

令和元年5月30日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14868

研究課題名(和文) 接着ナノファイバー蛋白質のグラム陰性菌外膜における再構成法の確立

研究課題名(英文) Reconstitution of the adhesive nanofiber protein on the outer membrane of Gram-negative bacteria

研究代表者

石川 聖人 (Ishikawa, Masahito)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：70750602

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、Acinetobacter sp. Tol 5の接着ナノファイバー蛋白質AtaAをあらゆるグラム陰性菌に生やす方法論の確立を目指した。AtaA分泌関連因子を明らかにするために、ランダム変異誘発によるAtaAファイバー不毛変異株の取得、AtaAファイバー発毛細菌と不毛細菌の分類とこれらのゲノム比較を実施した。研究期間内では目標としていたAtaA分泌関連蛋白質の特定には至らなかったが、変異株ライブラリーの構築、ゲノム比較による候補遺伝子の絞り込みはできたので、引き続き検討すれば達成できると考える。また、当初は想定していなかった事項がAtaAを生やすのに重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らが発見した「何にでもくっつくことのできる微生物の毛」は工学的利用価値が高い。例えば、我々にとって有用な微生物に“毛”を自在に生やし、任意の場所にひっつけることができれば、微生物を使ったものづくりの効率化が期待できる。本研究は、あらゆる菌に“毛”を生やすための方法論の構築に取り組んだ。研究期間内ではあらゆる菌に対して“毛”を生やすためのルールを見出すことはできなかったが、考慮すべき項目が明らかとなった。また、実験に使用したある種の菌には必ず“毛”を生やすことができるとわかった。この菌種には有用なものも多く含まれているので、より良いものづくりが可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a methodology for displaying AtaA, which is an adhesive nanofiber protein from Acinetobacter sp. Tol 5, on cell surfaces of any Gram-negative bacteria. To identify proteins involved in the secretion of AtaA, random mutagenesis for screening non-AtaA-displaying mutants, the classification of AtaA-displaying bacteria and non-AtaA-displaying bacteria, and the comparative genome analysis of these bacteria were performed. Although the target proteins were not identified during the research period, I think it is possible to get them nearly future because the construction of mutant library and the selection of candidate genes by the genome comparative analysis have been completed. Also, this study turned out matters important for the AtaA-display on bacterial cell surfaces, which were not initially assumed.

研究分野：バイオ機能応用・バイオプロセス工学

キーワード：ナノファイバー 接着蛋白質 固定化微生物 外膜蛋白質 Acinetobacter

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非病原性のグラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 は様々な材質の固体表面に対して極めて高い付着性を示す。研究代表者らは、この付着特性が細胞表層に存在する接着性ナノファイバー蛋白質 AtaA に由来することを突き止めた(図 1ab)。あらゆる材質の表面に対して高い接着性を示す AtaA は工学的利用価値が高い。*ataA* 遺伝子を、元来付着性を持たない細菌に導入して AtaA ファイバーを細胞表層に生やし、高付着性を付与させて担体へとくっつけるという新しい概念の微生物固定化方法を、研究代表者らは以前に開発した。この手法はバイオプロセスで実用されているゲル包括法と比べ、以下の点で優れている。

