

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630426

研究課題名（和文）リポソームから毛を生やす

研究課題名（英文）Grow hair from liposomes

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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、Acinetobacter sp. Tol 5細胞上の接着性ナノファイバータンパク質AtaAをリポソーム内部で合成し、表面に生やすことである。我々は、AtaAの基本構造を損なわずに正しくフォールディングされる縮小版ataAの遺伝子を作成し、無細胞タンパク質合成系でのポリペプチド鎖の合成を確認した。次に、縮小ataA遺伝子を細胞サイズのジャイアント・シングルラメラ・リポソーム内部で発現させ、縮小版AtaAタンパク質の合成とリポソーム表面提示を試みた。フローサイトメトリ - により、抗体蛍光標識した縮小版AtaAが極微量提示されている可能性が示されたが、確実と言えるレベルではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質二重膜で構成されるリポソームは、人工細胞のプラットフォームとして、あるいはドラッグデリバリーシステムの材料として有用である。しかし、実際の細胞は単なる脂質二重膜ではなく、様々なタンパク質が結合しており、これが物質輸送、接着、他の細胞との相互作用、情報伝達などの機能を細胞に与えている。したがって、タンパク質をリポソームに生やすことは、より細胞に近い人工粒子を創出することになり、細胞膜および膜タンパク質の機能解析などの基礎研究から、新奇機能性粒子材料の創出につながる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to synthesize the adhesive nanofiber protein AtaA on Acinetobacter sp. Tol 5 cells inside the liposome and grow it on the surface. We constructed a gene of shortened ataA which folds correctly without compromising the basic structure of AtaA and confirmed the synthesis of polypeptide chain in a cell-free protein synthesis system. Next, the reduced ataA gene was expressed inside the cell-sized giant single lamellar liposome, and synthesis of the shortened AtaA protein and presentation of liposome surface layer were attempted. Flow cytometry showed the possibility that a trace amount of the shortened AtaA fluorescently labeled by the antibody was displayed on the liposome surface, but it was not a level that could be said to be definitely presented.

研究分野：生物工学

キーワード：リポソーム ナノファイバー 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、独自に分離したグラム陰性細菌 *Acinetobacter* 属 Tol 5 株 (Hori et al. *J. Chem. Eng. JPN.* 2001 化学工学会論文賞) の細胞表面が接着性ナノファイバーで覆われていること (Ishii, Hori et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004 Highlighted)、さらにこのファイバーが三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) に属する新規蛋白質であることを発見した (Ishikawa, Hori et al. *PLoS ONE.* 2012) (図 1)。ホモ三量体構造をとる AtaA は、ATP 非依存的に分泌される。自身のカルボキシル(C)末端が外膜中にβバレル構造を形成し、バレルの孔を通してパッセンジャードメインと言われるアミノ(N)末端側が細胞外に分泌される。最終的に N 末側の頭部を先端とするナノファイバーが細胞表面に形成される。AtaA ファイバーは様々な材料表面に対し強固に接着する。代表者は異種微生物に *ataA* 遺伝子を導入発現させ、微生物を固定化する新技術を開発した (Ishikawa, Hori et al. *Biotechnol. Bioeng.* 2013 Spotlighted; 特許第 5261775

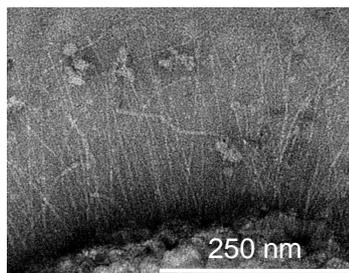
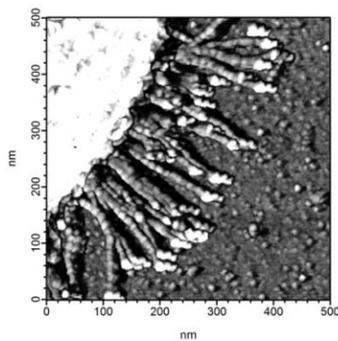


図 1. Tol 5 細胞から生える AtaA ナノファイバー。

上) AFM 像、下) TEM 像。

号)

## 2. 研究の目的

本研究では、AtaA をリボソーム内で合成し、自己分泌蛋白質のセルフアッセンブリー機構により、微生物細胞表面ではなくリボソーム表面に、AtaA またはその一部を生産することを目的とした。

