

研究課題別評価書

1. 研究課題名

細菌ナノファイバーの構造と接合界面の制御

2. 氏名

堀 克敏

3. 研究のねらい

驚異的な粘着性を示す細菌細胞の表層に発見した、直径数十 nm、長さ数百 nm のナノファイバーは、分子量 30 万近くの巨大蛋白質を主成分としており、その一次構造は 300 以上ものアミノ酸残基からなる配列が複数回繰り返されるユニークなものである。本研究では、この新しい生体高分子である細菌ナノファイバーの構造と付着機構を解明することで、これまでにない新しい分子や細胞の界面接合技術やアレイ技術の開発を目指す。

4. 研究成果

高付着性のトルエン分解細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 は、最初にターゲットとしたナノファイバー以外に少なくとも2種類のナノファイバーを有していた。最初にターゲットとしたナノファイバーは、遺伝子解析により一次構造の最終決定に至り、三量体型オートトランスポートアドヘシン(TAA)ファミリー(図1)に属する新規粘着蛋白質であることが判明し、*Acinetobacter* の TAA という意味で AtaA と命名した。TAA はグラム陰性細菌が持つ粘着性・周毛性のナノファイバー蛋白質であり、病原性細菌が宿主に感染する際に宿主の生体分子に結合する役割を果たす病原性因子として報告されてきた。グラム陰性細菌の細胞表層構造の内膜を、細菌に一般的な Sec システムによって通過してペリプラズムに出たのち、タイプ V と呼ばれる自己輸送システムにより外膜を通過して細胞外に分泌される。具体的には、ポリペプチド鎖のカルボキシル(C)末端側が外膜中にベータバレルを形成して自ら孔を形成し、その孔を通してアミノ(N)末端側のパッセンジャードメインと呼ばれる残りの部分が外に出る。その際、フォールディングの自由エネルギー差を利用して ATP のエネルギーに依らないで外膜を通過すると言われている。しかし具体的なフォールディングのプロセスやシャペロンの存在などについては未解明である。TAA が構成するナノファイバーは、細菌が持つ粘着

性ナノファイバーとして広く知られているピリのような蛋白質サブユニットの積み上げ構造をとらず、C 末端側の外膜結合部位(ファイバーの根元)から N 末端側のファイバー先端に向かっ

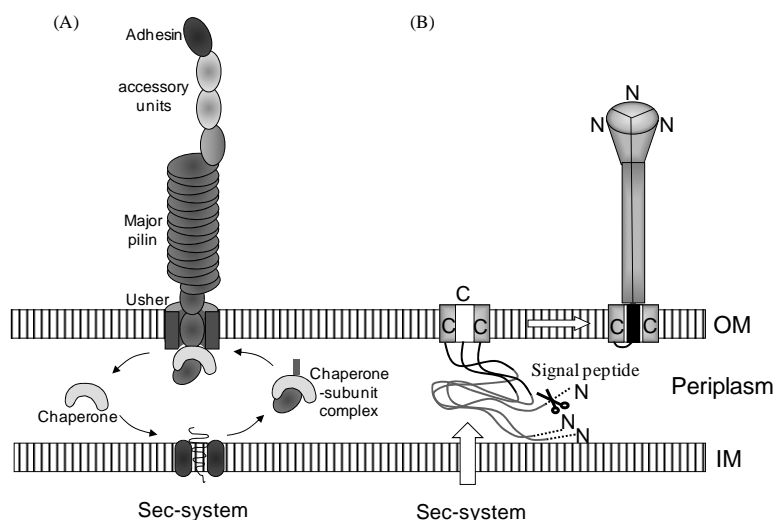


図 1. *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株が有する粘着ナノファイバーの模式図

(A)一般的なタイプ 1 ピリの構造。先端の粘着蛋白質サブユニット(adhesin)をコードする遺伝子が、Tol 5 では複数コピー存在する。(B) TAA。実際には、超らせんやベータ構造が複雑に配置する立体構造をとる。

