

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 14956 号
------	---------------

氏 名 石井 慧

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)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	工学研究科	教授	堀 克敏
委員	名古屋大学	工学研究科	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	理学研究科	教授	小嶋 誠司
委員	名古屋大学	工学研究科	教授	清中 茂樹

論文審査の結果の要旨

石井慧君提出の論文「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」は、これまで調べられていなかった、高い接着性を示すグラム陰性細菌*Acinetobacter* sp. Tol 5およびその接着タンパク質AtaAの単細胞・単分子レベルでの接着力の強さを定量的に明らかにしている。各章の概要は以下の通りである。

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*Acinetobacter* sp. 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ている。

第2章では、AFMを用いた水中フォースマッピングによってTol 5の細胞表面接着力の可視化を行っている。細胞周囲の粘着層が確認できるほど鮮明なフォースマッピングイメージを取得することにより、Tol 5が他の接着性細菌と比較しても著しく強力な細胞接着力を発揮することを明らかにした。Tol 5の接着力は細胞に蓄積したAtaA量依存的に増加しており、細胞全体で一様に強力な接着力が確認されている。また、先行研究によってAtaAの接着性を低下させることが報告されている二つの環境が、その接着力に対しては異なる影響を及ぼすことを明らかにした。これは、それぞれの接着性阻害環境が異なるメカニズムによってAtaAの接着性を阻害していることを示す重要な知見である。さらに、AtaAをTol 5以外の宿主に異種発現させた際の異なる材料表面に対する接着力についても測定を行い、その接着力がシリコンと金という異なる材料表面に対して同等に強力なものであることを明らかにしている。

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、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Tol 5の接着性評価を行った。AtaAが属する三量体型オートトランスポーターアドヘシン（TAA）は非特異的な接着性を示すことが知られているが、Tol 5がAtaAを介して示す接着性は他のTAA提示細菌と比較して遥かに著しく高いことを確認している。Tol 5は、PTFE、マイカ、p(mOEGMA)というそれぞれ異なるメカニズムによって細菌の付着を防ぐ難付着性材料に対して一様に高い接着性を示した一方で、MPCポリマー表面に対してはほとんど接着性を示さないということが明らかになった。AFMを用いた各材料表面に対する単細胞接着力測定においても、接着性試験と同様にTol 5がMPCポリマー被覆表面にはほとんど接着力を示さないことが示された。併せて行ったフローセルシステムを用いた試験によって、MPCポリマー表面上においてはTol 5がごく弱い水流によって剥離するという上記の測定結果を実験的に裏付ける知見を得ている。MPCポリマー表面は、素材レベルでは初めて発見されたTol 5の接着性が通用しない材料表面であり、表面の自由水分率が高いというMPCポリマーの特異な表面特性がAtaAの接着メカニズムに強く影響するものである可能性を示唆している。このことは、今後のAtaAの接着メカニズムの解明にも役立つ有用な知見である。

第4章では、AFMを用いた単分子力学分光法（SMFS）によって、細胞表層のAtaA三量体ナノファイバー単分子レベルでの定量的な接着特性評価を行った。細胞表層のAtaA提示量をコントロールしたTol 5細胞上でSMFSを行うことで、AtaA三量体単分子とみられる分子フォース-ディスタンスカーブの取得に成功し、Tol 5野生株上で取得したフォース-ディスタンスカーブを分析することで、AtaAの単分子接着力を明らかにしている。AtaA単分子の接着力は、同様の方法で測定された細菌周毛性アドヘシタンパク質と比較しても2倍以上強力であることが明らかになり、Tol 5がAtaAを介して発揮する高い接着性を裏付ける重要な知見を得ている。AtaA単分子接着力を測定した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もAtaAの単分子接着力はほとんど変化せず、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単分子を伸張させた際のフォース-ディスタンスカーブからはAtaAが剥離に際して示す力学応答を解析し、伸長時に崩壊したAtaAの高次構造がわずかな時間でリフォールドし、繰り返し何度も接着に利用できる可能性があることを示している。

第5章では、本研究全体の結論を与えている。

以上のように本論文では、AFMを用いた単細胞力学分光法ならびに単分子力学分光法を用いることによって、Tol 5単細胞及びAtaA単分子の接着力の強さを定量的に明らかにした。これらの評価方法並びに得られた結果は、AtaAの接着性の新規細胞固定化法への応用を実現するために重要であり、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である石井慧君は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格があると判断した。