

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289313

研究課題名(和文) 機能性バクテリオナノファイバーのデザインと被毛微生物の作出

研究課題名(英文) Design of functional bacterionanofibers and creation of fiber-coated microorganisms

研究代表者

堀 克敏 (Katsutoshi, Hori)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、申請者が発見したバクテリオナノファイバー蛋白質AtaAに、機能性分子を融合した機能性ナノファイバーをデザインし、機能性の“毛”で覆われた微生物を作出することを目的とし、次のことを達成した。ファイバーの根元にプロテアーゼ認識・切断配列を挿入したプロテアーゼ感受性ファイバーを設計し、生やした。長さを変えてファイバー先端にHis タグを挿入し、細胞表層で機能させた。ソルターゼ認識配列を挿入し、ファイバー提示後修飾技術を確立した。モデル酵素としてSNAPタグを融合したファイバーを周毛的に生やすことに成功した。一つの細胞から二種類のホモ三量体ファイバーを生やすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to design functional nanofibers obtained by fusing functional molecules to the bacteria nanofiber protein AtaA found by the applicant and to create microorganisms covered with functional "hair". I accomplished following thing. A protease sensitive fiber with protease recognition / cleavage sequence inserted at the base of the fiber was designed and grown. His-tag was inserted into the fiber tip with varying length to make it function at the cell surface. The recognition sequence for sortase was inserted and a modification method after fiber presentation was established. The fiber which was fused to the SNAP tag as a model enzyme was peritrichously grown from bacterial cells. Two kinds of homotrimeric fibers were successfully grown from a single cell.

研究分野：生物工学

キーワード：バクテリオナノファイバー 機能性ナノファイバー ファイバータンパク質 被毛微生物 ファイバー提示

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、独自に分離した *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株の細胞表層が接着性ナノファイバーで覆われていること、さらにこのファイバーが TAA に属する新規蛋白質であることを発見した (図 1)。既報の TAA は病原性グラム陰性細菌の表層に存在する接着蛋白質で、宿主生体分子への特異的接着・感染機能の他、自らを細胞外に輸送し外膜にアンカーリングする自己分泌機能をもつ (図 2)。ホモ三量体から成り、各ペプチドの長さは 300 から 3000 アミノ酸を超えるものまで多様だが、典型的にはアミノ (N) 末端からカルボキシル (C) 末端に向かって、頭部、首、柄、外膜結合部という順番に並ぶ。この中で、アミノ酸配列が比較的良好に保存されており、12 のベータシートから成る β バレルを形成する外膜結合部が、このファミリーを規定する。AtaA はこのような TAA ファミリーに共通の特徴を有するが、以下の点で他の TAA とは大きく異なる。

- (1) これまでに知られている TAA 中で最大である (350 kDa)。
- (2) ユニークな一次構造：いくつもの非常に長い繰り返し構造がモザイク状に配置した長い柄を有する。この繰り返し構造は、複数のドメインが繰り返し並んだものである。この中には他の TAA には存在しないドメインや、他には存在していてもアミノ酸配列がかなり異なるものが存在する。N 末端側に加え C 末端側の外膜結合部寄りにも二つ目の頭部が存在する。
- (3) 既報の TAA が全て生体分子に特異的に結合するのに対し、AtaA は疎水性の各種プラスチックから親水性のガラス、金属等の非生物表面に非特異的に接着する能力を有する (業績 15)。
- (4) しかも、種々の固体表面に対する親和性・接着性は極めて高い。具体的には、QCM で測定した金表面への親和性 (解離定数 K_d) は 10^{-9} M のオーダーで抗原-抗体間の親和性以上である。また、AFM で測定した負電荷表面に対する接着力は 300pN であり、これは生体分子間相互作用では最強レベルと言われるピオチン-アビジン相互作用 (150 pN) の 2 倍である。

