界面微生物プロセスによるグリーン・イノベーション

堀　克敏

元気な日本を取り戻すには成長戦略が欠かせず，科学・技術はその根幹である．しかし厳しい財政事情の中で科学・技術に無尽蔵に投資をすることも叶わず，日本の得意分野に注力した施策を取らざるを得ない．そんな中，政府は，グリーン・イノベーションとライフ・イノベーションの二つを重点的に取り組む課題として掲げて，先端的研究開発の支援を集中させてきている．バイオというと，どちらかというとライフ・イノベーションにつながる課題が多いようなイメージがあるが，バイオフューエルやバイオマス，ホワイトバイオテクノロジーなどは，言うまでもなくグリーン･イノベーションの範疇である．筆者も，先日ようやく決定された若手と女性研究者のための「最先端・次世代研究開発支援プログラム（以下次世代プログラム）」に，界面微生物プロセスの構築を目指した提案で，グリーン・イノベーションとして採択いただいた．研究者一人あたりに対する支援額は最大2億円と大規模であるだけに，相応の研究成果を求められるのは当然であるが，いわゆる「国民との科学・技術対話」も求められており，科学者としての説明責任を問われてもいる．

ちょうど本特集テーマと合致していることもあり，この場をお借りして，次世代プログラムにおける筆者の研究テーマを中心に紹介したい．本寄稿により国民への説明責任を果たしているというのは無理があろうが，筆者の課題の位置づけや狙いを生物工学会会員に広くご理解いただき，その一助にできればとも考えている．

接着ナノファイバータンパク質による微生物の付着

バクテリオナノファイバーの機能　筆者の次世代プログラムの課題名は「バクテリオナノファイバータンパク質の機能を基盤とする界面微生物プロセスの構築」である．多くの細菌は，直径数nmから数百nmの繊維状の細胞付属器官を細胞表層から生やしている．これらバクテリオナノファイバーはさまざまな機能を有している．もっとも有名なものは鞭毛であり，バクテリア細胞が遊泳するための器官である．その構造はまさにナノマシンとも言える分子スクリュー・分子モーターであり，構造と機能についての研究が進んでいる．ピリとかフィンブリエと呼ばれる髪の毛様の細胞付属器官についても，盛んに研究がなされてきた[1]．ピリもフィンブリエも日本語では線毛と訳される細胞付属器官の同義語である．細胞接着，宿主への感染からtwitchingやswarmingと呼ばれる表面上での運動，さらにはDNAなどの物質輸送まで，機能はフィンブリエの種類によってさまざまである．構造や形成機構も多岐にわたるが，基本構造は，メジャーピリンと呼ばれる一種類の粒状タンパク質が，数百から数千個も螺旋状に配置しながら積み上がることで長い柄を形成し，その先端部分には複数種のアクセサリーサブユニットが付加した形をとる．

細胞接着に関わるバクテリオナノファイバー　細菌の多くがナノファイバーを使って，生体分子に特異的に接着したり，非生物表面に非特異的に接着しバイオフィルムを形成したりする[2]．上述のフィンブリエもこうした機能をもっており，多くのフィンブリエの先端には接着性のサブユニットが局在する．たとえば，大腸菌やサルモネラ菌が有するタイプ1ピリは，先端のFimHによってマンノースに特異的に接着する（図1A）[3]．また，近年，非フィンブリエ性接着ナノファイバーとして，グラム陰性細菌が有するオートトランスポーターアドヘシン（ATAD）が注目されている[4]．オートトランスポーター（AT）システムによるタンパク質の外膜輸送機構は，タイプⅤ分泌システムとも言われるもので，他のタンパク質の介在を必要としないで自身を外膜の外へ輸送する．構造もフィンブリエとは違ってサブユニットの積み上げ構造ではなく，ポリペプチド鎖のアミノ酸配列の並びの

