

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H01345
研究課題名(和文)細菌固定化蛋白質の水中接着能を利用する固体表面のワンポット自在修飾技術の創出

研究課題名(英文)Development of surface modification technology using a bacterial adhesive protein

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) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：機能性ペプチドまたはタンパク質、リポソームなどを融合したAtaAの溶液を材料表面に滴下することで、それらを固定し機能表面を創出することに成功した。また、その固定状態を制御する手法を確立した。さらに、AtaA修飾表面が細胞接着、増殖に与える影響を明らかにした。AtaAの材料表面に対する接着をAFMによる水中観察と水晶共振子マイクロバランス(QCM)による測定、さらには全原子分子動力学(MD)計算で解析することにより、接着様式に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した表面修飾技術は、AtaAに機能性ペプチドやタンパク質、リポソームなどを融合し、化学修飾をしていない任意の材料基盤に水中接触させるだけで固定化するという、迅速かつ簡便な産業界待望のものである。また、本研究で明らかになったAtaAの接着様式は、生体分子-非生物表面間相互作用の原理解明と制御に向けて非常に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：A rapid and versatile immobilization method using an adhesive protein for peptides, proteins, and liposomes onto material surfaces was developed. Furthermore, we clarified the effects of the adhesive protein-coated surfaces on cell adhesion and proliferation. The adhesion of the adhesive protein to the material surface was observed in water by AFM, measured by quartz crystal microbalance (QCM), and analyzed by all-atom molecular dynamics (MD) calculations to gain insight into the adhesion modes.

研究分野：生物機能工学

キーワード：接着蛋白質 細胞接着 微生物 表面 分子固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の堀は、プラスチック、ガラス、金属等様々な材料表面に強固に付着する細菌を単離し、その接着を担う細胞表層蛋白質 AtaA を発見した。AtaA は、グラム陰性細菌の外膜蛋白質である TAA ファミリーに属する。一般に TAA は細胞外マトリックスや宿主細胞表面に特異的に接着するが、AtaA のみが材料表面に対して非特異的ながら強い接着性を示す。AtaA は他の TAA と同様にホモ三量体のマルチドメインタンパク質であり、3630 アミノ酸のポリペプチド鎖 3 本が細胞表層で会合した長さ 250nm、直径 4nm のナノファイバーを形成する(図 1)。これまで、AtaA が細菌細胞上に存在することで、その細菌細胞が高い接着性を発揮し担体に固定化できることが示されてきた。しかし最近、AtaA は細胞から切り離した精製タンパク質としても高い接着性を示すことが明らかになった。AtaA のように細菌由来で材料非特異的な高い接着性を示すタンパク質は他に例がなく、次世代の水中接着ナノマテリアルとして期待される。

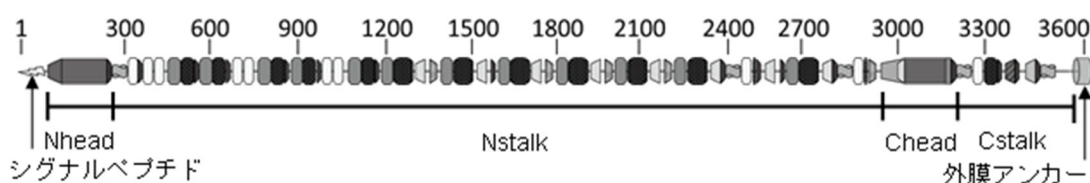


図 1. AtaA の一次構造模式図。数珠状に並ぶ反復ドメインをコイルドコイルがつなぐ。

2. 研究の目的

本研究では、AtaA に機能性ペプチドやタンパク質、リポソームなどを融合し、化学修飾をしていない材料基盤に水中接触させるだけで固定し、産業、再生医療分野等で待望の機能性表面を創造することを目的とする。また同時に、AtaA - ペプチド/タンパク質融合体と表面との結合状態を解明するとともに、それらを自在に制御する手法を創出する。