## 3. 研究の方法

次の手順で研究を進めた。

### 1) 縮小版 AtaA の設計と構築

3630 アミノ酸からなるポリペプチドのホモ

三量体である全長の AtaA ファイバーをリボソーム上に生やすことは、分泌やフォールディングの困難さを考慮すると、ほぼ不可能であると考えられた。そこで、リボソームの表面提示に適した縮小版 AtaA を設計、構築することとした。

### 2) 無細胞タンパク質合成系による AtaA の合成

無細胞タンパク質合成系で、AtaA 全長および縮小版 AtaA の合成を行った。無細胞タンパク質合成系には細胞抽出液ではなく、構成成分が全て明らかとなっているピュアシステム (ピュアフレックス: ジーンフロントリア) を使用した (図 2)。

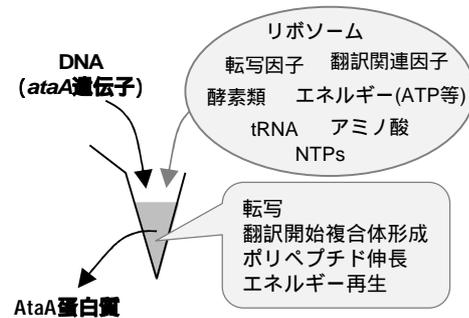


図 2. ピュアシステムによる AtaA 蛋白質の無細胞合成。

### 3) リボソーム内での縮小版 *ataA* 遺伝子の発現によるリボソーム表面提示

研究分担者の独自手法である遠心沈降法 (図 3) により細胞サイズのジャイアント・シングルラメラ・リボソームを作成しながら、内包液としてピュアシステムと縮小版 *ataA* 遺伝子をリボソーム内に閉じ込めた。

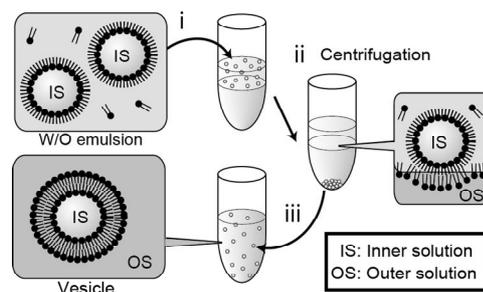


図 3. 遠心沈降法による GUV の作成法。内包液(IS)を含んだ W/O エマルジョンを外液(OS)に積層した後に遠心する。リボソーム表面提示に適した細胞サイズで長寿命の GUV が効率的に調製できる。

### 4) リボソーム外で調製した AtaA によるリボソームの粒子外から修飾

研究代表者は、リボソーム表面を AtaA ファイバーで修飾する別の方法として、短縮 AtaA に SNAP タグの融合タンパク質を大腸菌に作らせ、SNAP タンパク質と結合するベンジルグ

アニン基を融合した脂質を埋め込んだリポソームと反応させる方法を考案した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 縮小版 AtaA の設計と構築

ホモ三量体 AtaA ナノファイバーは、ファイバー先端の N 末端から順に、N ヘッド、N ストック、C ヘッド、C ストックと並び、C 末端がファイバー根元の外膜結合アンカー (TM) を構成する (図 4)。さらに三量体形成前の未成熟ポリペプチドは、N 末先端にグラム陰性細菌の内膜通過のためのシグナルペプチドを有しているが、これはタンパク質の分泌までに切断除去される。リポソーム内で生産するには、このシグナルペプチドは不要で邪魔なので除去し、その代わりに精製と検出を容易にするために His タグを付加した。縮小版 AtaA の作成に当たっては、AtaA の高次構造を壊さないように精密設計を行った。成熟ポリペプチドモノマー単位で 354.4kDa の AtaA 全長に対し、縮小版 AtaA は 139.6kDa である。これが、細菌細胞表層上には三量体ファイバーとして提示されることを、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメトリー、さらには電子顕微鏡で確認した。なお、細胞表層提示の

