

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01727

研究課題名（和文）ナノファイバータンパク質の分子紡績

研究課題名（英文）Molecular spinning of nanofiber proteins

研究代表者

石川 聖人（Ishikawa, Masahito）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：70750602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：紡績では、短い繊維同士を互いが絡みつくよう一体化させて糸にする。本研究では、細菌性ナノファイバータンパク質AtaAを一体化し糸にする技術基盤の開発、すなわち、AtaAの分子紡績の技術基盤の開発を目的とした。AtaA組換えタンパク質の力学特性解析を実施し、強固なドメインを特定した。AtaA組換えタンパク質の末端に共有結合形成を促進するペプチド配列や、SpyCatcher/SpyTagを導入することでAtaAの多量化を実現した。連結反応を検討し、より大きな構造体を作るための条件を見出した。ファイバー状のタンパク質を精製し、それらを共有結合でつないで大きな構造体にするための基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱炭素社会の実現に向け、再生可能な資源に由来する繊維素材の需要が高まっている。例えばクモ糸は鋼鉄の4倍の強度を持ちながらも柔軟な繊維として期待され、人工クモ糸の研究開発がされている。ただし、人工クモ糸だけで、石油を原料とする化学合成繊維の全てを代替できるわけではない。石油に依存しない未来を見据え、持続可能な繊維の研究開発は継続していく必要がある。本研究では極めて知見の少ないナノファイバータンパク質を連結して繊維素材へと改変するための基礎研究を実施した。本研究の成果はユニークな特性を有するナノファイバータンパク質から、天然のタンパク質性繊維を超える素材を創出するための指針を与えるものと期待する。

研究成果の概要（英文）：In spinning, short fibers are intertwined and integrated into yarn. This study aimed to develop the technological foundation for molecular spinning of the bacterial nanofiber protein AtaA, namely, the development of technology to integrate AtaA into yarn. Mechanical property analysis of the recombinant AtaA identified a robust domain of AtaA. By introducing peptide sequences that promote covalent bond formation or utilizing the SpyCatcher/SpyTag system at the ends of the recombinant AtaA, we achieved the multimerization of AtaA. We examined the coupling reactions and identified conditions to create larger structures. Basic knowledge was obtained for purifying fiber-shaped proteins and connecting them via covalent bonds to form larger structures.

研究分野：合成生物学

キーワード：ナノファイバータンパク質 タンパク質ポリマー タンパク質繊維素材

1. 研究開始当初の背景

脱炭素社会の実現に向け、再生可能な資源に由来する繊維素材の需要が高まっている。研究代表者らはこれまで、独自に発見した細菌性ナノファイバータンパク質 *AtaA* の研究を実施してきた。*AtaA* は約 225 nm の長さで高付着性グラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 の細胞表層に局在し、固体表面への細菌付着を仲介する¹。過去の研究において、*AtaA* と SNAP タグを融合した組換えタンパク質を、ナノファイバーの形状を保ったまま大腸菌細胞質内で生産することに成功した。SNAP タグの基質であるベンジルグアニン基を有する細菌サイズリポソーム (人工細胞) を調製し、これを SNAP 融合 *AtaA* と混合することで毛むくじらの人工細胞を創出した²。この人工細胞は、*AtaA* を生やした天然細胞と同様に様々な固体表面に付着できた。これらのことは、*AtaA* はタンパク質工学で汎用される技術と組み合わせると大腸菌で多量に生産できること、得られるファイバー状の組換えタンパク質は *AtaA* の特性を継承することを示している。加えて、構造解析³ や原子間力顕微鏡 (AFM) 解析により、*AtaA* の接着の秘密は固体表面との相互作用だけでなく、*AtaA* 分子に備わる柔軟性と強靱性にあることが明らかになった。そのため、柔軟性と強靱性を併せ持つファイバー状の *AtaA* 組換えタンパク質を多量に生産し、それらを繋ぎ合わせて糸状にすることができれば、柔軟かつ強靱な繊維素材の開発が期待できる。

2. 研究の目的

紡績では、短い繊維同士を互いが絡みつくよう一体化させて糸にする。本研究の目的は *AtaA* を一体化して糸にする技術基盤の開発、すなわち、*AtaA* の分子紡績の技術基盤を開発することである。研究期間中は以下について検討を実施した。