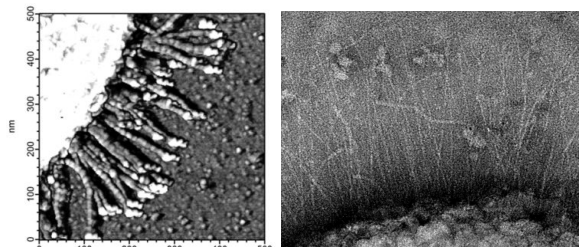


図 1. Tol 5 細胞から生える AtaA ナノファイバー。(左) AFM 像。(右) TEM 像。本研究ではこのナノファイバーをスキヤフォールドに様々な機能性ナノファイバーをデザインし、機能性の毛で覆われた微生物を新たに作出する。

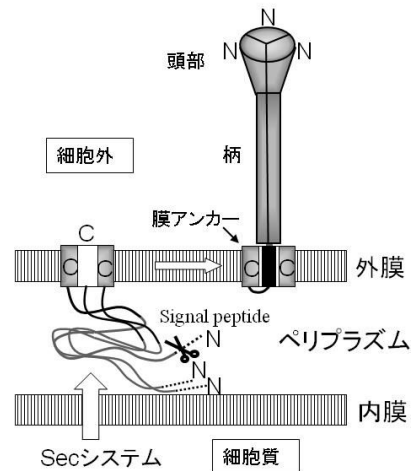


図 2. TAA の分泌・アッセムリー模式図。

このように AtaA はユニークな特徴をもち、しかも世界で唯一研究されている非病原性細菌の TAA であるため、工学的利用価値が高い。すでに申請者らは異種微生物に *ataA* 遺伝子を導入発現させ、接着性ナノファイバーを細胞表層に形成させ微生物を固定化する新技術を開発した。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質や、遺伝子工学的手法だけでは連結不可能な低分子を融合した機能性ナノファイバーをデザインするための基盤技術を構築し、機能性被毛微生物を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

AtaA をスキヤフォールドとする機能性バクテリオナノファイバーを設計し、機能性被毛微生物を作出するという目的を達成するため、次の方法により研究を進めた。

(1) スキヤフォールドの最適化と提示箇所の検討

3630 アミノ酸から成る巨大蛋白質である AtaA を、ファイバーの形成機能を保持したままどこまでどのように縮小することが可能か検討した。具体的には、His タグを AtaA または短縮 AtaA に導入し、表層提示効率や His タグの機能性を比較した。プロテアーゼ標的サイトを AtaA ファイバー上に提示して切断することを検討した。

(2) **遺伝子融合による酵素の提示**: ペプチドより大きな酵素の遺伝子を *ataA* 遺伝子に融合することで、酵素融合 AtaA を生やすことを検討した。酵素としては、蛍光基質による検出が容易な SNAP タグを用いた。

(3) **ファイバー提示後修飾**: 遺伝子操作では困難な大きな蛋白質や蛋白質以外の分子を連結するため、あらかじめ微生物細胞に生やしたファイバーに後から機能性分子を連結する手法を検討した。本研究では、ソルターゼにより、そのターゲットサイトを融合した AtaA に蛍光タンパク質 Ypet を連結した。

(4) **三量体形成制御技術の検討**: ネイティブの AtaA はホモ三量体である。一つの細胞に複数種類の機能分子を提示するために、ホモ

あるいはヘテロ三量体の組合せを制御する手法を検討した。

4. 研究成果

(1) スキャフォールドの最適化と提示個所の検討

検討: His タグ、3CAtaA

(2) 遺伝子融合による酵素の提示

(3) ファイバー提示後修飾: ソルターゼ

(4) 三量体形成制御技術の検討: デュアルディスプレイ (シングルセルから 2 種類のホモ三量体を生やす)

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 10 件)

