

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21651056

研究課題名（和文）フジツボ幼生接着剤をまねた水中で働く瞬間接着剤の開発をめざして

研究課題名（英文） Toward the development of biomimetic under-water adhesives inspired by barnacle larval cement

研究代表者

岡野 桂樹 (Okano Keiju)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40147070

研究成果の概要（和文）：

海洋付着生物フジツボのキプリス幼生がつくる幼生接着剤の原理を明らかにして、その原理を応用し、水中ですばやく働く接着剤を開発するための糸口を切り開くため、本研究を行った。その結果、1) 原子間力顕微鏡を使い、水中接着剤の力学的性質をマクロで明らかにするアッセイ系を構築し、2) クレイナノシートとタンパク質の相互作用を微量で調べるアッセイ系を構築し、3) 2 種類の幼生セメントタンパク質の組換えタンパク質を大量につくり、4) その内の 1 種 57k が海洋細菌に強い抗菌活性を持つことを発見し、5) アカフジツボ幼生セメント中に親セメント cp-100k とホモロジーを持つ成分が存在する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Toward the development of biomimetic under-water adhesives inspired by larval cement of the barnacle, *Megabalanus rosa*, we have obtained the following results.

1) We have developed a method to measure macroscopic forces for marine adhesives using an atomic force microscope. 2) We have developed a microassay to measure the interaction between proteins and clay nanosheets in mock-marine environments using Roche glass capillaries. 3) We have prepared two recombinant cement proteins; rec-Ccg-57k and rec-Ccg-ASP, both of which, however, did not show positive effects on 1) and 2). 4) We found the strong antimicrobial activity of rec-Ccg-57k against marine GRAM-negative bacteria, *Planococcus citreus*. 5) In the course of searching unidentified cement components using next generation sequencing, we have found a gene homologous to *M. rosa* adult cement protein gene *mrcp-100k*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|----------|------------|
| 2009年度 | 1,800,000円 | 0円 | 1,800,000円 |
| 2010年度 | 700,000円 | 0円 | 700,000円 |
| 2011年度 | 600,000円 | 180,000円 | 780,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000円 | 180,000円 | 3,280,000円 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：フジツボ、幼生、水中接着剤、タンパク質、ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

(1) フジツボは浮遊生活を営む幼生期と固着生活を営む成体期の2つの異なる生活スタイルを持つ。浮遊生活の最後のステージであるキプリス幼生は、基盤へ接着し、成体に脱皮・変態する役割に特化している。我々は発電所などへの被害の大きい大型のフジツボであるアカフジツボ (*Megabalanus rosa*) を対象にして、キプリス幼生が基盤に付着する際に使う接着剤 (幼生セメント: 慣習的にセメントと称する) の研究を行っている。

(2) フジツボの場合、キプリス幼生が放出する幼生セメントとともに、成体が分泌するセメントが存在する (紙野圭 化学と生物 2004 など)。幼生セメント、成体セメントとも複雑なタンパク質群からなるが、両者に共通な成分は今のところ発見されておらず、両者とも大部分は既知の配列と相同性をほとんど持たないフジツボだけに見られる新規タンパク質群からなっている。

(3) 成体の接着は面接着であり、フジツボ基底全体スペースを埋め、フジツボの強固な固着を遂行する。したがって、フジツボ接着の強度は成体の接着剤に迫るところが大きいと考えられている。それに対し、幼生セメントは波の影響下で、第一触覚先端の極めて小さな接着面で結合する、いわば点接着であり、接触面あたりの接着力、迅速さは群を抜いている。

(4) キプリス幼生のセメントは数十マイクロしかない付着器官の先端で放出され、汚れた基盤と接着することから、その成分を直接化学的に分析することは困難であると諦められてきた。そこで、我々はセメント分泌細胞に着目し、そこに特異的に発現する遺伝子とタンパク質をスクリーニングすることで、幼生セメントの実体を明らかにしてきた。

(5) 国外では、Lee らによりヤモリの接着機構を元にナノレベルで成型されたポリマーを作製し、これにイガイの接着タンパク質からアイデアを得たポリマーをコートすることで、さまざまな環境下で機能する可逆的なハイブリッド接着剤が考案されていた (Nature, 2007)。

(6) 我々は、Lee らの研究に刺激され、フジツボ幼生接着剤の原理を解明し、新たな接着原理に基づく水中環境で機能する接着剤開発のための手掛かりを得たいと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、海水環境下できわめて迅速に接着硬化するフジツボキプリス幼生の接着剤のしくみをまねて、水中で働く瞬間接着剤を考案する手がかりを得ることである。

具体的には、(1) 接着力を定量的に測定するために、原子間力顕微鏡 (AFM) を中心にした力学的測定法を開発する。(2) 基盤との相互作用を簡便に調べる実験系を開発する。(3) アカフジツボ幼生セメント候補タンパク質の全長、および部分配列を持つ組換えタンパク質を大量に得る。これらを組み合わせ、組換えタンパク質同士、基盤と組換えタンパク質、および組換えタンパク質間の酵素的な架橋が硬化または接着にどのような影響を示すかを解明する。