3. 研究の方法

AtaA は巨大であるため、また膜結合部位をもつため、大腸菌等でタンパク質全長を異種発現生産させることは困難であった。そこで、接着に不要であることがわかった CheadCstalk と膜結合部位を切り落とした組換え体 (NheadNstalk-AtaA) に、SNAP タグを融合した融合タンパク質 (NhNs-SNAP) を設計した。これを大腸菌で発現させた。あるいは、必要に応じてさらに短い AtaA と SNAP タグの融合体を設計した。他方、リポソームには、SNAP タグと融合可能なベンジルグアニン (BG) 基で修飾した脂質を挿入した。これと NhNs-SNAP を反応させることで、AtaA で修飾されたリポソームを作製した。また、各種短縮 AtaA と BG 基を有する機能性ペプチドを化学結合させることで、材料表面に固定できる機能性分子を作製した。機能性ペプチドまたはタンパク質、リポソームなどを融合した AtaA の溶液を材料表面に滴下することで、それらを固定し機能表面を創出することに成功した。また、その固定状態を制御する手法を確立した。さらに、AtaA 修飾表面が細胞接着、増殖に与える影響を明らかにした。AtaA の材料表面に対する接着を AFM による水中観察と水晶共振子マイクロバランス (QCM) による測定した。

4. 研究成果

研究代表者らは、AtaA ファイバーで表面を修飾したリポソームを創製した。様々な化合物や生化学システムを組み込んだリポソームは、細胞機能を模倣する人工細胞として研究が活発に進められている。人工細胞をボトムアップ的に創製することは、従来のトップダウン型の研究手法では解明が困難な複雑な生命システムを理解する手段として、広く取り入れつつある。人工細胞では、規定された分子で細胞機能を模倣することにより、システムから複雑さを取り除くことができ、分子によって引き起こされるダイナミクスまたは挙動を簡単に解釈できる。さらに、人工細胞のボトムアップ創製は、予期しない結果と生物学への新しい洞察をもたらし、研究者に新しい技術の開発を促す。しかし、リポソームとは異なり、生細胞の表面は、膜内在性タンパク質および細胞アペンデージのような表在性膜タンパク質を含むさまざまなタンパク質が存在し、構造的に複雑である。これらの構造は、リガンド認識、細胞間コミュニケーション、運動性、接着などの細胞機能に重要な役割を果たす。たとえば、哺乳類細胞はカドヘリンやインテグリンなどのタンパク質を使用して、他の細胞や ECM に付着する。これまでのところ、哺乳類の細胞表面を模倣した人工細胞が報告されているが、細菌細胞の表面構造を模倣した人工細胞のボトムアップ創製の報告例はほとんどない。ましてや、細菌細胞表層を模倣して表面付着性をもたせた酵素含有人工細胞 (人工全細胞触媒) については、報告は皆無であった。

その理由の一つは、膜貫通または内在ドメインを有する細菌細胞表層タンパク質の生合成の困難さである。また、実際の細菌細胞は、複雑な膜輸送・分泌・アッセムブリーシステムを有するが、これをリポソームの内側と表層に完全に再構成した成功事例はない。

そこで、研究代表者らは、タンパク質分泌・アッセムブリー機構を用いず、AtaA で覆

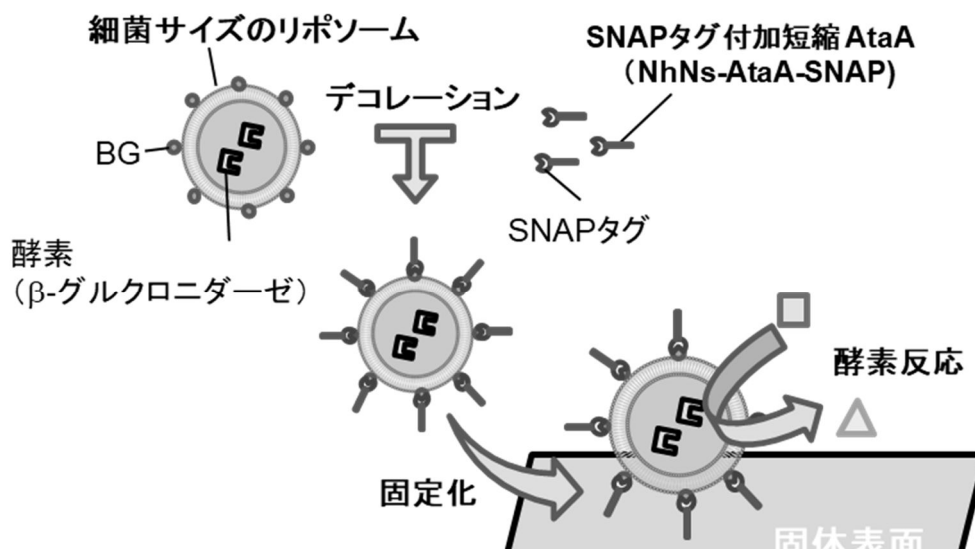


図 2 . AtaA ファイバーデコレーションリポソームの調製、固定化と酵素反応の概念図

れて付着性を発揮する人工全細胞触媒をボトムアップ創製した。大腸菌細胞内に生合成させた AtaA ファイバーとリポソームを化学結合させるリポソームデコレーション技術を開発した。その詳細を示す。

