

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15098

研究課題名（和文）ナノファイバータンパク質AtaAの粘弾性発現機構解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanical property of nanofiber protein AtaA

研究代表者

吉本 将悟（Yoshimoto, Shogo）

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：90806291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノファイバータンパク質AtaAの粘弾性発現機構を明らかにすることを目的として、原子間力顕微鏡と分子動力学シミュレーションを用いてAtaAのナノ力学特性を解析した。結果として、想定より強靱なドメインがAtaAに存在することを発見し、それらの力学特性が緻密に設計されたタンパク質の立体構造に基づくことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AtaAの粘弾性発現機構が明らかになることで、望みのナノ力学特性をもった人工タンパク質をタンパク質工学により設計、作出可能になる。その結果、タンパク質を原料とした構造材料や水中接着剤の開発につながり、低炭素社会や循環型社会の実現に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the nanomechanical properties of the nanofiber protein AtaA using atomic force microscopy and molecular dynamics simulations with the aim of elucidating the mechanism of viscoelasticity of AtaA. As a result, we found that tough domains exist in AtaA, and that these mechanical properties are based on the precisely designed three-dimensional structure of the protein.

研究分野：生物工学

キーワード：タンパク質 原子間力顕微鏡 1分子解析 ナノ力学 オートトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

タンパク質、核酸、細胞といったバイオ材料は温和な条件下で高い認識・反応特異性を示すため、物質の微量検出や低環境負荷型の物質変換に有用である。バイオ材料は一般に高価かつ脆弱なため、効率的に利用するために基板や担体へ固定化されるが、架橋法、物理吸着法、ゲル包括法といった従来の固定化法には高コスト、失活、低固定化効率、ゲル内での拡散律速などの欠点があり、固定化するバイオ材料や基板の種類ごとに方法を検討する必要もあった。

アシネトバクター属細菌 Tol 5 由来のナノファイバータンパク質 AtaA (図1) はプラスチックからガラス、金属、さらにはテフロン (PTFE) など様々な材料表面に対し水中で非常に高い接着性を示す。別の有用細菌に *ataA* 遺伝子を導入するだけで接着性を付与できるため、AtaA は新たなバイオ材料固定化マテリアルとして期待されている。最近の研究で、AtaA を介した細菌の接着には、材料表面との直接的な相互作用だけでなくファイバーの粘弾性も重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかしその粘弾性発現メカニズムは全くの不明であった。

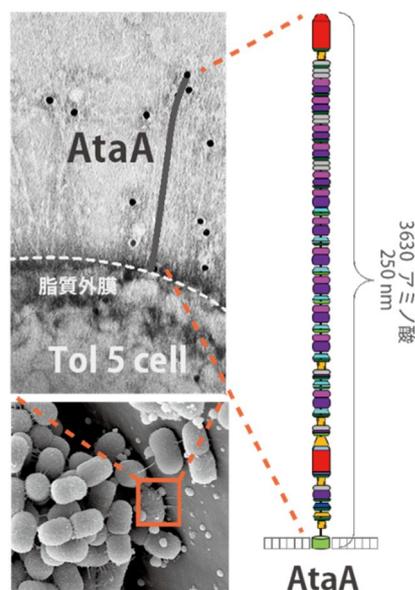


図1. Tol 5 の細胞表面層に存在する AtaA ファイバーの電子顕微鏡像と模式図.

2. 研究の目的

本研究では、AtaA のナノ力学特性を原子間力顕微鏡 (AFM) と分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて解析することで、AtaA のどこが、どのように、粘弾性を発揮するのかをアミノ酸残基レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 部分欠損変異体による粘弾性領域の絞り込み

AtaA に含まれる多数のドメインのうちどこが粘着性に関与するか調べるため、複数の AtaA のドメイン欠損変異体について、AFM を用いて水中でフォースカーブを測定した。まず、AtaA のドメイン欠損変異体を発現させた細菌細胞をポリイミンコートしたガラスボトムディッシュ上に固定した。ガラスボトムディッシュを PBS で満たし、液中用窒化シリコンカンチレバー (BioLever mini, OLYMPUS) を細菌細胞に押し付け、 $1 \mu\text{m/s}$ で引き離す際にプローブ間に働く力の大きさと距離を検出した (図2)。