1. ファイバーの形状を保った *AtaA* 組換えタンパク質の力学特性解析
2. 共有結合形成による *AtaA* 組換えタンパク質の連結方法の検討
3. *AtaA* 組換えタンパク質から糸を作るための条件最適化

3. 研究の方法

研究開始時までには 3 種類のファイバー状の *AtaA* 組換えタンパク質を大腸菌で生産することに成功していた (図 1)。Nhead と Nstalk 部位を含む *AtaA* (NhNs-*AtaA*) は約 180 nm のファイバーを形成し、*AtaA* と同様の接着特性を示す。一方、Chead と Cstalk 部位を含む *AtaA* (ChCs-*AtaA*) は約 40 nm のファイバーを形成する。ChCs-*AtaA* に接着性はないが、全長の *AtaA* ファイバーの柔軟性に寄与することが結晶構造解析から示唆されていた³。研究期間中はこれら組換えタンパク質を基盤として以下の研究を実施した。

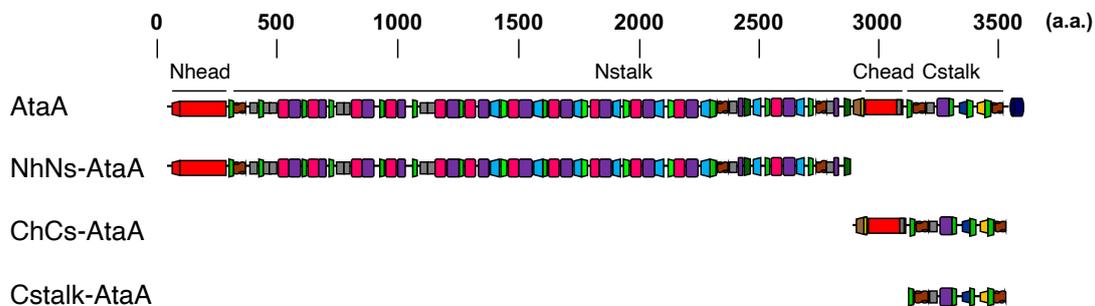


図 1 本研究で用いた代表的な *AtaA* 組換えタンパク質の一次構造の模式図 *AtaA* は 3630 アミノ酸残基から成るホモ三量体タンパク質であり、形と色で区別した複数のドメインが反復する一次構造を有する。ファイバー形成部は Nhead・Nstalk・Chead・Cstalk から構成される。

(3-1) *AtaA* ファイバーの力学特性解析

ファイバーの形状を保った *AtaA* 組換えタンパク質を AFM で引き上げて力学応答を計測した (図 2)。AFM 計測を行うために、各組換えタンパク質の N 末端側にシステイン残基、C 末端側に SpyTag (ST) を導入した。Au-S 結合を利用して N 末端側を金基板表面に固定化した。一方、カンチレバー側にはシステイン残基を付与した SpyCatcher (SC) を Au-S 結合により固定化した。カンチレバーを *AtaA* 組換えタンパク質の固定された金基盤へと近づけ、SC/ST 間にイソペプチド結合を形成させた後、カンチレバーを引き上げることで *AtaA* に含まれるドメインのアンフォールドに必要な力を測定した。



図 2 AFM 測定の概要図

(3-2) 共有結合形成による AtaA の連結

ファイバー状の AtaA 組換えタンパク質同士を連結し一体化させるために、共有結合形成を促進する 2 つのタンパク質工学技術を検討した。

(3-2-1) SpyTag-SpyCatcher システムによる連結

図 3 のように Cstalk-AtaA の N/C 両末端に SC を融合した SC-Cstalk-SC と、muGFP の N/C 両末端に ST を融合した ST-muGFP-ST を設計した。これらを混合すると ST-SC 間にイソペプチド結合が形成され、SC-Cstalk-SC は ST-muGFP-ST をバインダーとして連結する。AtaA はホモ三量体のタンパク質なので、連結点は N/C 両末端に 3 つ存在する。理論的には、3 点全てが 1 つの AtaA 分子と連結すれば構造体は 1 次元的に伸長し、3 つのうち 1 つでも別の AtaA 分子と連結すれば構造体は分岐して 2・3 次元的に伸長する。