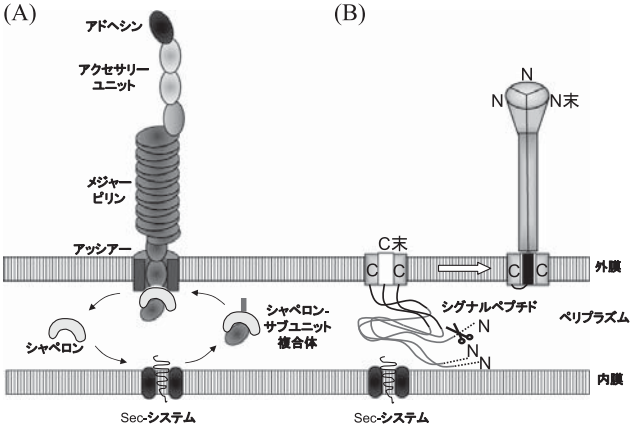

図1．細菌粘着ナノファイバーのアッセンブリー模式図．（A）タイプ1フィンブリエ，（B）TAA．

著者紹介　名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻（教授）　E-mail: khori@nubio.nagoya-u.ac.jp

方向に延びた繊維構造をとる．これまでのところ，単量体のタイプとホモ三量体のタイプが知られているが，ともにカルボキシル末端側がβバレル構造を形成して外膜にトンネル構造を作り，アミノ末端側を外へ分泌する．外に分泌されるアミノ末端側をパッセンジャードメイン，トンネル構造を形成して輸送通路となる部分をトランスロケーションユニットとそれぞれ呼ぶ（図1B）．既報の限りでは，パッセンジャードメインは，単量体タイプでは外膜の外に出た後，自己消化により切り離されることが多いが，三量体タイプではつながったままのものがほとんどで，この場合，トランスロケーションユニットはそのまま膜結合部位になる．トランスロケーションユニットは，12本のβストランドが逆平行β構造をとりながら親水基を内側に，疎水基を外側に向けたβバレルを形成して外膜を貫通する．三量体タイプの場合は，一つのポリペプチド鎖のカルボキシル末端が4本のβストランドを形成し，3本集まって12ストランドとなる．パッセンジャードメインがどの段階でフォールディングされるかについては明らかとなっていないが，フォールディングの自由エネルギー差によりATPのエネルギー非依存的に起こる輸送機構であることが，ATの特徴の一つである[5]．三量体タイプはTAA（trimeric autotransporter adhesin）ともOca（oligomeric coiled coils adhesin）ファミリーとも呼ばれ，最近，その詳細が多少なりともわかってきた．TAAは大きさが300アミノ酸程度のものから3000アミノ酸を超えるものまで多様であるが，典型的な構造は，アミノ末端からカルボキシル末端に向かって頭部，首，柄，外膜結合部位という順番に並び，“棒付きキャンディ”様である[6,7]．よって，ファイバーの長さはペプチドの長さで規定され，TAAによってさまざまである．X線構造解析などから高次構造の詳細がわかっているものは，*Yersinia enterocolitica*のYadAと*Haemophilus influenzae*のHiaだけである．一次構造からは，外膜結合部位の基本的構造は共通であると考えられているが，それ以外のドメイン構造は多様性に富んでいる．YadAの柄部は3本のαヘリックスが超らせんを形成するコイルドコイル構造をとっており，一次構造からは，他の多くのTAAもコイルドコイルに富んだ繊維を形成していると推定される．Ocaファミリーと言われるゆえんである[8]．頭部は，YadAもHiaもβストランドに富んだ二次構造をとるが，三次，四次構造は両者で大分異なる．TAAは病原性細菌の宿主への感染に直接的に関与しており，コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス（ECM）への特異的結合部位が頭部に存在することが報告されている[6,7]．

このように，ナノファイバーによる特異的接着については，分子レベルでのメカニズム解明が進んできたが，非特異的接着の分子機構についての知見は少ない．一般に非特異的接着は弱くて可逆的であると考えられており，実際，多くの細菌は，固体表面上でcrawling，gliding，twitchingと呼ばれる運動が可能である[9]．しかし，*Caulobacter crescentus*や*Actinobacillus actinomycetemcomitans*といった細菌は，例外的に非常に強力な非特異的接着性を示すことが知られている[10,11]．前者は細胞表層構造が伸長した粘着突起により，後者はFlpフィンブリエにより接着する．ただしこれら二例以外には，非特異的ながら強力な接着性を示すバクテリオナノファイバーの報告はなかった．