1. H. Nakatani and K. Hori; Cell surface protein engineering for high-performance whole-cell catalysts, *Front. Chem. Sci. Eng.* 11 (1), (2017), 46-57. 査読有
2. J. C. Leo, P. Oberhettinger, S. Yoshimoto, D. B. R. K. G. Udatha, J. P. Morth, M. Schütz, K. Hori, and D. Linke; Secretion of the Intimin Passenger Domain Is Driven by Protein Folding; *J. Biol. Chem.* 291, (2016), 20096-20112. 査読有
3. S. Yoshimoto, H. Nakatani, K. Iwasaki and K. Hori; An *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin reaped from cells exhibits its nonspecific stickiness via a highly stable 3D structure, *Sci. Rep.* 6, (2016), 28020 DOI:10.1038/srep28020. 査読有
4. 堀 克敏; バイオフィーム・微生物付着の工学利用; *膜*, 42, (2017), 54-59. 査読無
5. 石川聖人、堀 克敏; 細胞表層タンパク質の合成生物学; *生物工学会誌*, 94, (2016), 701-703. 査読無
6. 堀 克敏; 細菌接着タンパク質 AtaA 分子の特性と応用; *バイオサイエンスとインダストリー*, 74, (2016), 417-419. 査読無
7. 堀 克敏; 細菌の持つ接着ナノファイバータンパク質 AtaA; *バイオサイエンスとインダストリー*, 74, (2016), 380-381. 査読無
8. K. Koiwai, M. D. Hartmann, D. Linke, A.N. Lupas and K. Hori; Structural basis for toughness and flexibility in the C-terminal passenger domain of an *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 3705-3724. 査読有
9. K. Hori, Y. Ohara, M. Ishikawa and H. Nakatani; Effectiveness of direct

immobilization of bacterial cells onto material surfaces using the bacterionanofiber protein AtaA, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 5025-5032. 査読有

10. 堀 克敏; バイオフィームを利用した界面微生物工学; *化学療法の領域*, 31, (2015) 88-96. 査読無

[学会発表](計 26 件)

1. K. Hori; AtaA, a new trimeric autotransporter adhesin mediating strong and nonspecific adhesion of bacterial cells; 第 90 回日本細菌学会, 仙台, 2017.3.19-21.
2. K. Hori; Innovation of bioprocess through the bacterionanofiber AtaA, 2nd Korea-Japan Smart Biodesign Workshop: Technology exchange for green biotechnology, Sendai, 2017.2.4.
3. K. Hori; Innovation of bioprocess through the bacterionanofiber AtaA, i-BioP2016, Busan, Korea, 2016.12.17.
4. 堀 克敏; 微生物細胞やバクテリオナノファイバーの表面化学; 真空・表面科学合同講演会、名古屋、2016.12.1.
5. J. Kanie, Y. Ohara, H. Nakatani, K. Hori, The Contribution of translocation domain in the assembly of trimeric autotransporter adhesins, 1st Zing Protein Secretion in Bacteria Conference, Tampa, Florida, USA, 2016.11.9-12.
6. 中谷 肇、小原 優季、堀 克敏; グラム陰性菌由来のファイバータンパク質による微生物の固定化と表層提示技術の統合; 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016.9.28-30.
7. 吉本将悟、中谷 肇、岩崎 啓太、堀 克敏; Adhesion property of the nanofiber protein AtaA from the highly adhesive bacterium; 日本化学会第 96 春季年会、奈良、2016.3.24-27.
8. 北原知恵、鈴木 淳巨、堀 克敏; Creation of Lanthanide binding protein based on natural coiled coil protein; 日本化学会第 96 春季年会、奈良、2016.3.24-27.
9. 中谷 肇、堀 克敏; アシネトバクテリウ属由来の表層ナノファイバーを用いたペプチド提示技術の開発; 化学工学会第 81 年会; 大阪, 2016.3.13-15.
10. 小原 優季、松田 祐毅、中谷 肇、堀 克敏; 接着性バクテリオナノファイバー AtaA のグラム陰性細菌への導入とその応用; 化学工学会第 81 年会; 大阪, 2016.3.13-15.
11. 蟹江 純一、小原 優季、中谷 肇、堀 克敏; 機能性ナノファイバーで覆われた高付着性微生物細胞の創出; 化学工学会

