

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00319

研究課題名（和文）強接着・高伸展性蛋白質のナノ力学特性の解明とメカノケミカル材料の創製

研究課題名（英文）Elucidation of nano-mechanical properties of a highly adhesive and highly extensible protein and creation of mechanochemical materials

研究代表者

堀 克敏（Hori, Katsutoshi）

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：50302956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では強接着・高伸展性を示すバクテリオナノファイバー蛋白質AtaAの動力学的挙動を原子間力顕微鏡測定および分子動力学計算により詳細に解析した。AtaAを構成するドメインは引張に対してそれぞれ全く異なる力学応答を示し、筋肉タンパク質のタイチン以上に堅いドメインも存在した。実際の測定結果と計算結果を合わせて解釈することで、複雑な四次構造を持つ蛋白質が示すナノ力学応答特性とその機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の力学挙動、換言するとナノレオロジーは世界で注目の研究分野であるが、AtaAのような多種類の構造がコイルドコイルで連結された複雑な四次構造を持つ多量体蛋白質の解析事例はなく、重要かつ新たな知見を与えるものである。また本研究の知見を基に、特定の力で伸展シグナルを検知する仕組みを導入したり、望ましい力学特性を示すドメインを連結して超高分子量繊維や蛋白質ゲルを作出することで、新奇メカノセンサーやメカノバイオロジー操作基材開発への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a detailed analysis of the kinetic behavior of the bacterionanofiber protein AtaA, which exhibits strong adhesion and high extensibility, using atomic force microscopy and molecular dynamics simulations. Each domain of AtaA showed a completely different mechanical response, with some domains being tougher than the muscle protein titin. By combining and analyzing the measurement results with the simulation data, we clarified the nanomechanical response and mechanisms of proteins with complex quaternary structures.

研究分野：生物工学

キーワード：ナノファイバータンパク質 強接着 高伸展性 ナノ力学 メカノケミカル材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酵素のセンサー素子への利用に加え、昨今、蛋白質分子をアクチュエーターや分子モーター素子などの次世代材料として利用しようという研究が活発化している。蛋白質材料は摩擦係数の低さや変換効率の高さなどが、人工材料より特段に優れているという特徴を有する。蛋白質を材料化するには、注目する機能だけでなく、力学特性や耐久性、接着性といった特性にも考慮する必要がある。このような材料特性は、様々な蛋白質に求められる基本特性であるとも言える。使用条件や適用場所に応じて、求められる基本特性のスペックが決まる。

研究代表者の堀は、疎水性のプラスチックから親水性のガラス、金属材料まで、様々な材料に強固に接着可能な微生物接着蛋白質 AtaA を発見し、接着機構の解明や細胞の固定化・分子接着技術の開発など、基礎と応用の両面で研究を進めてきた。AtaA はホモ三量体から成るナノファイバー（平均直径 5 nm、長さ 250 nm）を形成し、細菌細胞の脂質外膜から生える。その微細構造は、 $\beta$  ストランドによって形成される多数のドメイン構造を、コイルドコイル（三重超らせん構造）が繋いだ複雑な高次構造をとる（図 1）。構造解析等により、AtaA 分子の強固な接着・固定化力を発揮する秘密は、分子と表面との相互作用だけでなく、AtaA の分子構造が柔軟性と強靭性を与え、それ自体にも内在されていることが明らかになりつつある（図 2）。高次構造は耐酸・塩基性、熱安定性を示す。また、細胞から生えている AtaA 分子を原子間力顕微鏡（AFM）探針で伸展すると、興味深い力学特性を有することがわかったが、その詳細は未知である。AtaA を構成する多様なドメインの力学特性を明らかにすることで、蛋白質の構造と力学特性との関係についての知見が蓄積されるとともに、ユニークな力学特性を示す蛋白質材料は、例えばせん断応力に対するメカノセンサーやメカノバイオロジー操作基材への応用が期待される。