高付着性細菌*Acinetobacter* sp. Tol 5　芳香族分解能力をもつグラム陰性の高付着性細菌*Acinetobacter*属細菌Tol 5株は，培養液をプラスチック製のピペットで採取するだけで，ピペット内壁が細胞で瞬時にコーティングされるほど付着性が高い[12]．筆者らは，初めTol 5株の細胞表層に2種類の細胞付属器官を発見し，これらによってこの細菌が表面に付着することを示した[13]．一方はフィンブリエに似た周毛性繊維，他方は長さ数百nmの枝分かれのない直線状繊維で，末端で表面と相互作用する．このような細菌ナノファイバーは過去に報告がなく，筆者らは“アンカー”と名づけた．ところが電子顕微鏡技術の進歩により，Tol 5細胞が少なくとも3種類の周毛性ナノファイバーを有していることが最近明らかとなった[14]．興味深いことに，3種類のナノファイバーの形成は炭素源に依存していた[15]．遺伝子解析と細胞表層タンパク質の発現解析の結果，これらはタイプ1ピリ，TAA，Filであると同定された．ただしFilについては一部の*Acinetobacter*属細菌のもつナノファイバータンパク質であるとの情報しかなく，機能や構造については未知のタンパク質である．

新規ナノファイバータンパク質AtaAの構造と機能　既報のTAAはすべて宿主への特異的接着のみが知られている．非特異的で高い接着性を示すTAAはTol 5株のTAA（AtaAと命名）が初めてである．AtaAはこの接着性に加え，Tol 5の細胞自己凝集性の原因ともなっている．AtaAは構造的にもユニークである．AtaAは3630アミノ酸から成り，他のTAAと比べて格段に大きい（300 kDa以上）．また，非常に長い繰り返し構造がモザイク状に配置した長い柄を有す．さらにアミノ末端側に加えカルボキシル末端側の外膜結合部寄りにも二つ目の頭部が存在するなど，既報のTAAには見られない一次構造上の特徴を有している．

トランスポゾンのランダム挿入により得られた*ataA*遺伝子破壊株T1では，付着性が著しく低下し細胞自己

凝集性も失われる[16]．筆者らはTol 5株への効率的な遺伝子導入を可能にするために，*Acinetobacter*と大腸菌のシャトル発現ベクターを独自開発し（pARP3），このベクターに*ataA*遺伝子を挿入してT1株に導入することで復帰変異株を得た．復帰変異株は非特異的付着性と細胞自己凝集性を完全に回復した．これによってAtaAこそがTol 5株の高い付着性を担っていることが明確に示された．

次に，Tol 5株と同属の*Acinetobacter*属細菌でありながら非付着性のADP1株に，pARP3に載せた*ataA*遺伝子を導入した．その結果，Tol 5株に匹敵する付着性と細胞自己凝集性を付与することに成功した．さらに，産業微生物として重要な大腸菌に付着性を付与することを試みた．BL21株を*ataA*遺伝子で形質転換したところ，まったく付着性を示さなかった同大腸菌株が，非特異的な付着性と細胞自己凝集性を示すようになった．プロテアーゼによる部分分解を受けている兆候が見られ，*Acinetobacter*属細菌ほど高い付着性を付与するには至っていないが，これで大腸菌の効率的な固定化への道は開かれたと言える．

ナノファイバー固定化微生物による物質変換の事例

ホワイトバイオテクロジーにおいては，微生物細胞は遊離酵素と同様に，高い基質特異性と反応特異性，温和な条件での反応性を示す優れた触媒であると認識されている[17,18]．しかし微生物触媒は脆弱性や高コストといった欠点のため，実用化が期待通りには進んでいない．微生物の固定化は，細胞分離の簡便化，連続培養，繰り返し使用により効率的なバイオプロセスの構築を可能にし，しいてはコストダウンにつながるため，微生物利用の実用化には強力な手段となり得る[19,20]．現在最も広く使われている微生物固定化法は，アルギン酸などの高分子ゲル内に細胞を閉じ込める包括固定法である．しかしこの方法の最大の欠点は，ゲル内部における物質輸送律速であり，効率的な反応を犠牲にしてしまう．つまりこれまでは，凝集性の微生物や物理的固定化が容易な糸状性微生物を除いて，有効な微生物固定化技術はなかったと言える．AtaAによって微生物を担体表面上に直接固定化する技術は画期的な微生物固定化法であり，微生物細胞を利用するバイオプロセス実現へのブレークスルーとなるものである．以下に，AtaAによって固定化した微生物による二つのモデル反応を簡単に紹介する．