て延びた繊維状構造をとり、名称の通りホモ三量体を形成する。

決定した一次構造より、バイオインフォマティクスによって可能な限り高次構造を予測した。AtaA の構造は、N 末-シグナルペプチド-頭-首-柄-外膜アンカー-C 末という TAA の基本構造には大まかに従うが、次の点でユニークであった。①3630 アミノ酸から成る巨大ペプチドで構成される。現時点では、これがホモ三量体を形成すると考えられる。既報のどの TAA よりもずっと大きい(TAA のプロトタイプである YadA は 455 アミノ酸)。②YadA 様の頭部が通常の N 末端に加え C 末端寄りにもある。③柄は、ほぼ同じ配列をもつ繰り返し構造のグループが複雑に配置する構造をとる。④他の TAA ではコラーゲン結合に関与するとされるドメインが AtaA では不完全な形で、10 回以上繰り返される。しかもドメインの根幹となるアミノ酸は保存されていない。

既報の TAA は全て、病原性グラム陰性細菌が宿主に感染する際に働き、コラーゲンやフィブロネクチンなどの ECM に特異的に結合する他、細胞の自己凝集機能を有することが示されている。しかし、Tol 5 細胞の TAA (AtaA) は、非生物表面への非特異的付着を引き起こすことが、AtaA 欠損変異株の相補試験によって示された。しかも AtaA によってもたらせる Tol 5 株の付着性、すなわち固体表面への親和性は極めて高く、例えば、細胞培養液をピペットでサンプリングするだけで、ピペットの内壁が細菌細胞ですっかり覆われてしまうほどである。ウェルプレートに付着した細胞を染色する方法により定量評価すると、バイオフィーム形成能を示す他の付着性細菌とは比較にならないほどの高い付着性を示す。このような固体表面への非特異的相互作用に加えて、AtaA は Tol 5 株の細胞自己凝集性の原因にもなっていることが示された。細胞自己凝集は、AtaA 同士が自己認識的に分子間相互作用をしているか、細胞表層の他の生体分子と相互作用していることによると考えられるので、特異的相互作用の結果とも言える。一つの粘着蛋白質が、非特異的相互作用と特異的相互作用の両方を担い、しかもその作用が強いという点で、AtaA は非常にユニークな機能を有していると言える。ところが、本研究の過程で、Tol 5 株は AtaA 以外にも複数のナノファイバーを有していることが明らかとなった。少なくとも AtaA 以外の周毛性ナノファイバーとして、タイプ1ピリともう一つ別のピリファイバーを有している。タイプ1ピリ(Fim)では、メジャーピリン(FimA)と呼ばれる単一種の蛋白質が積み上がって長い柄を構成し、先端にアクセサリー蛋白質、最先端に粘着蛋白質が配置する(図1)。

Tol 5 株細胞上での複数種類のナノファイバーの存在が明らかとなったため、AtaA が固体表面への付着性や細胞自己凝集性の真の原因であると断定することが困難となった。この付着特性を失った *ataA* 欠損株が、*ataA* を導入したプラスミドによって相補されたことから、AtaA が付着特性のフェノタイプ発現に必須であることは明らかである。しかし、他のナノファイバーと共同的に働く可能性も、この時点では否定できなかった。そこで、非付着性・非凝集性の *Acinetobacter* 属細菌である ADP1 株に *ataA* を導入したところ、Tol 5 株と同レベルの非特異的付着性と細胞自己凝集性を示した。よって、AtaAこそは、Tol 5 株の付着特性をもたらすナノファイバーであること、その遺伝子を導入することによって、この性質を他の細菌株に付与することが可能であることが明らかとなった。