- (1) 物質移動律速がない。
- (2) 物理的に強く、菌体の漏出がない。
- (3) 担体の材質や形状に依らない。
- (4) 固定化操作が簡便。

AtaA を介した微生物固定化法は従来法に代替し得る手法であるが、現状、限られた微生物しか AtaA を効率的に生やすことはできない。研究代表者は AtaA の分泌を補助する蛋白質として TpgA を発見したことを機に、AtaA ファイバーを効率的に生やすことができない菌は「AtaA を細胞表層まで導く分泌補助蛋白質がない」と考えるに至った(図 2)。TpgA は AtaA と外膜で複合体を形成する。TpgA を欠損する Tol 5 は AtaA ファイバーの提示量が減少する(図 1c)。それゆえ、適切な分泌補助蛋白質がないことが原因となって、いくつかの菌では AtaA の分泌がうまくいかないものと考えられる(図 2 右)。なお、*ataA* と *tpgA* 遺伝子を同時に導入するだけでは、AtaA ファイバーの形成はわずかにしか改善されなかった。これは TpgA 以外の分泌補助蛋白質が存在することを示唆している。AtaA の分泌補助蛋白質を同定し、それらを適切に補うことができれば、あらゆるグラム陰性菌にも AtaA ファイバーを生やす方法論を確立できると本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、AtaA の分泌関与蛋白質をすべて明らかにし、あらゆるグラム陰性菌にも AtaA ファイバーを生やす方法論の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

次のように研究を進めた。

#### トランスポゾン挿入による AtaA ファイバー不毛変異株の取得

Tol 5 株と同族細菌である ADP1 株は *ataA* 遺伝子の単独導入だけで、AtaA ファイバーを生やし、高付着性質を獲得する。ゆえに、AtaA の分泌に必要な蛋白質をすべて有していると考えられる。そこで、ランダムトランスポゾン挿入により ADP1 株の変異株ライブラリーを構築し、その中から *ataA* 遺伝子を導入しても AtaA ファイバーを生やすことのできない変異株の取得を試みた。変異株ライブラリーの構築には pBSL118 (Alexeyev *et al.*, Can J Microbiol, 1995) プラスミドを利用した。*ataA* 遺伝子を潜在保有する Tol 5 株ではなく ADP1 株を使う理由は、*ataA* 遺伝子自体が変異した株が主に選択されることを避けるための工夫である。

#### AtaA ファイバー発毛細菌と不毛細菌の分類

AtaA ファイバーを発毛できる菌とできない菌の共通点、相違点を見出すことで AtaA の分泌関与蛋白質をあぶり出すことができると考えた。AtaA 分泌に関わる TpgA のホモログを有している細菌は他の AtaA 分泌関与遺伝子も備えているであろうという仮説のもと、TpgA ホモログの存在がゲノム情報から確認されるガンマプロテオバクテリアを数種類選定した。これらに *ataA* 遺伝子を導入し、AtaA ファイバーの形成や、付着性の向上などを調べた。加えて、同族である *Acinetobacter* においては、TpgA ホモログをもたない株に対しても検討を行った。

#### ゲノム比較による AtaA 分泌関与遺伝子の絞り込み

AtaA ファイバー発毛細菌と不毛細菌の間でゲノム比較を行い、発毛細菌には共通するが、不毛細菌だけが持ち合わせていない遺伝子、もしくは配列類似性の低い遺伝子を抽出した。さらにその中から、シグナルペプチドや配列相同性をもとに、ペリプラズム蛋白質と外膜蛋白質