リポソームデコレーションの戦術は、外膜結合部位を切断した AtaA ファイバーの C 末側に SNAP タグを融合し、これと共有結合するベンジルグアニン (BG) 基を付加した脂質を取り込んだリポソーム (BG-リポソーム) と反応させるというものである (図 2)。この目的のために、まずは AtaA ファイバーの短縮と SNAP タグの融合物の設計を行った。通常、大腸菌内では、膜タンパク質および 60 kDa を超える外来タンパク質の生産は極めて困難であると言われている。350 kDa を超えるポリペプチド鎖が三量体構造をとる膜タンパク質である AtaA の大腸菌内での生産は、事実上不可能ではないかと考えられた。そこで、接着に関わらない Chead から C 末の膜結合部位までを削除した NheadNstalk (NhNs)-AtaA に、三量体化を促進するための GCN4-アダプターを付加し、C 末端に SNAP タグを結合させた融合タンパク質を設計した。NhNs-AtaA ペプチドは三量体化するが SNAP タグは単量体タンパク質のため、融合タンパク質 (NhNs - AtaA-SNAP) は、短縮 AtaA 三量体一分子に三分子の SNAP タグが融合したキメラ体を形成する。CD スペクトル解析や動的分散乱 (DLS) 解析から、1 MDa ほどになる融合タンパク質が目的の立体構造を有していることがわかった。大腸菌内で、これほど巨大で複雑な構造をもつ外来タンパク質の生産事例は、ほとんどないはずである。NhNs-AtaA-SNAP を精製することなく、これを生産させた大腸菌細胞破砕物と BG リポソームを混合するだけという簡便な方法により、AtaA ファイバーデコレーションリポソームを作製した。リポソームの AtaA ファイバーデコレーションは、フローサイトメトリーにより確認された。また、DLS 測定により、リポソーム粒子が AtaA ファイバーで被覆された分だけ大

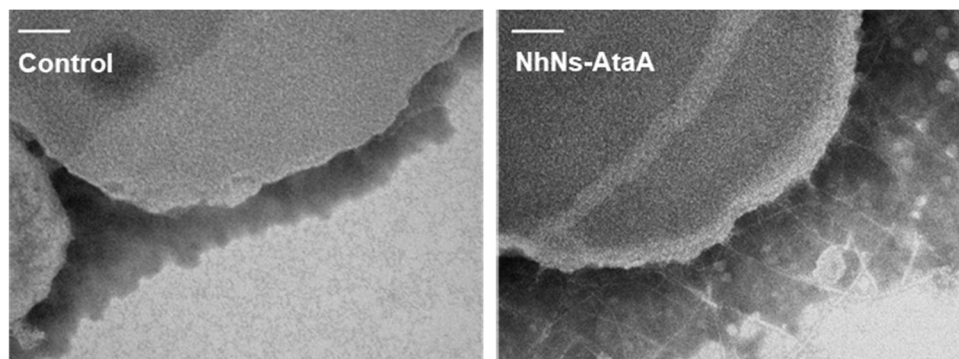


図 3 . 短縮 AtaA (NhNs - AtaA) ファイバーデコレーションリポソームの電子顕微鏡写真。コントロールは通常のリポソーム。

きくなっていることも確認された。最終的には、電子顕微鏡観察により、リポソーム上に AtaA ファイバーが観察された (図 3)。こうして、細菌細胞表層構造を模倣した人工細胞の創製に成功した。

次に、研究代表者らは、AtaA ファイバーデコレーションリポソームが、ポリスチレン表面にもガラス表面にも付着可能であることを示した (図 4)。さらに、このリポソームの内部に加水分解酵素を内包し、膜透過性の基質を投与し、固定化リポソームによる酵素反応を試みた。基質は AtaA で固定されたりポソーム内に取り込まれ、蛍光を発する加水分解産物の産生が検出された (図 5)。AtaA でデコレーションされた接着性リポソームは、様々な化学反応システムを内包した人工全細胞触媒として、新しいバイオテクノロジー技術を提供することになる。実細胞と違って自己増殖することはないので、遺伝子組換え微生物の使用が困難な環境中での使用も可能であり、バイオレメディエーションなどへの

