

報告番号	甲 第 14956 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 細胞接着タンパク質 AtaA と AtaA 発現細菌細胞の接着力に関する研究
(Study on the adhesion strength of adhesive protein AtaA and AtaA-expressing cell)

氏 名 石井 慧

論 文 内 容 の 要 旨

地球上の95%以上の細菌は、水的環境に生息するにもかかわらず、液中を漂うよりも固体表面に付着して存在することを好む。細菌の表面付着現象は、感染症やバイオフィリングなどといった深刻な問題を引き起こす反面、バイオプロセスにおける生物触媒に利用を高効率化するなどの産業利用法も提案されている重要な現象である。この時、細菌付着時の付着表面への細菌の接着力の強さは、水流などによって発生するせん断力からこの細菌付着を維持するための力であり、細菌付着の安定性に関わる重要なパラメータである。

Acinetobacter sp. Tol 5 は、三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) ファミリーの AtaA を介して、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルなど疎水性のプラスチックや、親水性のガラス、さらには金属など様々な材料表面に対して高い接着性を示す。AtaA は 3630 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖がホモ三量体化した巨大ファイバータンパク質で、N 末端側から嵩高い球状のヘッドドメイン、多種多様なドメインの繰り返しからなる長細いストロークドメイン、これらを細胞表層に分泌し外膜にアンカリングする機能を担う C 末端の膜貫通ドメイン、によって構成されている。AtaA は他の TAA と同様に自己凝集性を示すが、様々な非生物表面に非特異的かつ高い接着性を示す点でユニークである。この AtaA をコードする遺伝子を、本来付着性を持たない他の有用微生物に発現させることで Tol 5 株並みの高付着性・自己凝集性を付与することができる。接着性を付与した微生物は担体と短時間混合するだけで容易に固定化できるため、固定化微生物触媒として反応に用いることができる。このような AtaA を用いた固定化は、従来の固定

化法の問題であった化学的処理に伴う失活や高分子ゲルへの包埋による拡散律速、固定化力の弱さなどを克服できる新規の微生物固定化技術として期待される。しかしながら、高い接着性を示し、応用利用法も提案されている AtaA を介した接着現象が与える接着力の強さは興味深いにも関わらずこれまでのところ調べられていない。

本論文では、極めて高い接着性を示す Tol 5 細胞および AtaA の接着力を、単細胞・単分子レベルで明らかにし、その接着特性に迫ることを目的とした。第 1 章では、研究の背景となる細菌付着現象と付着時の接着力の意義を紹介し、研究対象となる Tol 5 及び AtaA とその先行研究の状況およびその接着力が測定されていないという課題について説明をした後に、その解決方法となりうる原子間力顕微鏡 (AFM) による単細胞・単分子力学分光法による生体分子の力学特性解析法を説明し、本論文の目的と構成を述べた。第 2 章では、Tol 5 の細胞接着力を測定する目的で、AFM を用いた水中フォースマッピングによってその細胞表面接着力の可視化を行った。Tol 5 細胞の接着力分布を鮮明なトポグラフィ図と共に示し、Tol 5 が他の接着性細菌よりも遥かに強力な表面接着力を示すことを明らかにした。Tol 5 の細胞接着力は AtaA の分布に従って細胞表層に一様に分布しており、その表層蓄積量に依存して強くなる様子が確認された。過去の研究によって報告されていた、カザミノ酸存在下と低イオン強度環境という二つの Tol 5 の接着性を阻害する環境下で行ったフォースマッピングにおいては、カザミノ酸存在下では Tol 5 の接着力は大幅に低下した半面、低イオン強度環境下ではその接着力はほとんど影響を受けていなかった。このことは、これら二つの環境が異なるメカニズムによって Tol 5 の接着性を阻害していた可能性を示唆するだけでなく、AFM を用いた接着力の直接的な測定法が、これまでに Tol 5 及び AtaA で行われてきた接着性試験とは異なる知見を提供し得ることを明らかにした。AtaA によって提供される強力な細胞接着力は Tol 5 以外の発現ホストに *ataA* を異種発現させた場合においても確認され、その接着力はシリコンと金という異なる材料表面に対しても同等だった。このことは、AtaA を用いた細胞固定化法が、異なる材料表面に対して強力な接着力をも与える可能性を示唆し、産業利用可能性をより高めるものであると考えられた。第 3 章では、その非特異接着性の広範さゆえにこれまで調べられていなかった Tol 5 の接着傾向を評価する目的で、Tol 5 と AtaA が属する TAA ファミリータンパク質提示細菌について、いくつかの難付着性材料を含む様々な材料表面に対する接着性評価を行った。非特異接着性は、AtaA のみならず TAA ファミリータンパク質について広く報告がなされている性質だが、BadA を発現する *Bartonella henselae* 及び YadA を発現する *Yersinia enterocolitica* の様々な材料表面に対する付着性を Tol 5 と比較したところ、AtaA を介した Tol 5 の付着性がその他の TAA 提示細菌と比較して著しく高いことが確認された。Tol 5 は異なる抗付着メカニズムを持つ複数の難付着材料に対しても 2 時間以内に付着を達成できた一方で、親水性双イオン性ポリマーである MPC ポリマーで被覆した表面に対しては、ほとんど接着性を示さなかった。さらなる解析のため、先端のコロイド表面を変化させたコロイダルプローブを用いた単細胞接着力試験を行ったところ、Tol 5 は様々な表