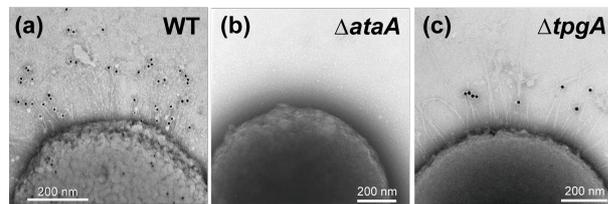


図 1. *Acinetobacter* sp. Tol 5 の細胞表層に生える AtaA ファイバーの免疫電子顕微鏡観察。

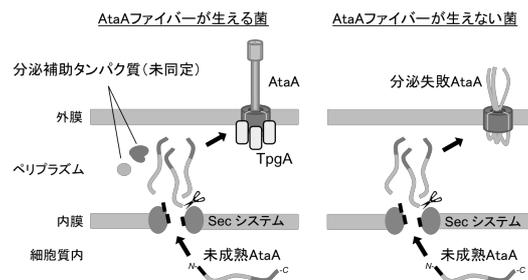


図 2. 想定される AtaA ファイバーが生える菌(左)と、うまく生えない菌の違い(右)。

をピックアップし、候補遺伝子とした。そして候補遺伝子を Tol 5 株においてノックアウトすることを試みた。

#### 4. 研究成果

トランスポゾン挿入による AtaA ファイバー不毛変異株の取得

トランスポゾンの挿入された ADP1 の変異株ライブラリーを構築した。ataA 遺伝子を異種発現する変異株ライブラリーのなかから、他の形質転換体と比べて付着性の低下した変異株を取得した。この変異株からプラスミドを抽出して解析したところ、驚いたことに、ataA 遺伝子が元の長さよりも短くなっていった(図3)。ataA 遺伝子には配列類似性 99%以上の反復配列が複数存在している。それゆえ、相同組換えの作用を受けたことが原因であると考えられた。大腸菌、ADP1、Tol 5 それぞれに同一のプラスミドを導入し、ataA 遺伝子の相同組換え頻度に違いがあるかを調べた。すると、Tol 5 は相同組換えがほとんど起こらないのに対し、大腸菌、ADP1 では Tol 5 よりも相同組換えが比較的起こりやすいことがわかった。この結果は、異種細菌において AtaA ファイバーを形成させるには、細胞表層への分泌を補助するだけでなく、ataA 遺伝子を相同組換えから保護する必要があることを意味する。そして、Tol 5 には ataA 遺伝子を相同組換えから保護する機構が備わっている可能性を示唆している。

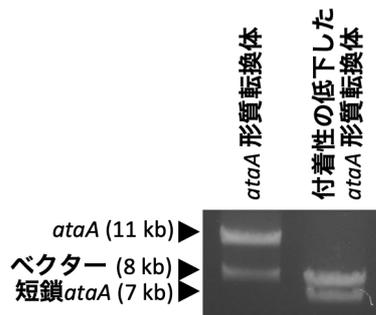


図 3. 相同組換えによる ataA 遺伝子の短縮 ADP1 に導入したプラスミドをベクターと ataA が分離されるよう制限酵素で切断した。付着性の低下した形質転換体では、ataA の部分が短くなる変異(相同組換え)が生じていた。

相同組換えの観点から、ADP1 の変異株ライブラリーから AtaA 不毛変異株を取得することは非効率と考え、Tol 5 のランダム変異株ライブラリーを作成し、そこから分離することに方針を変更した。ところが、ADP1 でうまくいっていた pBSL118 を利用したトランスポゾン変異誘発が、Tol 5 ではほとんど機能しなかった。代表者は、トランスポゾンが Tol 5 に内在する制限酵素によって切断されているのではないかと考え、2 つの制限酵素遺伝子を Tol 5 のゲノムからノックアウトした。制限酵素の欠損株は野生株の 1,000 倍以上形質転換効率が上がる結果が得られ、Tol 5 株の元来有する制限修飾系がトランスポゾン挿入を妨げていることが示された。制限酵素の作用を抑えるために、トランスポゾンを予めメチル化修飾することで変異導入効率を向上させ、最終的にはライブラリーを構築することができた。このライブラリーのなかから、AtaA 分泌に関与する遺伝子、及び Tol 5 株の有する ataA 遺伝子の相同組換え抑制機構に関わる遺伝子を探索する予定にしている。

#### AtaA ファイバー発毛細菌と不毛細菌の分類

TpgA ホモログを持っている菌として *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas denitrificans*, *Serratia ficaria* に ataA 遺伝子を導入し、AtaA ファイバーの表層提示、付着性・凝集性等を評価した。*E. aerogenes* は Tol 5 に及ばないまでも付着性は発揮したが、その他の菌はほとんど AtaA を細胞表層に提示させず、付着性・凝集性に変化はなかった。また、TpgA ホモログを有する *Acinetobacter* 族細菌として *A. bouvetii*, *A. larvae*, *A. soli*, *A. oleivorans*, TpgA のホモログを持たない菌として *A. kookii*, *A. puyangensis*, *A. radioresistens* を選択し、これらすべてに ataA 遺伝子を導入・評価を行った。その結果、驚いたことに、TpgA ホモログの有無に関わらず、すべての *Acinetobacter* 形質転換体は Tol 5 と同等の付着・凝集性を発揮することが示された。これらの結果から「TpgA のホモログを有している細菌は他の AtaA 分泌関与遺伝子も備えているであろう」という仮説は崩れてしまったが、*Acinetobacter* 属細菌であれば AtaA ファイバーを提示でき、付着・凝集性を向上させることができることがわかった。*Acinetobacter* 族細菌の共通点と AtaA ファイバー不毛細菌の相違点を明らかにすることで、AtaA ファイバーの分泌・形成に不可欠な因子を特定できる可能性が示唆された。