応用も期待される。

研究代表者らは、AtaA の Nhead を、機能性分子を材料表面に固定化するためのタグ分子として利用する技術についても構築した。上述の通り、AtaA は様々な材料表面に接着が可能であるため、特に表面加工・処理しなくても簡単に汎用材料を機能化できる。NhNs - SNAP と同様に、Nhead に GCN4 アダプターを付加し、C 末端に SNAP タンパク質を結合させた融合タンパク質 Nhead - SNAP を設計した。この融合タンパク質をガラス、ポリスチレン、チタン、PTFE の表面に接着さ

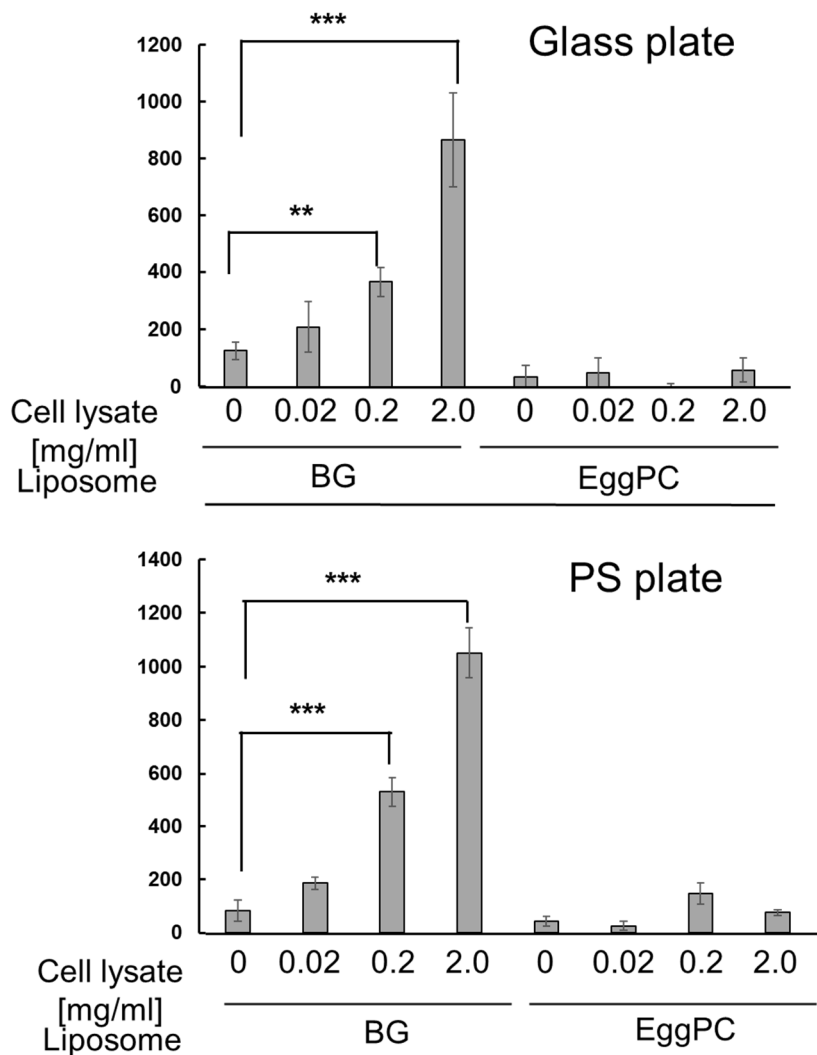


図 4. 短縮 AtaA ファイバーデコレーションリポソームのガラスプレート (上) とポリスチレン (PS) プレート (下) への付着。

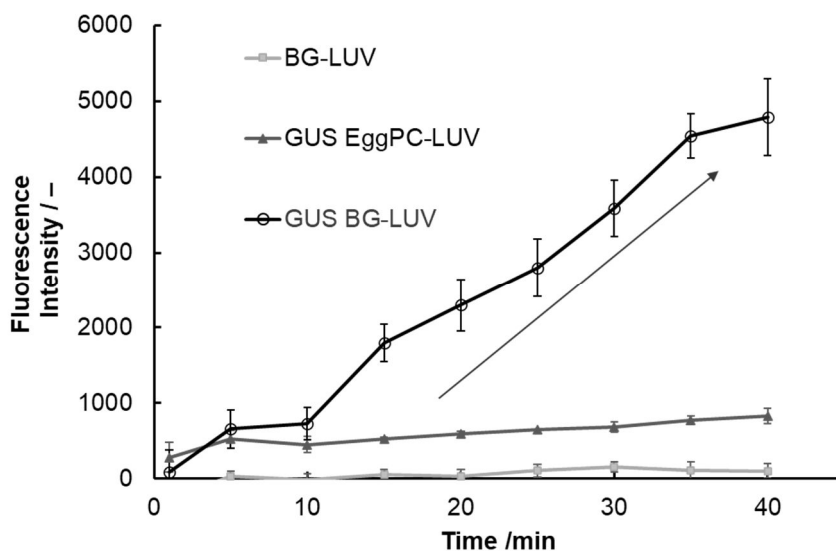


図 5. AtaA ファイバーで固定化されたりポソームに内包された酵素 GUS による加水分解反応。基質は加水分解により蛍光を発する。リポソームを固定化したプレートは時間と共に蛍光が増大。

せた後、SNAP タンパク質の蛍光基質分子である SNAP-Surface488 と反応させた。リン酸緩衝液で洗浄後、青色 LED を照射したところ、Nhead-SNAP を融合タンパク質を添加した全ての材料においてのみ、蛍光が検出された。よって、Nhead を接着タグとして SNAP タンパク質を各種材料に固定できることが示された。SNAP タンパク質には BG 基を介して様々な分子を結合させることのできるため、簡便に汎用材料の表面を機能化できる。例えば、上述の蛍光基質の代わりに BG 基を付加した抗菌ペプチドを結合させることで、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) のバイオフィーム形成を抑制することができた (図 6)。