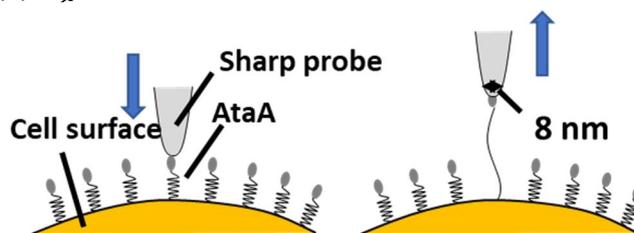


図2. AFM による菌体上の AtaA のフォースカーブ測定.

2. リコンビナントタンパク質の力学特性評価

AtaA の各ドメインの力学特性を明らかにするため、まず、ターゲットドメインの N 末端にシステインを、C 末端に Spy タグと His タグを融合したリコンビナントタンパク質を設計し、大腸菌で生産、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。これを金コート基板に滴下することで、システインに含まれる SH 基と金との間の結合によりタンパク質を金基板の上に固定した。SpyCatcher を修飾した AFM プローブを金基板表面近傍で 10 秒間静止させ SpyCatcher と Spy タグ間でイソペプチド結合を形成させた後、 $1 \mu\text{m/s}$ でプローブを引き上げることでリコンビナントタンパク質を引き伸ばし、距離と力の情報を含むフォースカーブを取得した (図3)。

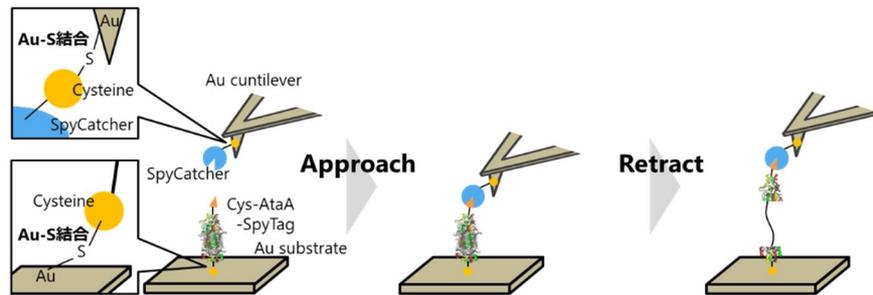


図3 . AFM によるリコンビナントタンパク質のフォースカーブ測定 .

3 . 分子動力学シミュレーション

AFM 測定のみでは明らかにしきれない、AtaA タンパク質の伸展に伴う構造変化の過程を、分子動力学 (MD) シミュレーションにより調べた。まず、モデル水溶液中で AtaA の各ドメインの分子構造モデルを平衡化した。次に、ドメインの末端残基のうち片方の座標を固定し、もう片方を引き離す方向に力を加える計算を行った (図4)。主要な構造に変化が現れるまで計算を続け、各引き伸ばし距離においてドメインに加わった力の大きさをプロットした。

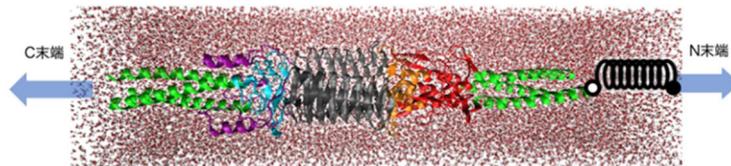


図4 . 分子動力学シミュレーションによる AtaA の伸展に伴う構造変化の過程解析 .

4 . 研究成果

本研究の結果として、想定より強靱なドメインが AtaA に存在することを発見し、それらの力学特性が緻密に設計されたタンパク質の立体構造に基づくことを明らかにした。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2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

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 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 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 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 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

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