に変異を加えると接着機能が低下するかを評価した。こうして明らかになった各アミノ酸残基の接着機能への寄与度を AtaA の立体構造上にマッピングすることで、接着機能部位に関する示唆を得た。また、AtaA が材料表面に対しどのような向きで接着しているのかを AFM で直接イメージングし、変異体解析の結果と統合して考察した。

#### 3. 接着の構成論的理解

得られた知見を基に、AtaA の接着を構成的に理解することを試みた。類似の構造を持つが接着性を示さないタンパク質ドメインに、AtaA の接着に関与する残基を組み込み、その接着性を評価した。その際、予期せず材料"特異的"な接着性を示す変異体が得られる可能性もあったため、接着性の評価はポリスチレン、ガラス、金属など特性の異なる複数の材料表面に対して行った。組み込んだ変異が接着性に与える影響をフィードバックして組み込む変異を繰り返し選定し、AtaA 様の接着性を示すタンパク質を再構成することで、接着に関わる残基とその十分条件を調べた。

### 4. 研究成果

本研究では、AtaA の接着機能部位と接着駆動力を詳細に解析することで、材料非特異的でありながら高い接着性を示す AtaA の接着機構を明らかにすることを目的として、以下の成果を得た。

水晶発振子マイクロバランス(QCM)を用いた接着解析により、接着駆動力を明らかにした。

AtaA の変異体を構築しその接着性を評価することで、機能に深くかかわる部位を明らかにした。上述の知見を基に AtaA の接着特性を示すタンパク質を再構成することに成功した。詳細については、一定期間の後に公開予定。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aoki Sota, Yoshimoto Shogo, Ishikawa Masahito, Linke Dirk, Lupas Andrei, Hori Katsutoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Native display of a huge homotrimeric protein fiber on the cell surface after precise domain deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 412 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.09.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Furuichi Yoshihide, Yoshimoto Shogo, Inaba Tomohiro, Nomura Nobuhiko, Hori Katsutoshi	4. 巻 54
2. 論文標題 Process Description of an Unconventional Biofilm Formation by Bacterial Cells Autoagglutinating through Sticky, Long, and Peritrichate Nanofibers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2520 ~ 2529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.9b06577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noba Kosaku, Ishikawa Masahito, Uyeda Atsuko, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Yoshimoto Shogo, Matsuura Tomoaki, Hori Katsutoshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Bottom-up Creation of an Artificial Cell Covered with the Adhesive Bacterionanofiber Protein AtaA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19058 ~ 19066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b09340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohara Yuki, Yoshimoto Shogo, Hori Katsutoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 Control of AtaA-mediated bacterial immobilization by casein hydrolysates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 544 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.04.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉本 将悟	4. 巻 97
2. 論文標題 微生物の非特異的な細胞接着	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Satoshi Ishii, Shogo Yoshimoto, Katsutoshi Hori
2. 発表標題 Adhesion force mapping of cell surface of high adhesive bacteria using atomic force microscopy
3. 学会等名 The 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers ' Community (YABEC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Ohara, Shogo Yoshimoto, Katsutoshi Hori
2. 発表標題 Inhibition and Detachment of AtaA-Mediated Bacterial Adhesion by Casein Hydrolysates
3. 学会等名 The 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers ' Community (YABEC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayane Kawashiri, Shogo Yoshimoto, Taishi Matsushita, Kai Iio, Madoka Takai, Katsutoshi Hori
2. 発表標題 Comparison of the adhesiveness of Acinetobacter sp. Tol 5 among various material surfaces
3. 学会等名 The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井慧、吉本将悟、堀克敏
2. 発表標題 AFMを用いた高付着性細菌及びその細胞表層タンパク質の接着力測定
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野場考策、石川聖人、植田淳子、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、吉本将悟、松浦友亮、堀克敏
2. 発表標題 バクテリオナノファイバー蛋白質AtaAで修飾した接着性人工細胞の創出
3. 学会等名 第13回バイオ関連シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野場考策、石川聖人、植田淳子、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、吉本将悟、松浦友亮、堀克敏
2. 発表標題 高付着性蛋白質AtaAで被覆された人工細胞のボトムアップ創成
3. 学会等名 2019年度 生物工学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木壮太、吉本将悟、石川聖人、堀克敏
2. 発表標題 高接着性蛋白質AtaA の反復配列を利用した部分欠損体の構築と機能ドメイン探索
3. 学会等名 第70回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川尻彩音, 飯尾魁, 吉本将悟, 堀克敏
2. 発表標題 Acinetobacter sp. Tol 5 の難付着材料に対する付着性の評価
3. 学会等名 第70回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井慧, 吉本将悟, 堀克敏
2. 発表標題 AFMを用いた高付着性蛋白質AtaA及びAtaA被毛微生物の接着特性解析
3. 学会等名 日本化学会 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小原優季, 吉本将悟, 堀克敏
2. 発表標題 ナノファイバー蛋白質AtaAの接着阻害物質の探索と微生物固定化制御
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井慧, 吉本将悟, 堀克敏
2. 発表標題 高付着性微生物及び表層タンパク質の原子間力顕微鏡解析
3. 学会等名 化学工学会 第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川尻彩音, 吉本将悟, 松下大志, 飯尾魁, 高井まどか, 堀克敏
2. 発表標題 高付着性細菌Acinetobacter sp. Tol 5の難付着材料に対する付着性の評価
3. 学会等名 化学工学会 第84年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------