図 3 SpyTag-SpyCatcher システムによる Cstalk-AtaA の連結

(3-2-2) ラジカルカップリング反応による連結

研究実施者らは、チロシン残基を含むペプチドダグ・ペプチドループ (Y タグ・Y ループ) 配列の融合したタンパク質を、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 等で連結する独自技術を開発している⁴⁻⁶。このうち Y ループ配列 (IRINRGPYAFVT) を NhNs-AtaA の N/C 両末端付近に導入した組換えタンパク質 YL-NhNs-AtaA を設計した (図 4)。Y ループ配列中のチロシン残基が架橋点となり、3-2-1 の項目と同様に大きなタンパク質構造体となることを期待した。

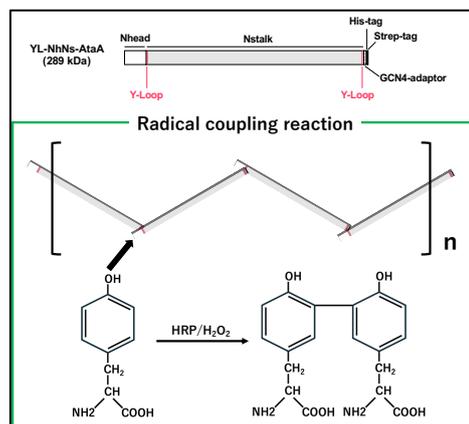


図 4 チロシン残基間のラジカルカップリングによる NhNs-AtaA の連結

(3-3) AtaA の連結反応の最適化

AtaA 組換えタンパク質を連結し巨大な構造体にするために項目 3-2 の連結反応の最適化を検討した。タンパク質濃度・反応温度・反応時間を変えて連結し、得られる構造体の形状を調べながら検討した。検討を通じてナノファイバータンパク質を連結して大きくしていくために考慮すべき基本情報を得ることを目指した。

4. 研究成果

(4-1) AtaA ファイバーの力学特性解析

ChCs-AtaA を AFM により伸展した結果を図 5 に示す。伸長距離が大きくなるにつれ、タンパク質に力がかかり、ドメインのアンフォールドに伴うノコギリ刃状のシグナルが観測された。このフォースカーブの解釈は、まず①では 300pN 前後で壊れる部位が複数あり、②では 600pN 以上で壊れる強靱で大きな部位がある。その後、③では残っていた小さな部位が壊れ、最後に④で Au-S 結合が断裂したと考えられる。最も強い力を示したピーク②について、アンフォールドに必要な力は約 791pN であった。ドメインをさらに分割した組換えタンパク質の AFM 解析により、この強靱な部位は Chead に存在することが明らかとなった。このことから、強靱な繊維を目指すには Chead を含めたナノファイバー設計をすることが重要であると考えられる。

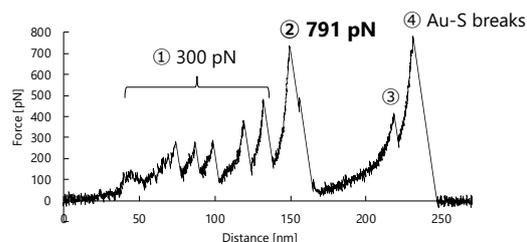


図 5 ChCs-AtaA の AFM 測定結果

(4-2) 共有結合形成による AtaA の連結

SC-Cstalk-SC、ST-muGFP-ST、及び YL-NhNs-AtaA は遺伝子組換え大腸菌にて発現、精製することで目的タンパク質を得ることができた。ただし、いずれの組換えタンパク質も末端に融合した His タグによるアフィニティ精製では効率的に精製できなかった。SC-Stalk-SC はわずかに Ni-NTA レジンに吸着するものの、YL-NhNs-AtaA では全く吸着しなかった。YL-NhNs-AtaA に融合するタグを GST に変更したところ、わずかにグルタチオンセファロースレジンに吸着した。これらのことから、ナノファイバーの形状がアフィニティレジンとの反応効率

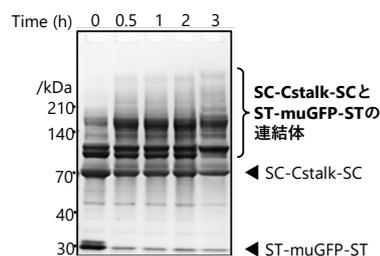


図 6 Cstalk-AtaA の連結

を下げ、特に小さい分子量のタグであると顕著に表れることが示唆される。そこで、アフィニティタグによる精製を諦め、AtaAの耐熱性質と分子の大きさを利用して精製するにした。大腸菌ライセートを加熱することで大腸菌由来タンパク質を沈殿させ、可溶性の画分からゲルろ過クロマトグラフィーにより標的の組換えタンパク質を精製した。