副次的には、(4) タンパク質でできた幼生セメントが、微生物に充ち溢れた海洋環境下で分解されずに機能できる理由を明らかにするため、組換えタンパク質群が海洋細菌に対し、抗菌機能があるか否かを調べる系を開発し、幼生セメント候補が抗菌活性を持つか否かを明らかにする。および(5) 幼生セメントの主成分のひとつでありながら唯一配列・構造が明らかでない高分子量タンパク質 Ccg-110k の配列を明らかにする。110k がセメント全体の力学的な性質を左右する可能性が否定できないからである。

3. 研究の方法

(1) AFM による接着力の測定法の開発: 力測定には、秋田県立大学共通機器として配備されている AFM ナノスコープ IIIa (日本ビーコ社製) のピコフォースモードを使用した。

(2) 基盤との相互作用を簡便に調べる実験系の検討: 岩石を模倣する意味で、相田グループの方法 (Nature, 2010) を参考に、Laponite XLG および他のクレイナノシートとセメント成分との相互作用を極微量のサンプルで調べるシステムを構築した。そのため、ロッシュ社の定量 PCR 用の glass capillaries を用いた。

(3) 組換えタンパク質の作製: 大腸菌と *Brevibacillus* 発現系を用いた。大腸菌発現系では主に pET32, pET41 ベクター (Takara, Novagen) を用い、NdeI-XhoI 部位、または NcoI-XhoI 部位に導入した。発現用大腸菌には、Rosetta-gami B(DE3)、と BL21(DE3)、を使用した。

(4) 抗菌活性の測定: 組換えタンパク質群が海洋細菌に対し、抗菌機能があるか否かを調べるため、Radial diffusion assay 法 (Lehrer et al., J. Immun. Methods, 1991) を用いた。

アッセイには *Planococcus citreus* Migula 1894 (JCM 2533)、*Psychrobacter fulvigenes* Romanenko et al., 2009 (JCM 15525)、*Vibrio neonates* Sawabe et al., 2009 (JCM 21520)の海洋細菌を用いた。

(5) 次世代シーケンスによる未同定の幼生セメント成分の探索：フジツボキブリス幼生の *de novo* transcriptome 解析はロッシュ 454 FLX でキブリス幼生のセメント腺-脳-付着器官複合体の *de novo* transcriptome 解析はロッシュ Junior で行った。

4. 研究成果

(1) AFM による接着力の測定法の開発：北陸先端大学院大学の谷口と川上の助けを借り、市販のムラサキガイの接着タンパク質 (Cell-Tak) を陽性対照、BSA を陰性対照として、液中環境下で実験系の開発を行った。

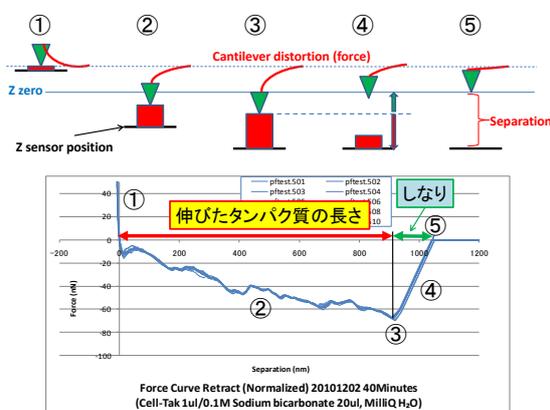


図 1：AFM による接着力の測定

図 1 はムラサキガイの接着タンパク質を 0.1N NaHCO₃ で塩基性にして接着力を持たせたのち、40 分後に 10 回 push-pull を繰り返した際に得られた force-separation plot を示している。①からプローブを引いていくと、分子の塊としてのマクロな柔らかさを反映し、複雑なカーブを描きながら、最大 910nm (n=10) まで伸びてそこで切れた。その時の力は 68nN (n=10) であり、プローブのしなりは 137nm であった。トレースを見てわかるとおり、各時間での再現性は極めて良い。したがって、この方法は接着タンパク質が架橋や塩などの効果により、徐々に力学的特性が変化する場合、きわめて有効な手段となることを示している。

以上の結果から、水性環境下で伸びに対して発生する大きな力を検出する手法を確立することができた。ただし、プローブにつくタンパク量がコントロールできないため、スクリーニングには適していない。

(2) 基盤との相互作用を簡便に調べる実験系の検討：現在 4 種ある幼生セメント候補中の 3 種 (Ccg-57K, Ccg-BSP, Ccg-ASP) では、リジン残基が多く存在する。したがって、粘土、またはクレイナノシートのオキシアニオンとの相互作用を想定し、相田らの方法を元に、ロッシュ社の定量 PCR 用のガラスセルを用いて、微量でオキシアニオンとの相互作用を検討するシステムを構築した。