#### ゲノム比較による AtaA 分泌関与遺伝子の絞り込み

上記の実験結果を受けて、全ゲノム情報(ドラフトシーケンスのものは除く)が公開されている *Acinetobacter* 属細菌を 60 種類ピックアップし、ゲノム比較解析によってこれらの共通遺伝子を見出すことにした。すると、792 種類の遺伝子が共通であることが明らかとなった。さらにそこから AtaA ファイバー不毛細菌が持っている遺伝子を差し引くと、79 遺伝子に絞り込まれた。この 79 遺伝子の内訳は、細胞内蛋白質 24 個、内膜蛋白質 20 個、外膜蛋白質 3 個、局在不明 32 個であり、ペリプラズム蛋白質は 1 つもなかった。代表者は、ここにある条件を加え、最終的に 2 つの遺伝子まで絞り込んだ。これら遺伝子欠損株の取得を現在試みている。

#### 結果の総括

研究期間内では目標としていた AtaA 分泌関与蛋白質の特定には至らなかった。しかし、変異株ライブラリーの調製も完了し、ゲノム比較による候補遺伝子の絞り込みまでできているので、引き続き検討を行えば比較的早くに特定できると想定している。本研究を通じて初めて明らかとなったのは、*ataA* 遺伝子の相同組換え頻度が異種発現の場合と、宿主発現の場合で大きく異なることである。これはあらゆる菌の細胞表層に AtaA ファイバーを生やすのに重要な情報であるだけでなく、Tol 5 が *ataA* 遺伝子の相同組換えを抑制しているという実験事実は生物学的に興味深い。これは Tol 5 が独自の特殊な制限修飾系を有していることとあわせて、今後研究を続けていく予定である。加えて、今回使用したすべての *Acinetobacter* 属細菌は AtaA ファイバーを生やすことができ、Tol 5 と同程度の付着・凝集性を発揮できたことは意義深い。すべての *Acinetobacter* 族細菌は AtaA ファイバーを発毛できるのかもしれない。*Acinetobacter* は増殖が早く、多様な炭化水素を変換できることから産業での利用価値の高い菌が多く存在する。本研究で得られた成果は、*Acinetobacter* 族細菌を実用する物質変換プロセスにとって朗報である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Marko Weidensdorfer, Masahito Ishikawa, Katsutoshi Hori, Dirk Linke, Bardya Djahanschiri, Ruben Iruegas, Ingo Ebersberger, Sara Riedel-Christ, Giulia Enders, Laura Leukert, Peter Kraiczky, Florian Rothweiler, Jindrich Cinatl, Jürgen Berger, Katharina Hipp, Volkhard AJ Kempf, Stephan Göttig; The *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of *Acinetobacter baumannii*, *Virulence*, 10, 68-8 (2019) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 石川聖人, 堀 克敏; 接着ナノファイバー蛋白質 AtaA の利用と分泌機構の理解; 化学工学会 第 50 回秋季大会, 鹿児島, 2018 年
2. 青木壮太, 吉本将悟, 石川聖人, 堀 克敏; 微生物触媒の固定化を目指したナノファイバー蛋白質 AtaA の小型化; 第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年
3. 唐鎌智也, 石川聖人, 吉本将悟, 堀 克敏; ホモ三量体ファイバータンパク質 AtaA の菌体外分泌生産の検討; 第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。