固定化微生物によるエステル加水分解　*Acinetobacter*属細菌はさまざまな化合物を分解したり生産したりする能力を有しており，バイオテクノロジーにおいて非常に有用な微生物であると期待されている[21]．なかでも先述のADP1株は自然形質転換能が高いため，遺伝子工学においては大腸菌よりも理想的なモデル微生物であるとも言われている[22]．そこで*ataA*遺伝子を導入したADP1株細胞を表面積の大きい多孔質担体であるポリウレタン製スポンジに固定化した．固定化ADP1細胞を担体ごと室温で数日間乾燥してから，エステル化合物の加水分解反応に供した．この反応では，ADP1株の細胞表層に存在するエステラーゼが触媒として働く[23]．バッチ反応の後，微生物が固定化されたスポンジ担体を取り出し，洗浄，水分除去後に，再び新しい反応液中に入れて2回目の反応に供した．この操作を繰返して，固定化微生物が再使用に耐えうるか検討した．その結果，少なくとも10回以上，延べ30時間以上に及ぶ繰返し反応では，酵素活性は保持されることがわかった．現在，さらなる限界を調べるなどより詳細な実験を実施中であるが，これまでの実験結果からも，AtaAによって担体表面に物理的に固定化した微生物は化学反応に繰返し使用可能であること，固定化後の乾燥保存が数日は可能であることが明確に示された．すなわち一度微生物細胞をスポンジなどの担体に固定化しておけば，好きなときに好きな場所（リアクター）に投入して化学反応に繰返し供することができるのである．微生物プロセスの利便性を飛躍的に高めることができる革新的な技術である．

固定化微生物による色素生産　もう一つの例は，やはり*Acinetobacter*属細菌の組換え菌を用いる色素生産についてである．ST550株はフェノールハイドロキシラーゼを有し，インドールを水に不溶性の青色色素インジゴに変換する能力を有する[24]．ADP1のときと同様にST550を*ataA*遺伝子で形質転換し，ポリウレタンスポンジ担体に固定化した細胞を色素生産に供した．基質のインドールは細胞毒性を有しているため，この株は有機溶媒を添加する二相系では効率的にインジゴを生産するが，有機溶媒を添加しないとインジゴをほとんど生産できないと報告されている．しかし，固定化ST550細胞は有機溶媒を添加しなくてもインジゴを生産することができた．インジゴの生産量は，ST550野生株に対して同じ固定化操作を行って得られた担体（わずかな微生物しか付着していない）を反応に供した場合（ネガティブコントロール）の300倍以上であった．また，菌体を固定化することにより，浮遊状態の菌体を使用した時よりも高濃度のインドールに耐えて効率的に反応を進めることができるようになるという結果も得られている．現在，この現象についてのより詳細な検討を行っている．

油水界面微生物による疎水性ケミカルの変換

AtaA欠損株細胞の油滴表面への単層吸着　*ataA*を

欠損させたT1変異株では，高付着性と同時に細胞自己凝集性も失われる．しかしながら細胞表層の高い疎水性は維持しているため，T1細胞は油滴などの疎水性界面に単層吸着することがわかった[25]．この吸着はラングミュア吸着等温線で記述することができる．

単層吸着細胞による高効率物質変換　疎水性の毒性基質は一相系では濃度を上げることが困難であり，効率的な微生物反応は困難である．毒性の低い有機溶媒や油を加えた二相系では，これら疎水性液体が基質のリザーバータンクとして働き，リアクターの液相中の濃度を上げることができるため，効率のよいバイオプロセスを構築することができる．その際，疎水性の高い細胞ほど基質の溶け込む油層との接触効率が上がるため，反応速度が上がると考えられ，筆者らは実験によりこれを証明した[26]．単層吸着を示すT1細胞では，自己凝集によって油相との接触が妨げられることがないので，より大きな効果が期待できる．筆者らはT1細胞を使ったトルエン変換反応において，3.1 g/（*l*・h）という，過去の文献上の最速値の10倍の変換速度を達成している[27]．