全ての既報の TAA については、ECM への特異的結合能を有することが報告されているが、非生物表面への非特異的結合についての報告は皆無である。しかも上述のようにその相互作用は強い。このような強力かつ非特異的な相互作用を示す細菌ナノファイバーについては、世界的にも、*Caulobacter crescentus* のもつストーク/ホールドファストと、歯周病の原因菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* のもつ Flp ピリの二つしか、キャラクター化された例はない。しかも前者は蛋白質ではなく細胞表層構造が延びたものであるため、AtaA は非生物表面への非特異的で強い相互作用を示す蛋白質としては Flp に次ぐ二番目の例である。さらに Flp ファイバーはアッセンブリーと分泌に複数の蛋白質を必要とするピリ的一种であるため、他の細菌株に関連遺伝子群を導入して発現させるのは容易ではないと考えられ、事実そのような報告はなされていない。よって、*ataA* は他の細菌にこのような付着特性を *trans* に付与することができた世界最初の事例である。これは、*ataA* の導入によって微生物細胞を固体表面へ直接固定化できる技術を確立したことを意味しており、その工学的

意義は非常に大きい。

微生物細胞を有害物質の分解や逆に有用化学品の生産に触媒として利用する技術は、省エネルギー・環境低負荷のホワイトバイオテクノロジーとして、グリーンケミストリーの分野で期待されている。しかし、微生物利用プロセスはコストが高く実用化の障害となっている。微生物細胞の固定化技術はコストダウンの有力な手段であるが、これまでは有効な固定化技術は存在しなかった。広く用いられている技術として、ゲルの中に細胞を埋包する包括固定法があるが、ゲルの内部は物質輸送律速となり、全体の反応速度の著しい低下をもたらすという問題があった。AtaA を利用した担体表面への直接固定化法は、このような問題を生じない画期的な固定化技術である。研究対象生物である *Acinetobacter* 属細菌は、そもそも種々の基質を変換する多彩な能力を有しており、化学反応を担う生体触媒として期待されている。中でも、今回付着性の付与に成功した ADP1 株は全ゲノムが解読されており、また自然形質転換により外来遺伝子の導入が可能のため、大腸菌よりも産業化には有用な微生物であるとも考えられている。また、理論的にはこの技術は大腸菌を含む全てのグラム陰性細菌に適用可能である。有害物質の分解や有用化学品の微生物生産、バイオマスエネルギーの生産など、本技術の応用範囲は非常に広い。

微生物細胞の特異的付着も非特異的付着も、基本的には、疎水性相互作用、静電相互作用、水素結合といった非共有結合による相互作用が働いていると推定される。両者の違いは、特異的相互作用の場合には、結合蛋白質とレセプターの作用部位に立体構造上の安定化因子が働く点にあると考えられる。このような因子が働きにくい非特異的相互作用は、特異的相互作用より結果的に弱い、言い換えれば親和性が低いと考えられる。それに関わらず AtaA が高い付着性を発揮するには、結合点が多数あると考えるのが妥当である。先述したとおり、AtaA は繰り返し構造がモザイク状に配置する長い柄を有しており、それらは潜在的な作用部位と言えよう。さらに、AtaA ファイバーは周毛性で細胞を覆うように無数に生えているので、吸着点の総数は膨大になり極めて高い付着性を発揮することができるものと考えられるのが、現時点では合理的である。強力で非特異的な微生物付着の分子機構の詳細を解明するのに、AtaA は有力な材料と言えよう。

5. 自己評価

Tol 5 が有する複数のナノファイバーの中から、非特異的で強力な付着をもたらすファイバーとして AtaA を特定することができた。AtaA が属する TAA はここ数年注目され出したばかりの蛋白質ファミリーであるが、AtaA は構造的にも機能的にもユニークな TAA であり、他の細菌に付着性を付与できることを示した点でも、世界初の成果を出せたと満足している。しかしながら、結合部位の特定と相互作用の実態解明にまで至らなかったことは心残りである。また、高次構造については、ファミリー蛋白質との相同性などからある程度は推定できたが、実験的に明らかにすることはできなかった。Tol 5 株自体オリジナルな微生物であり、遺伝子操作技術が確立されていなかったのも、ベクターの構築など材料を一つずつ構築していくのに時間を要した。また、反復配列を含む長い遺伝子を扱うのは、塩基配列の決定やクローニング一つをとっても容易ではなく、試行錯誤の連続であった。それでも、AtaA の導入により付着性を付与することに成功するにまで至った。これは微生物細胞の新しい固定化手法であり、界面制御技術の一端として工学的意義の高い技術を確立できたと自己評価している。いずれ蛍光蛋白質に次ぐ機能性蛋白質として開花する可能性のある新規蛋白質として AtaA を同定し、そのキャラクタリゼーションを進めることができたものと、今回の研究成果を位置付けている。