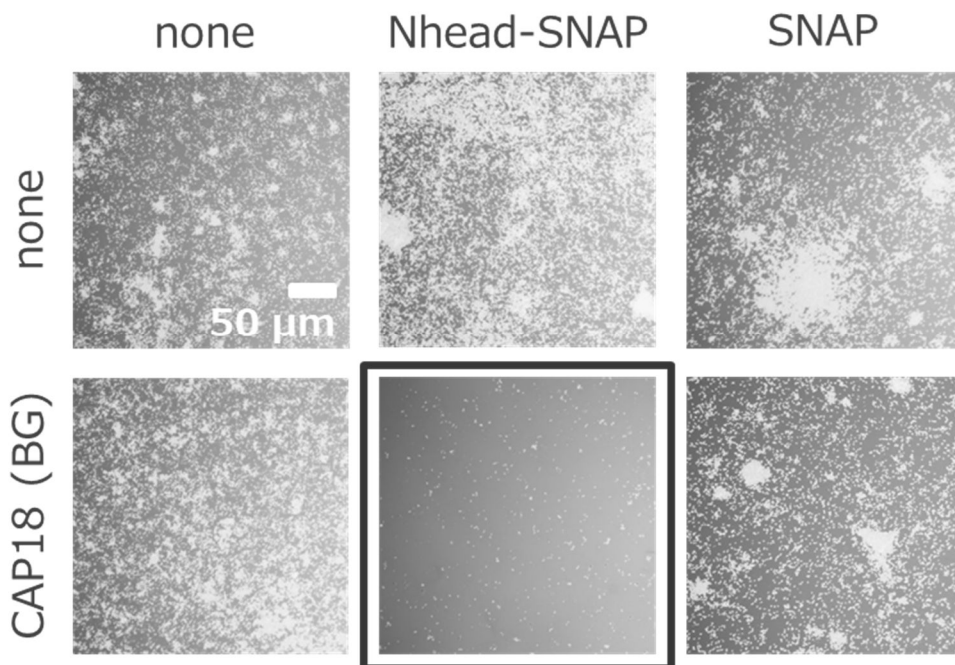


図 6 . Nhead 接着タグによる表面の抗菌化 . 抗菌活性の高い CAP18 ペプチドに BG 基を付加し、表面に固定した Nhead - SNAP に結合させた。その後、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) を添加して、表面上でのバイオフィーム形成試験を行った。バイオフィームは蛍光色素 Cyto9 で染色した。コントロールとして、何も処理していない表面 (None、左列) と Nhead と融合していない SNAP タンパク質を使用した場合の表面 (SNAP、右列) を示す。また、CAP18 を結合させていない表面もコントロールとして示す (上段)。これらコントロール表面は蛍光色素でよく染まり、緑膿菌バイオフィームが形成されたことがわかる。他方、Nhead-SNAP を固定した表面に CAP18 を結合させた表面のみ、緑膿菌のバイオフィーム形成が抑制された (下段中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Y. Furuichi, K. Iwasaki, and K. Hori	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell behavior of the highly sticky bacterium <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 during adhesion in laminar flows	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26699-5	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 -
1. 著者名 H. Nakatani, N. Ding, Y. Ohara, and K. Hori	4. 巻 8
2. 論文標題 Immobilization of <i>Enterobacter aerogenes</i> by a trimetric autotransporter adhesin, AtaA, and its application to biohydrogen production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/catal8040159	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 -
1. 著者名 M. Weidensdorfer, M. Ishikawa, K. Hori, D. Linke, B. Djahanschiri, R. Iruegas, I. Ebersberger, S. Riedel-Christ, G. Enders, L. Leukert, P. Kraiczky, F. Rothweiler, J. Cinatl, J. Berger, K. Hipp, V. A. J. Kempf, and S. Gottig	4. 巻 10
2. 論文標題 The <i>Acinetobacter</i> trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of <i>Acinetobacter baumannii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virulence	6. 最初と最後の頁 68-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21505594.2018.1558693	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 Hori K. Unno H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Integrated Production and Separation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reference Module in Life Science	6. 最初と最後の頁 579-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-809633-8.09091-9	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 Y. Ohara, S. Yoshimoto, K. Hori	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 J. Biosci. Bioeng.	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 K. Noba, M. Ishikawa, A. Uyeda, T. Watanabe, T. Hohsaka, S. Yoshimoto, T. Matsuura, K. Hori	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 J. Am. Chem. Soc.	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 S. Aoki, S. Yoshimoto, M. Ishikawa, D. Linke, A. Lupas, K. Hori	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 2019年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	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

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Y. Ohara, S. Yoshimoto, K. Hori
2. 発表標題 Searching inhibitors against adhesion of the nanofiber protein AtaA and the control of microbial immobilization
3. 学会等名 iBio-N 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Nakatani, K. Hori