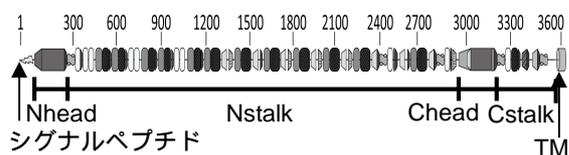


図 4. AtaA の一次構造模式図。数珠状に並び反復ドメインをコイルドコイルがつなぐ。場合は、シグナルペプチドは除去していない。

##### 2) 無細胞タンパク質合成系による AtaA の合成

全長 AtaA および縮小版 AtaA の遺伝子を、ピュアシステムを使った無細胞タンパク質合成に供した。通常、TAA はグラム陰性細菌の外膜上で三量体を形成するので、脂質のないピュアシステム内では、三量体形成は期待できない。リポソーム系にもっていったときに三量体ファイバーが形成されればよいので、ピュアシステム内ではポリペプチド鎖が合成できればよいと考えた。

AtaA の全長ポリペプチド鎖は、モノマーでも 354kDa と巨大である。ピュアシステムにおいて、これだけ巨大なポリペプチドの合成例は、我々の知る限りでは報告がない。そこで、まずは縮小版の合成から始めた。合成物を電気泳動で解析した結果、モノマーだけでなく三量体と思われるシグナルまで検出された (図 5)。これは、上述のとおり、当初は全く期待していないことであった。

細胞内では三量体形成の場である脂質がない系で、また通常は不可欠なシャペロンも存在しない系で、三量体が形成され得ることが明らかとなった。

##### 3) リポソーム内での縮小版 ataA 遺伝子の発現によるリポソーム表層提示

次にリポソーム表層提示するにあたっても、縮小版で成功しなければより大きなタン

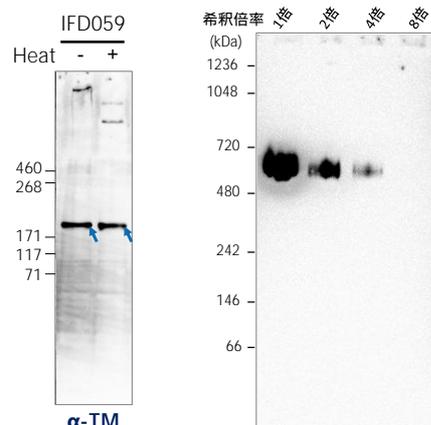


図 5. ピュアシステムによる縮小版 AtaA の合成結果。(左) SDS-PAGE によるモノマーの検出。矢印が縮小版モノマー。(右) ネイティブ PAGE によるオリゴマーの検出。両方とも電気泳動後、TM 抗体で検出 (ウェスタンブロットティング)

パク質ではうまくいくはずはないと考え、縮小版のリポソーム内合成に挑戦した。共同研究者の松浦が日常的に成功している EmrE をポジティブコントロールにして実験を行った。リポソーム内封液に蛍光色素 Alexa647 を混合し、リポソームの形成と大きさ、形状を評価した。リポソームの表層に提示された目的タンパク質については、Alexa488 の蛍光により検出した。縮小版の検出のためには、抗 N ヘッド抗体を一次抗体に、Alexa488 結合ウサギ IgG 抗体を二次抗体に用いた。EmrE のリポソーム表層提示は確認されたが、AtaA 縮小版については、リポソームの表層にごく微量に提示された可能性を示す実験結果は得られたが、確実に提示されたと断定できるレベルではなかった。リポソームの形状を観察したところ、破壊されたものが多く、膜タンパク質である縮小版の挿入によりリポソームの膜が乱れ、破裂したものと考えられる。

##### 4) 外部修飾による被毛リポソームの創出

AtaA ファイバーの短縮と SNAP タグの融合物の設計を行った。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光散乱 (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 6)。こうして、AtaA の毛を表面に有するリポソームの創出に成功した。