6. 研究総括の見解

細菌表層のナノファイバーについて、粘着機能を有するファイバーの遺伝子解析から、特徴あるタンパク群を発見するなど、生化学方面からの研究は大変進展した。一方、粘着(接着)機構の解明には、ナノファイバーの物理化学の研究が必須であった。領域内での共同研究などで分野を越えた発展を期待したが、受け取り側(物理化学分野)の準備が間に合わな

かった感がある。引き続き、物性測定につなげる、双方からの努力に期待したい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. 樋口愛介、堀田康明、山本宏治、堀 克敏; 改良ネガティブ染色法による *Acinetobacter* 属細菌 Tol5 株細胞上の 3 種粘着性ナノファイバーの識別; 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌, **23**, (2009) 9-14.
2. H. Watanabe, Y. Tanji, H. Unno, **K. Hori**; Rapid conversion of toluene by an *Acinetobacter* sp. Tol 5 mutant showing monolayer adsorption to oil-water interface, J. Biosci. Biotech. **106**, (2008) 226-230.
3. **K. Hori**, H. Watanabe, S. Ishii, Y. Tanji, and H. Unno; Monolayer adsorption of a bald mutant of the highly adhesive and hydrophobic bacterium, *Acinetobacter* sp. Tol 5, to a hydrocarbon surface; Appl. Environ. Microbiol. **74**, (2008) 2511-2517.
4. S. Ishii, S. Miyata, Y. Hotta, K. Yamamoto, H. Unno, and **K. Hori**; Formation of filamentous appendages by *Acinetobacter* sp. Tol 5 to adhere to solid surfaces; J. Biosci. Biotech. **105**, (2008) 20-25.

②特許

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 堀 克敏

発明の名称: 微生物に対して非特異的付着性及び/又は凝集性を付与又は増強する方法及び遺伝子

出 願 人: 国立大学法人名古屋工業大学

PCT 国際公開番号: WO 2009/104281A1

国際公開日: 2009 年 8 月 27 日

③著書

1. 堀 克敏; 付着機構の解明と工学的応用可能性; 『バイオフィルムの基礎と制御』エヌ・ティー・エス, (2008) p.65-80.

④招待講演

1. **K. Hori**; Bacterial nanofibers applicable to immobilization and surface display of industrial microorganisms; BioEco 2009, Tianjin, China, 2009.
2. **K. Hori**; Adhesive nanofibers for bacterial adhesion; **【Keynote Lecture】**BIT's 2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009, Seoul, Korea, 2009. 4. 5-7.
3. 堀 克敏; バイオフィルム形成に関わる細菌ナノファイバー; 日本農芸化学会 2009 年大会 札幌, 2009. 3. 27-29.
4. **K. Hori**; Bacterial adhesion and cell surface structure; **【Keynote Lecture】**5th International Conference Interfaces against Pollution, (2008), Kyoto, Japan, 2008. 6. 2.
5. **K. Hori**; The Role of Bacterial Nanofibers for Cell Adhesion; **【Keynote Lecture】**2nd International Symposium on Advanced Biological Engineering and Science, (2008), Beijing, China, 2008. 4.1.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. **K. Hori**, N. Hiramatsu, M. Nannbu, K. Kanie, M. Okochi, H. Honda, and H. Watanabe; Drastic change in cell surface hydrophobicity of a new bacterial strain, *Pseudomonas* sp. TIS1-127, induced by growth temperature and its effects on the toluene-conversion rate, J. Biosci. Biotech. **107**, (2009) 250-255.

②受賞

1. **Best Presentation Award, APBioChech' 09; K. Hori**; Langmuir adsorption of hydrophobic bacterial cells to the Oil surface for highly efficient conversion of a hydrophobic and toxic substrate. 2009. 11. 28.