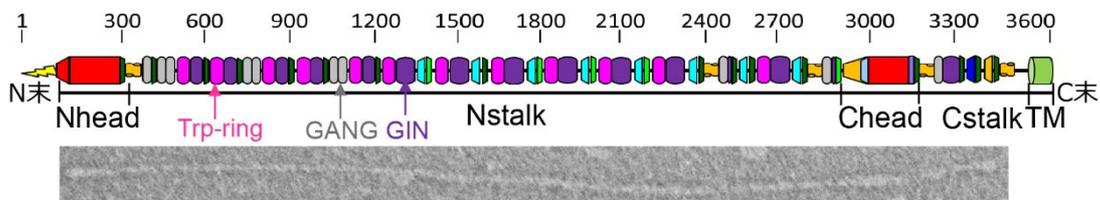


図 1. AtaA の構造の模式図。多種多様なドメインがモザイク状に並びファイバー構造を形成する。

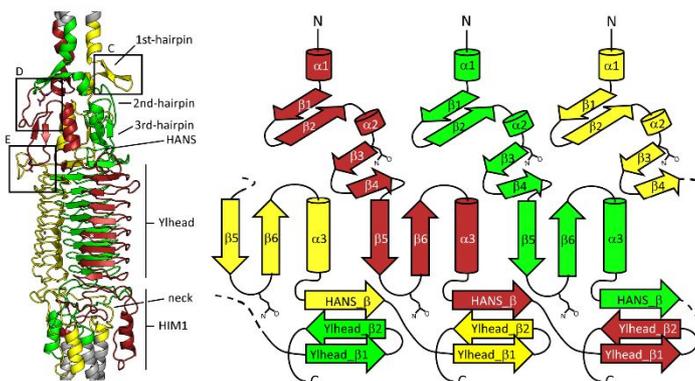


図 2. Chead の高次構造（左）と三量体構成ポリペプチドの4次構造トポロジー（右）。3本のポリペプチドが交差しており、また、Chead の中心構造であるプリズム Ylhead を N 末（上）側から3つの帽子状構造で、C 末（下）側からネック構造で補強している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。複雑な AtaA 分子およびその構成ドメインがどのような力学的特性を示すのか、そこから蛋白質の構造変化と動的力学挙動との関係を導き出し一般化することができるか、そのような力学特性を活かし、メカノケミカルに適用可能な新規の伸縮性蛋白質材料を創製できるか。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 細胞表層上の AtaA 分子の AFM 計測

AFM 探針の押し込みと引き離しを繰り返すフォースクランプ法により、ファイバーの伸展と弛緩の反復性を調べ、構造変化の可逆性について調べる。可逆的でリフォールディングするという予備データはあるが、興味深い力学特性であるので、探針の移動速度や反復前の回復待機時間な

どのパラメータを変え、詳細にデータをとる。

### 3-2. 各種ドメインの組換え蛋白質の AFM 計測

結晶構造解析に利用した各種ドメイン組換え蛋白質に固定化タグと探針相互作用タグを付加し、基板に固定した上で、AFM 計測する。これにより、各種ドメイン構造のアンフォールディング過程の動的力学挙動の詳細を明らかにする。

### 3-3. 構造変化の分子動力学計算

ドメインのアンフォールディング過程の構造の動的変化を実験では求めることは極めて困難である。そこで、分子動力学計算によりシミュレートする。上記の AFM 計測の結果と合わせて、各種高次構造の変化と力学応答の関係を解明し、整理する。除荷後のファイバー収縮時の構造変化について部分的にシミュレートし、リフォールディングのタイムスケールについても考察する。

### 3-4. メカノケミカル材料の創製

項目 2 と 3 で得られた情報をもとに、様々な粘弾性を示すドメインを複数連結し、欲しい粘弾性を示すような人工蛋白質を設計し創製する。また、AtaA 分子同士の架橋により、超高分子量 AtaA ファイバー・ゲルを創製する。並行して、合成高分子ポリマーと AtaA からなるハイブリッドゲルを設計、創製する。

## 4. 研究成果

### 4-1. AtaA 分子およびドメイン欠損体ライブラリーの AFM 計測

AFM 探針の押し込みと引き離しを繰り返すことで、ファイバーの強靱性と伸展と弛緩の反復性を調べることを試みた。AtaA 元来の接着力で AFM 探針へ AtaA 分子の固定し測定を行ったところ、全長を伸展しきる前に AtaA が探針から脱離してしまうことが明らかになった。そこでファイバーの先端に共有結合を形成可能なタグを融合し、それを介して AtaA を探針に固定し再度測定を行ったところ、AtaA 全長の伸展に相当するフォースカーブを取得することに成功した。その結果、AtaA には他の一般的なタンパク質と比べ、非常に強度の高い領域があることが示唆された。さらに回復待機時間を検討しながら探針の押し込みと引き離しを繰り返したところ、複数回類似のフォースカーブを取得することに成功した。

### 4-2. 各種ドメインの組換え蛋白質の AFM 計測

固定化タグと探針相互作用タグを付加した AtaA の各ドメインを基板に固定化し、AFM の探針で引き伸ばす過程を計測することにより、アンフォールディング過程の動力学挙動を調べた。探針へのタンパク質の固定化には共有結合可能なタグを用いた。AtaA を構成している複数のドメインについてフォースカーブを取得することに成功し、各ドメインの力学強度に関する知見が得られた。特に、Chead 領域のアンフォールディングには 500 pN 以上の力が必要であり、引っ張りに対して高い力学強度を示すことが明らかになった。