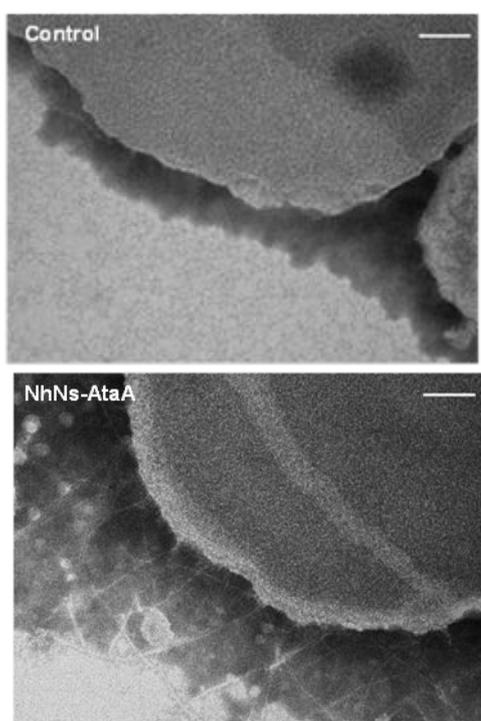


図 6. AtaA ファイバーを表面に有するリポソームの電子顕微鏡写真。コントロールは通常のリポソーム。

#### 4) 結果の総括

研究期間内には縮小版 AtaA ファイバーをリポソーム内で合成し、リポソームの中から外に毛を生やすことはできなかった。しかし、代替手段として、別に大腸菌に生産させた AtaA ファイバーで外側からリポソームを修飾することにより、事実上の被毛リポソームを創出することに成功した。リポソームの内部からタンパク質を分泌させることには、まだ技術上の困難があるが、外部修飾法は、機能性タンパク質を表層に局在させたリポソームを得る簡便な手法であり、タンパク質の分泌そのものを目的としない限り、機能性粒子を得る手段としては、応用範囲が広い。よって、困難を回避して当初の目的を達成したと言えよう。

#### 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 3 件)

1. K. Noba, M. Ishikawa, A. Uyeda, T. Watanabe, T. Hohsaka, S. Yoshimoto, T. Matsuura, and K. Hori; Bottom-up creation of an artificial cell covered with the adhesive bacterionanofiber protein AtaA, *J. Am. Chem. Soc.* 141, (2019), 19058-19066. 査読有
2. M. Ishikawa, S. Yoshimoto, A. Hayashi, J. Kanie and K. Hori; Discovery of a novel periplasmic protein that forms a complex with a trimeric autotransporter adhesin and peptidoglycan, *Mol. Microbiol.* 101 (2016), 394-410, 査読有
3. 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

[学会発表](計 10 件)

1. 堀 克敏; 驚異の接着性バクテリオナノファイバーAtaA の特性と応用展望; 日本化学会 R&D 懇話会、東京、2016. 12. 9
2. K. Hori, S. Yoshimoto, M. Ishikawa, TpgA, a new peptidoglycan-binding protein forming a complex of the unique *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin AtaA, 1st Zing Protein Secretion in Bacteria Conference, 2016. 11. 9-12, Tampa, USA
3. Furuichi, K. Izumitani, K. Hori; Flow cell analysis of the process of bacterial cell adhesion mediated by the adhesive nanofiber protein AtaA under shear stress, FEMS 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 2015.6.7-11
4. K. Hori, S. Yoshimoto, Y. Furuichi; Microscopic analysis of the process of bacterial cell adhesion and autoagglutination mediated by the adhesive nanofiber protein AtaA, FEMS 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 2015.6.7-11
5. 平野春香、吉本将悟、小祝孝太郎、NORSHARIFFUDIN Nur`izzah、三木章弘、LUPAS Andrei、LINKE Dirk、HARTMANN Marcus、鈴木淳巨、堀 克敏; 高接着性タンパク質 AtaA のパッセンジャードメイン C 末端領域の機能・構造解析、日本化学会第 95 春季年会、東京、

2015.3.26-29

6. 古市吉秀、吉本将悟、堀 克敏；AtaAによる凝集・付着特性の顕微解析Ⅰ：コロイド化学の観点から；化学工学会第80年会、東京、2015. 3. 19-21
7. 泉谷啓太、古市吉秀、堀 克敏；AtaAによる凝集・付着特性の顕微解析：せん断応力の観点から；化学工学会第80年会、東京、2015. 3. 19-21
8. Y. Furuichi, K. Izumitani, S. Yoshimoto, K. Hori；The time profile of cell adhesion of the highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol5, ICAR2014, Madrid, Spain, 2014.10.1-3.
9. 永谷和子、中谷肇、堀 克敏；バクテリオナノファイバーAtaAのポストアッセンプリー修飾；第66回日本生物工学会大会、札幌、2014.9.9-11
10. 古市吉秀、泉谷啓太、吉本将悟、堀 克敏；ナノファイバー蛋白質AtaAによる細菌付着過程の解析；化学工学会第46秋季大会、福岡、2014.9.9-11

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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)研究分担者

松浦友亮 (MATSURA Tomoaki)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50362653