SC-Cstalk-SC と ST-muGFP-ST を 1:3 比で混合した後、SDS-PAGE にて連結反応の進行を 0.5 h, 1 h, 2h, 3h と追跡したところ、両タンパク質の連結を示すバンドが複数確認された (図 6)。一方、YL-NhNs-AtaA においても、HRP と H₂O₂ の存在下ではアクリルアミドゲルの網目構造に入り切らないほど巨大なタンパク質の連結を示すバンドが認められた (図 7)。使用したアクリルアミドゲルでは 1500 kDa のタンパク質までは分析可能であることから、チロシン残基間のラジカルカップリング反応によって、最低でも 5 分子の YL-NhNs-AtaA が連結されたと考えられる。以上、当初に計画していたナノファイバー組換えタンパク質の連結反応を実施し、それぞれの連結体を得ることに成功した。

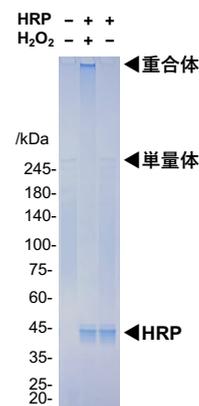


図 7 YL-NhNs-AtaA の連結

(4-3) AtaA の連結反応の最適化

SC-Cstalk-SC と ST-muGFP-ST の連結反応について、各タンパク質のモル比、反応 pH、塩濃度などを検討した。その結果、ある条件においては、アクリルアミドゲルの網目構造に入り切らないほど大きな分子量の構造体を形成した。一方、YL-NhNs-AtaA の連結反応においては、精製タンパク質のロットによっては連結反応が進行しない事象に遭遇し、条件の最適化に時間を要した。精製過程を細かく見直していくと、精製後に実施するタンパク質濃縮方法の違いが連結反応に影響することを発見した。限外ろ過膜スピンカラムによって遠心しながら濃縮すると、YL-NhNs-AtaA は見かけの分子サイズが大きくなるのが動的光散乱解析によって示唆された。ラジカルカップリング反応によって YL-NhNs-AtaA を連結する場合、タンパク質分子同士が極めて近接している必要があることを示唆している。反応時のタンパク質濃度を高めることや、分子クラウディング剤の添加によって連結反応が向上する可能性がある。以上、連結反応によって得られるタンパク質の分子量や形状等を調べながら、「ファイバー形状のタンパク質」という極めて知見の少ないタイプのタンパク質を、集めて連結するための基礎情報が得られた。

引用文献

- [1] Ishikawa M *et al.*, *PLoS One.*, 7, 11, e48830 (2012)
- [2] Noba K. *et al.*, *J Am Chem Soc*, 141, 19058-19066 (2019)
- [3] Koiwai K *et al.*, *J Biol Chem*, 291, 3705-3724 (2016)
- [4] Permana D *et al.*, *ACS Omega*, 5, 5160-5169 (2020)
- [5] Permana D *et al.*, *Biotechnol J*, 14, 1800531 (2019)
- [6] Permana D *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 126, 559-566 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

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

1. 著者名 Ishikawa Masahito, Nakatani Hajime, Hori Katsutoshi	4. 巻 135
2. 論文標題 Growth phase-dependent production of the adhesive nanofiber protein AtaA in Acinetobacter sp. Tol 5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 224 ~ 231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.12.012	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 Ishikawa Masahito, Kojima Takaaki, Hori Katsutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a Biocontained Toluene-Degrading Bacterium for Environmental Protection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e00259-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/Spectrum.00259-21	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀 克敏、石川 聖人
2. 発表標題 「環境にあってはならない物質」に依存させる生物学的封じ込め
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川 聖人
2. 発表標題 バイオインフォマティクスフォトリカ
3. 学会等名 日本生物工学会バイオインフォマティクス相談部会 記念フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2023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	神谷 典穂 (Kamiya Noriho) (50302766)	九州大学・工学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	堀 克敏 (Hori Katsutoshi) (50302956)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	南畑 孝介 (Minamihata Kosuke) (90648586)	九州大学・工学研究院・助教 (17102)	削除：2022年9月28日

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
---------	---------