

報告番号	甲 第 11885 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ナノファイバータンパク質 AtaA の表層提示機構と分子特性に関する研究
(Study on the secretion mechanism and molecular properties of the nanofiber protein AtaA)

氏 名 吉本 将悟

論 文 内 容 の 要 旨

生体触媒を用いたバイオプロセスは化学的な生産方法に比べ温和な条件で、高い選択性をもって物質を変換できるため、環境負荷の小さい物質生産技術として期待されている。用いられる生体触媒としては、多段階の反応が可能であることや触媒の安定化、精製コストの削減などの観点から、精製した単一の酵素だけでなく、目的の酵素を含む微生物細胞がそのまま触媒として使われることも多い。このような微生物触媒によるバイオプロセスの実用化のためには、高効率に物質を生産できる微生物株の構築など上流から、生産物の分離など下流のプロセスまで、プロセス全体の効率を改善していくことが重要である。上流プロセスをターゲットとした研究では、遺伝子組み換え技術を用いて物質変換に適した代謝経路を人工的に設計、構築するシステム代謝工学的手法が近年非常に盛んである。一方、下流プロセスにおいては、触媒濃度の向上や触媒の安定化、分離操作の簡便化、触媒の繰り返しまたは連続的な使用が可能になることなどから、微生物触媒の担体への固定化が注目されている。微生物触媒の固定化法としては物理的吸着やイオン結合により直接固定化する担体結合法、グルタルアルデヒドなどを用いて触媒を架橋することにより触媒を凝集塊とする架橋法、アルギン酸などのゲルに触媒を閉じ込める包括法など様々な手法が研究されてきたが、固定力の弱さや固定化に伴う触媒活性の低下、物質の拡散律速、ゲルの脆さ、担体からの触媒の流出などそれぞれ問題点があり、汎用的かつ有効な固定化法の開発が望まれている。

トルエン分解性細菌として排ガスリアクターより単離された *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 を介して疎水性のプラスチックから親水性のガラス、さらには金属まで様々な非生物表面に対し高い接着性を示す。その接着性はフラスコで菌懸濁液とポリウレタン担体を数分間振盪するだけでほとんどすべての菌が担体に固定化され、菌懸濁液が透明になってしまうほど強力である。Tol 5 の接着因子である *ataA* 遺伝子を他の細菌に組み込み発現させることにより、本来接着性を示さない菌体に Tol 5 と同様の接着性を付与することが可能である。接着性を付与した有用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、固定化微生物触媒として反応に供することができる。この方法では化学試薬を用いず、また酵素は微生物細胞に守られるため固定化に伴う失活は起こりにくいと考えられる。具体例として、インドールを原料として青色色素であるインディゴを生産できる *Acinetobacter* sp. ST-550 に *ataA* 遺伝子を導入し固定化微生物触媒として利用することにより、野生株と比べインディゴの生産効率が約 5 倍になった例や、別の *Acinetobacter* 属細菌で酵素活性が変化ないままエステラーゼ反応を 10 回繰り返し行った例が報告されている。AtaA による微生物の固定化は従来の固定化法の問題点であった固定化に伴う酵素の失活や拡散律速、固定力の弱さなどを克服することに加え、ポリウレタンやグラスウール、金属、植物由来の繊維など様々な素材を担体として利用できることから新規の微生物固定化技術として期待される。しかしこれまでの研究では AtaA を有する菌体そのままの接着特性のみが評価され、AtaA 分子そのものの特性やその接着機構は明らかになっていない。また、3,630 残基からなる AtaA がどのように細胞表層に提示されるかについての知見は少なく、異種微生物における発現がうまくいかない例もあった。

本論文では、微生物固定化技術としての応用が期待される AtaA がどのように細胞表層に提示され、提示された AtaA は分子としてどのような接着性、特性を示すのかを明らかにすることを目的とした。第 1 章では、研究の背景となる生体触媒とその固定化技術、研究対象とするナノファイバータンパク質 AtaA の先行研究、本論文の目的と構成について述べた。第 2 章では、ゲノム上で *ataA* 遺伝子の下流に存在し 264 残基からなるタンパク質をコードする *tpgA* 遺伝子に着目し、AtaA の表層提示における TpgA の役割を明らかにした。まず逆転写 PCR により、*ataA* と *tpgA* が単一のオペロンを形成していることが明らかになった。次に細胞分画とプルダウンアッセイの結果から、TpgA が外膜で AtaA と相互作用することが示唆された。また、ペプチドグリカン結合タンパク質を抽出したところ TpgA が含まれていたことから、TpgA はペプチドグリカンとも相互作用することが示唆された。さらに *tpgA* 欠損変異株と復帰変異株での AtaA の表層提示量の定量、細胞分画、菌体接着試験により、*tpgA* が AtaA の表層提示、特に外膜外側に提示される量を増加させることが示された。これらの結果より、TpgA は AtaA と、さらにはペプチドグリカンと結合しながら AtaA の表層提示を促進することが明らかになった。TAA-TpgA 様タンパク質をコードする遺伝子カセットは多様なグラム陰性細菌のゲノム中に見いだされたことから、TpgA オルソログは AtaA だけでなく多くの TAA の表層提示に関わると考えられる。第 3 章では、AtaA の

分子特性を解析した。そのためまずは、AtaA ファイバーの根元部分にプロテアーゼの認識配列を組み込み、それを表層提示した細胞をそのままプロテアーゼ処理することにより、接着に関与するパッセンジャードメイン (PSD) のほぼ全長を菌体表層から分離精製する手法を確立した。精製した AtaA PSD を電子顕微鏡で観察すると、長さ約 225 nm、太さ約 4 nm のナノファイバー像が見られた。酸、塩基性条件下と 70°C までの熱処理では AtaA PSD の二次構造と電子顕微鏡で観察できるファイバー形状に変化は見られず高い接着性を示したことから、AtaA が他の TAA と同様に高い構造安定性をもつことが明らかになった。一方で、80°C 以上の熱処理によって二次構造とファイバー構造の減少が見られ、それに伴って接着性も失われた。このことから、AtaA の材料非特異的な接着はその分子の大きさと一次構造だけで達成できるものではなく、タンパク質の高次構造が重要であることが示唆された。第 4 章では、AtaA の塩濃度依存的な接着性について示した。精製した AtaA PSD は塩溶液中では高い接着性を示したが、イオン強度が 10 mM 以下の溶液中では次第に接着性が低下し、純水中ではほとんど接着しなかった。AtaA を発現させた微生物細胞の接着性も同様の特性を示した。さらに一度塩溶液中で固定化した微生物も、純水で洗浄することにより剥離できることが明らかになった。この接着特性を利用して微生物の可逆的固定化法を考案し、細胞の接着性と触媒活性を損なうことなく細胞の着脱を 3 回達成した。さらにポリウレタン担体に 2 つの別の菌体を順番に固定と剥離操作を行うことで、異なる反応で担体を再利用できた。これらの結果から、微生物の接着性を自由に制御できること、さらには微生物を着脱することで微生物の固定化に用いる担体を再利用できることが示された。第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。本研究で確立した AtaA を分離精製する手法と、明らかになった分子特性は AtaA の接着機構を解明するうえで有益な知見となる。また、それらの知見をもとに AtaA を用いた微生物固定化技術が幅広く利用されることが期待される。