今後の展開

AtaAは，原理的には大腸菌を含むグラム陰性細菌には広く適用可能である．大腸菌など*Acinetobacter*属以外の細菌では，AtaAファイバータンパク質を安定に生産させるなどの検討が必要ではあるが，*ataA*遺伝子の導入による付着性の向上は明らかに認められており，他のグラム陰性細菌の固定化技術の確立についてのハードルはそれほど高くないと考えている．ただ，全長のAtaAはまだかなり大きく，遺伝子の導入は効率的ではないので，細胞接着に必要な最小領域を決定していく予定である．これはすなわち，非特異的に関わる構造と表面との物理的相互作用を明らかにすることを意味している．筆者の講演では必ずと言っていいほど質問されることでもあり，多くの人の関心もここにあると認識している．相互作用のメカニズムが明らかになれば，その知見の科学・技術への波及効果も大きく，その先に新たな応用の道も開けてくることは間違いない．また，枯草菌などのグラム陽性細菌や酵母など，グラム陰性細菌とは細胞表層構造の異なる微生物ではAtaAをそのまま利用することはできないが，それぞれの微生物のタンパク質分泌機構とインテグレートすることにより，グラム陰性細菌以外の有用微生物への適用も可能になると考えている．

接着機能に加え，AtaAの有用な特徴として分泌機構がある．AtaAに機能性ペプチドやタンパク質を融合すれば，ファイバー上にそれらを提示することができると思われる．次世代プロジェクトでは，このファイバー提示も計画に入れている．たとえばレアメタル吸着機能を有するペプチドや触媒機能をもつ酵素などの提示を計画している．

以上のとおり，次世代プログラムでは，AtaAの構造と機能についての基礎検討をさらに進めながら，得られた知見を基盤とするバイオプロセスを構築していく．また，AtaA以外のナノファイバーについても，構造と機能の解析を分子レベルで進め，新たな応用の道を検討する．本プログラム終了時には界面微生物工学およびバクテリオナノファイバータンパク質利用の礎が築かれていることを目指している．将来は，ナノファイバータンパク質を蛍光タンパク質GFPをも凌ぐ機能性タンパク質材料にすることを目標としている．

文　献

1) Soto, G. E. and Hultgren, S. J.: *J. Bacteriol*., **181**, 1059 (1999).
2) Hori, K. and Matsumoto, S.: *Biochem. Eng. J*., **48**, 424 (2010).
3) Krogfelt, K. A. *et al*.: *Infect. Immun*., **58**, 1995 (1990).
4) Giratd, V. and Mourez, M.: *Res. Microbiol*., **157**, 407 (2006).
5) Thanassi, D. G. *et al*.: *Mol. Membr. Biol*., **22**, 63 (2005).
6) Linke, D. *et al*.: *Trends Microbiol*., **14**, 264 (2006).
7) Hoiczyk, E. *et al*.: *EMBO J*., **19**, 5989 (2000).
8) Roggenkamp, A. *et al*.: *J. Bacteriol*., **185**, 3735 (2003).
9) Merz, A. J. and Forest, K. T.: *Curr. Biol*., **12**, R297 (2002).
10) Tsang, P. H. *et al*.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5764 (2006).
11) Kachlany, S. C. *et al*.: *Mol. Microbiol*., **40**, 542 (2001).
12) Hori, K. *et al*.: *J. Chem. Eng. Japan*, **34**, 1120 (2001).
13) Ishii, S. *et al*.: *Appl. Environ. Microbiol*., **70**, 5026 (2004).
14) 樋口愛介ら：医学生物学電子顕微鏡技術学会会誌，**23**, 9 (2009).
15) Hori, K. *et al*.: *J. Biosci. Bioeng*., **111**, 31 (2011).
16) Ishii, S. *et al*.: *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **70**, 2635 (2006).
17) Holland, H. L.: *Curr. Opin. Chem. Biol*., **2**, 77 (1998).
18) De Carvalho, C. C. C. R.: *Biotechnol. Adv*., **29**, 75 (2011).
19) Cassidy, M. *et al*.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., **16**, 79 (1996).
20) Carballeira, J. D. *et al*.: *Biotechnol. Adv*., **27**, 686 (2009).
21) Abdel-El-Haleem, D.: *African J. Biotechnol*., **2**, 71 (2003).
22) Barbe, V. *et al*.: *Nucleic Acids Res*., **32**, 5766 (2004).
23) Kok, R. G. *et al*.: *J. Gen. Microbiol*., **139**, 2329 (1993).
24) Doukyu, N. *et al*.: *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **58**, 543 (2002).
25) Hori, K. *et al*.: *Appl. Environ. Microbiol*., **74**, 2511 (2008).
26) Hori, K. *et al*.: *J. Biosci. Bioeng*., **107**, 250 (2009).
27) Watanabe, H. *et al*.: *J. Biosci. Bioeng*., **106**, 226 (2008).