2. 発表標題 Distant variable peptide display system on bacterial cell utilizing long bacterionanofiber of a trimeric autotransporter adhesin
3. 学会等名 iBio-N 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Ishikawa, K. Hori
2. 発表標題 Development of an efficient counterselection method for <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 克敏
2. 発表標題 微生物バクテリオナノファイバーによる微生物プロセスの革新
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 克敏
2. 発表標題 水中強接着性細菌タンパク質AtaAの非特異的相互作用の謎に迫る
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Hori
2. 発表標題 Protein engineering of bacterionanofiber protein for the innovative bioprocesses
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Ishii, S. Yoshimoto, K. Hori
2. 発表標題 Quantification of cell adhesion of Acinetobacter sp. Tol 5 via a trimeric autotransporter adhesin using atomic force microscopy
3. 学会等名 FEMS 7th Congress of European Microbiologists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K. Hori
2. 発表標題 AtaA, a new trimeric autotransporter adhesin mediating strong and nonspecific adhesion of bacterial cells
3. 学会等名 第90回日本細菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀 克敏
2. 発表標題 付着性・凝集性細菌の付着・バイオフィルム形成過程と固定化技術の発展, 化学工学会
3. 学会等名 第49回化学工学会度秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Ohara, S.Yoshimoto, K. Hori
2. 発表標題 Inhibition and detachment of AtaA-mediated bacterial adhesion by casein hydrolysates
3. 学会等名 The 25th Young Asian Biological Engineers' Community (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Ishii, S. Yoshimoto, K. 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 Young Asian Biological Engineers' Community (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Kawashiri, S. Yoshimoto, T. Matsushita, K. Iio, M. Takai, K. 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 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Hori
2. 発表標題 A new aspect of the translocator complex of trimeric autotransporter adhesins of gram-negative bacterial, talking with membranes
3. 学会等名 Talking with membranes: biogenesis, communications and diseases (招待講演) (国際学会)
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 正確なドメイン欠損による巨大ファイバータンパク質の再構成
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩崎啓太, 吉本将悟, 堀 克敏
2. 発表標題 発現ホストの違いによる高凝集性タンパク質AtaAの付着凝集特性の相違
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020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9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原純, 鈴木淳巨, 藤本和土, 岡崎 進, 堀 克敏
2. 発表標題 分子動力学計算による高接着性タンパク質AtaA_Nheadの接着過程解析
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
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回バイオ関連化学シンポジウム
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

〔図書〕 計2件

1. 著者名 堀 克敏	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 294
3. 書名 細胞・生体分子の固定化と機能発現	

1. 著者名 堀 克敏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 246
3. 書名 細胞表層工学の進展	

〔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	加藤 竜司 (Kato Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (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
---------	---------