(3) 組換えタンパク質の作製：

大腸菌発現系と *Brevibacillus* 発現系を用いて、セメント候補タンパク質 4 種と硬化酵素候補である 2 種類のリシルオキシダーゼ様タンパク質 (LOX, LOX-RP) の組換えタンパク質の作製を試みたが、Ccg-57K と Ccg-ASP を除き、可溶性組換えタンパク質ができないか、可溶性・タグ切断の過程でうまくいかず成功にはいたらなかった。LOX, LOX-RP は一部の部分配列で可溶性タンパク質をえることができたが、Amplex red 法で調べたところ、どの構築でもアミノキシダーゼ活性を持つ組換えタンパク質は作製できなかった。そのため、Ccg-57K と Ccg-ASP を用いて、1) と 2) の活性測定を行ったが、現在のところ、顕著な接着・相互作用を見出すことには成功していない。

(4) 抗菌活性の測定：

組換えタンパク質が得られた 2 種のセメント成分 Ccg-57K と Ccg-ASP について、1) と 2) では見検出できない機能を見出すことを求めて、抗菌活性の有無を調べた。その結果、Ccg-57K が海洋細菌である *Planococcus citreus* に対して予想外の強い抗菌活性を有することを見出した (図 2)。

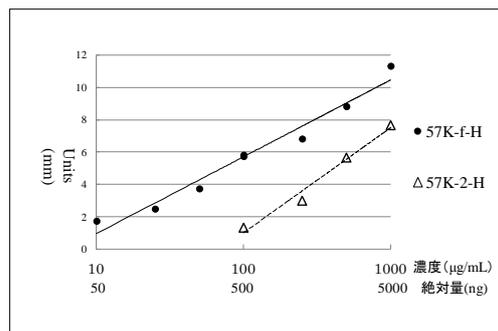


図 2：57k の抗菌作用

(5) 次世代シーケンスによる未同定の幼生セメント成分の探索：

組換えタンパク質の作製がもっとも大きな問題ではあるが、もうひとつの可能性は SDS-PAGE で 57k, 36k と並んでセメントタンパク質の主成分のひとつと考えられる 110k が接着で決定的な機能を果たす疑いである。そこで、110k タンパク質をコードする遺伝子

を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて、網羅的な *de novo* transcriptome 解析を行った。その結果、*M. rosa* の成体の主要セメントタンパク質をコードする遺伝子 *mrcp-100k* と比較的相同性の高い遺伝子 (幼生 cp-100k homolog) の存在が明らかとなった (図 3)。

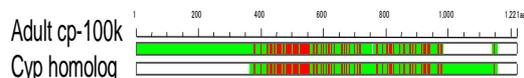


図 3 : 成体 100k の幼生ホモログと cp-100k のアミノ酸レベルの比較 (赤が相同性を持つ部分)

結論 :

本研究は残念ながら、当初の予定どおりには全く進行しなかった。主な要因は組換えセメントタンパク質、および組換え硬化酵素の作製が困難を極めたためである。逆に考えれば、これほど可溶化されにくく、扱いにくいこと自体が、むしろ水中での特殊な機能を暗示させる。新たなアイデアが必要であると思う。しかし、悪戦苦闘する過程で、3 種類の新たなアッセイ法を開発することができ、また幼生セメント機能を考える上で欠けていた遺伝子の配列を得ることができた。総合的に見て、付着行動や無機イオンとの相互作用などを含め、これまでのとらわれた考えや知見だけに頼らず、萌芽研究として新たな一歩を踏み出す大きな下地が得られたことに感謝したい。

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 2 件)

- 1) J. Hoeg, D. Maruzzo, K. Okano, H. Glenner and B. Chan (2012)
Metamorphosis in balanomorphan, pedunculated and parasitic barnacles: A video based analysis. *Integrative and Comparative Biology* 査読あり (in Press, pp1-11, article ID: ICB-ics053, doi:10.1093/icb/ics053)
- 2) M. Kudo, K. Saruwatari, N. Ozaki, K. Okano, H. Nagasawa and T. Kogure (2009) Microtexture of larval shell of oyster, *Crassostrea nippona*: A FIB-TEM study. *Journal of Structural Biology* 査読あり 169: 1-5

[学会発表] (計 3 件)

招待講演

- 1) 岡野桂樹 「フジツボキプリス幼生が分泌する海洋環境で働く接着剤」、第 6 回 LSW シンポジウムソフト&ウェットマターのデザイン・新素材から生物まで (2011 年 1 月 7 日、北海道大学)
- 2) 岡野桂樹 「フジツボ幼生付着の物質的基盤」、2010 年度 日本農芸化学会大会 日本水産学会—農芸化学会合同シンポジウム、水産動物における生理現象とその物質的基盤 (2010 年 3 月 30 日、東京大学)

- 3) 岡野桂樹 「フジツボキプリス幼生の付着: 行動から分子まで」、シンポジウム「動物発生とケミカルバイオロジー」 (2010 年 3 月 14 日、慶応義塾大学)

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/cellbiol/OKANOKEIJU/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 桂樹 (Okano Keiju)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号 : 40147070

(2) 研究分担者

尾崎 紀昭 (Ozaki Noriaki)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号 : 50468120