- 第 81 年会 ; 大阪 , 2016.3.13-15.
12. 青木壮太、吉本将悟、平野春香、石川聖人、堀 克敏 ; 高接着性タンパク質を利用した微生物固定化技術の効率化 ; 化学工学会第 81 年会 ; 大阪 , 2016.3.13-15.
 13. H. Nakatani, K. Hori ; Application of a fibrous trimeric autotransporter adhesin from *Acinetobacter* sp. Tol 5 to the nanofiber display system, The 6th iBioK Asian Workshop, Kobe, 2015.12.7-8.
 14. 堀 克敏 ; 微生物固定タンパク質 AtaA の構造および機能上の特徴 ; 第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015.10.26-28.
 15. 林亜友美、吉本将悟、石川聖人、堀 克敏 ; 接着性ナノファイバータンパク質 AtaA と共発現するタンパク質との相互作用 ; 第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015.10.26.
 16. 小原優季、石川聖人、中谷 肇、堀 克敏 ; バクテリオナノファイバータンパク質 AtaA を用いた微生物固定化の有用性の実証 ; 第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015.10.28.
 17. 松田祐毅、吉本将悟、小原優季、古市吉秀、堀 克敏 ; 接着性ナノファイバータンパク質 AtaA を介した微生物付着の阻害物質についての検討 ; 第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島県、2015.10.28.
 18. K. Hori ; A new and highly effective immobilization method using the bacterionanofiber protein AtaA for microbial cell factory ; 2015 International Workshop on Advanced Industrial Biotechnology and Bioengineering for Sustainable Bioindustry, Hohhot, Inner Mongolia, China, 2015.7.25.
 19. S. Yoshimoto, H. Nakatani, K. Hori ; Biophysical characterization of a trimeric autotransporter adhesin, AtaA, from the highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5, FEMS 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 2015.6.7-1.
 20. K. Hori, S. Yoshimoto, M. Ishikawa, Y. Miyachi, H. Nakatani ; Characterization of AtaA, an *Acinetobacter* TAA, immobilizing bacterial cells firmly to various surfaces ; 4th International Symposium of the SFB766, Tubingen, Germany, 2015.5.5.
 21. 吉本将悟、中谷 肇、堀 克敏 ; 高付着性細菌由来ナノファイバータンパク質 AtaA の分離精製と接着特性解析 ; 日本化学会第 95 春季年会、東京、2015.3.26-29.
 22. 蟹江純一、中谷肇、堀 克敏 ; 多機能性

- ナノファイバーで覆われた被毛微生物細胞の創出 ; 化学工学会第 80 年会 ; 東京、2015.3.19-21.
23. K. Hori ; Bacterionanofiber protein AtaA useful for immobilization of microbial cell factory, 2014 Asia biohylinks meeting & Asia Biohydrogen and Biorefinery symposium, Melaka, Malaysia, 2014.12.16-18.
 24. K. Hori, Y. Miyachi, H. Nakatani, S. Yoshimoto, Y. Furuichi, M. Ishikawa ; Adhesion property of the highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol5 mediated by a new trimeric autotransporter adhesin, International Conference on Antimicrobial Research 2014, Madrid, Spain, 2014.10.1-3.
 25. S. Yoshimoto, H. Nakatani, K. Hori ; Characterization of a Trimeric autotransporter adhesin from a highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol5, International Conference on Antimicrobial Research 2014, Madrid, Spain, 2014.10.1-3.
 26. 吉本将悟、中谷 肇、堀 克敏 ; ナノファイバー蛋白質 AtaA による微生物接着の制御 ; 第 66 回 日本生物工学会大会、札幌、2014.9.9-11.

[その他]
 ホームページ等
<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/nubio2/index.html>

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
堀 克敏 (HORI, Katsutoshi)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 50302956
- (2)連携研究者
長棟輝行 (NAGAMUNE, Teruyuki)
東京大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 20124373
- (3)連携研究者
田中俊樹 (TANAKA Toshiki)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 70171775
- (4)連携研究者
鈴木淳巨 (SUZUKI Atsuo)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号 : 40196788
- (5)連携研究者
中谷 肇 (NAKATANI Hajime)
名古屋大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号 : 80456615