### 4-3. 構造変化の分子動力学計算

すでに立体構造が明らかになっている Chead 領域をモデルとして、伸展をシミュレートするのに適切な系を構築した。Chead の分子内を力がどのように伝わるかを解析したところ、引張軸方向だけでなく垂直方向にも力が伝搬していることが明らかになった。この知見を基に Chead 変異体のモデル構造を構築し、その変異体に引張方向に力を加えた時の伸展のシミュレーションを行った。その結果、Chead に特徴的な動的力学挙動に重要な部位を明らかにした。さらに、AtaA を構成する他のドメインについても同様に引張方向に力を加えた時の伸展のシミュレーションを行ったところ、それぞれ全く異なる力学応答を示した。タンパク質の構造ごとに整理すると、ストランドの向きと力学応答に相関性があることが明らかになった。また、ドメイン間の相互作用が分子全体の動的力学挙動に大きく影響することが明らかになった。

以上、本研究では AtaA の動力学挙動を詳細に解析することで、複雑な四次構造を持つ蛋白質の構造とナノ力学特性を明らかにした。本研究で得られた知見は、メカノセンサーやメカノバイオロジー操作基材設計への応用が期待される。成果の詳細については、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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishii Satoshi, Yoshimoto Shogo, Hori Katsutoshi	4. 巻 606
2. 論文標題 Single-cell adhesion force mapping of a highly sticky bacterium in liquid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Colloid and Interface Science	6. 最初と最後の頁 628 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcis.2021.08.039	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 Hori Katsutoshi, Yoshimoto Shogo, Yoshino Tomoko, Zako Tamotsu, Hirao Gen, Fujita Satoshi, Nakamura Chikashi, Yamagishi Ayana, Kamiya Noriho	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent advances in research on biointerfaces: From cell surfaces to artificial interfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 195 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.12.004	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 Weikum Julia, Kulakova Alina, Tesei Giulio, Yoshimoto Shogo, Jaegerum Line Vejby, Schutz Monika, Hori Katsutoshi, Skepo Marie, Harris Pernille, Leo Jack C., Morth J. Preben	4. 巻 10
2. 論文標題 The extracellular juncture domains in the intimin passenger adopt a constitutively extended conformation inducing restraints to its sphere of action	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77706-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 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 -

1. 著者名 Yoshimoto Shogo, Aoki Sota, Ohara Yuki, Ishikawa Masahito, Suzuki Atsuo, Linke Dirk, Lupas Andrei N., Hori Katsutoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of the adhesive domain of AtaA from Acinetobacter sp. Tol 5 and its application in immobilizing Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1095057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2022.1095057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計18件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 S. Yoshimoto, K. Hori
2. 発表標題 Adhesion mapping of a highly adhesive bacterium using atomic force microscopy
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 J. Sasahara, A. Suzuki, K. Fujimoto, S. Okazaki, K. Hori
2. 発表標題 Molecular dynamics simulation of adhesion process of a highly adhesive protein AtaA's N-terminal domain in water
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Hori
2. 発表標題 Application of a bacterionanofiber protein to cell surface display engineering
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 克敏
2. 発表標題 接着性被毛細菌の細胞接着・バイオフィーム形成機構と応用例
3. 学会等名 一般財団法人 バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学計算による高接着タンパク質の材料表面への接着過程解析
3. 学会等名 生物工学会若手研究者の集い(若手会)夏のオンラインセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 堀 克敏
2. 発表標題 MD計算を用いた疎水・親水性表面に対する高接着タンパク質の接着挙動変化解析
3. 学会等名 2021年度 日本生物工学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木浩平, 吉本将悟, 堀 克敏
2. 発表標題 AFMを用いたファイバータンパク質AtaAの力学特性解析法の確立
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学計算に基づいた高接着タンパク質の材料表面との相互作用解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム, オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本将悟, 堀 克敏
2. 発表標題 高付着性細菌の定量的付着力解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 材料表面の違いに応じた高接着タンパク質の接着挙動変化のMD計算による解析
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学解析による高接着タンパク質の水中接着配向推定
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Hori, S. Yoshimoto,
2. 発表標題 The trimeric autotransporter adhesin of the highly adhesive Acinetobacter strain Tol 5
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 克敏
2. 発表標題 微生物の毛の機能と応用展開
3. 学会等名 大隅ライフサイエンス研究会第4回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本貴幸, 笹原 純, 吉本将悟, 堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学計算を用いた細菌表層テザータンパク質の力学応答解析
3. 学会等名 生物工学会若手研究者の集い 第三回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹原 純, 鈴木淳巨, 藤本和士, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 高接着タンパク質の疎水性表面への接着過程に関する分子動力学解析
3. 学会等名 生物工学会若手研究者の集い 第三回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 周、吉本将悟、堀 克敏
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたAtaAのC末端パッセンジャードメインの1分子強靱性解析
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹原 純、橋本貴幸、藤本和士、吉本将悟、堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションによる細胞表層タンパク質AtaA_Cheadの力学応答解析
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本将悟、堀 克敏
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた高付着性細菌の1細胞・1分子付着力解析
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	藤本 和士  (Fujimoto Kazushi)  (70639301)	名古屋大学・工学研究科・助教   (13901)	

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			
ドイツ	マックスプランク研究所			
ノルウェー	オスロ大学			
英国	ノッティンガムトレント大学			