面に対して同様の方法で測定された *B. henseiae* よりも 2-5 倍程度高い接着力を示した一方で、MPC ポリマー修飾表面にはやはり接着力を示さなかった。この結果はフローセルシステムを用いた水流によるせん断力に対するの抵抗力試験においても顕著に表れており、非修飾のガラス表面に付着した Tol 5 がどれほど流速を高めても剥離しなかった一方で、MPC ポリマー修飾表面においては 2 cm/min 程度のごく弱い水流によって容易に剥離する様子が確認された。MPC ポリマーは、Tol 5 においては初めて報告されたその接着性・接着力が通用しない材料表面であり、その接着阻害メカニズムは今後の AtaA の接着メカニズムの解明にも役立つと考えられた。第 4 章では AFM を用いた単分子力学分光法によって、細胞表層の AtaA 三量体ナノファイバー1 分子レベルでの定量的な接着特性評価を行った。表層の AtaA 提示量を調整した Tol 5 変株表層をナノサイズの先端を持つプローブで走査することで、AtaA 単分子と見られる分子を伸長させた際のフォース-ディスタンスカーブ(フォースカーブ)を取得した。これに対し、複数分子の AtaA を伸長させた時のフォースカーブから解析した単分子 AtaA の接着力を比較したところ、それぞれの接着力中央値はほぼ一致した。このことから、AFM を用いることで AtaA 単分子の接着力が正しく測定できていることが示唆された。この手法を応用することで、親水性・疎水性、正電荷・負電荷などといった異なる物性を与えたプローブに対する AtaA 単分子の接着力を測定した。どのプローブに対して示され AtaA の単分子接着力も、非修飾のシリコン製プローブによって測定された単分子接着力とほとんど変わらず、生体分子の接着力に関わることが多いとされるこれらの物性が AtaA の接着力の強さに対しては支配的な要素ではない可能性が示唆された。さらに、AtaA 単分子をプローブで釣り上げたまま短時間の間に繰り返し伸縮させることで、AtaA が接着状態を崩壊させる際の物理挙動を明らかにすることができた。3 秒間のインターバルを置いた 15 回の繰り返し伸長において、AtaA はほとんどの回で同形のフォースカーブを示した。タンパク質の高次構造が崩壊したことを示すソートゥース・パターンについても各回でほぼ同数であったことから、AtaA は一度伸長によって壊れた高次構造がわずかな収縮時間によってリフォールドし、ばねのように繰り返し働ける可能性を示す。第 5 章では、本研究によって得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。本研究ではこれまで明らかにならなかった Tol 5 単細胞及び AtaA 単分子の接着力の強さがどちらも定量的に調べられた。細胞及び分子の接着力の強さに関する情報は、その特異な接着性の応用利用に直接的に関わり、特に AtaA 分子を介した細胞固定化法をバイオプロセスに組み込む際に必要な安定性に関する情報を提供する。また、AFM によって示された Tol 5 単細胞及び AtaA 単分子の接着プロパティを直接的に測定する手法は、その接着メカニズムや AtaA の各ドメインの役割解明などに貢献できるものと考えられる。今後 AtaA の接着に際しての相互作用力についても明らかになると考えられ、その接着メカニズムの根幹に迫ることができるだろう。