

## 細胞表層タンパク質の合成生物学

石川 聖人<sup>1</sup>・堀 克敏<sup>2</sup>

## はじめに

細胞膜は生命維持に必要な要素を閉じ込め、自己と他者を分け隔てる器である。また、膜内部には高エネルギー物質から電子を取り出し、ATP生産を行う電気/化学エネルギー変換装置が埋め込まれ、エネルギー獲得の場としても機能する。外部からエネルギーを獲得し、それを基に複製を行った“自己”組織膜が、原始生命の形であったであろう。これと併せて、“他者”との相互作用も生命維持には重要である。単細胞微生物であっても異種微生物とコミュニティを形成し、時には宿主動物とも相互作用しながら合理的な共生関係を築いている。このような他者との接触においては、自己と他者のインターフェイスである細胞表層が関与している。この細胞表層にはタンパク質や糖鎖が存在し、他者との相互作用に重要な働きを担っている。ゆえに、細胞表層を自在にデザインできるようになれば、微生物の活動の多くを操ることができるようになることも期待される。本稿では、筆者らが行っている接着性ナノファイバータンパク質AtaAを用いた人工高付着性被毛微生物に関する研究について紹介する。

## AtaAを用いた人工高付着性微生物の創成

筆者らが独自に発見したAtaAはグラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5の細胞表層に長さ約260 nmのナノファイバーを形成し、細胞に高付着性・凝集性をもたらす<sup>1,2)</sup> (図1)。付着対象としては材質を選ばず、コラーゲンのような生体分子からプラスチックや金属な

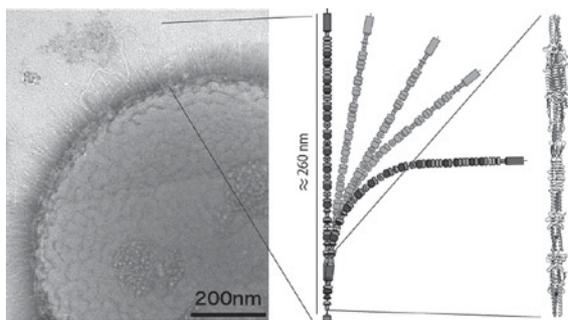


図1. AtaAが細胞表層に形成するナノファイバー

どの非生体材料にまでも及ぶ。このような高付着性微生物は容易に担体へ固定できることから、効率的なバイオプロセスが設計可能となる。元来付着性を持たない *Acinetobacter* 属細菌 ADP1 株と ST-550 株に、*ataA* 遺伝子を導入することで、細胞表層に AtaA ファイバーを生やすし、高付着性・凝集性を付与することができる<sup>1,3)</sup>。さらに、これらの人工 AtaA 被毛微生物はポリウレタン製の発泡体へ高効率に固定化でき、そのまま物質変換反応に供することができる<sup>3,4)</sup>。細胞表層のナノファイバータンパク質は病原性細菌の宿主感染を媒介することから、病原因子の一つ、いわば“悪者”として認識されてきた。その一方で、筆者らは非病原性微生物由来でかつ、高付着性・凝集性を異種細菌に付与できる AtaA は、バイオプロセスに有用な高付着性被毛微生物を創り出す“分子ツール”であると位置付け、新たな微生物固定化法を世界に先駆けて提案してきた。しかしながら、現状では *ataA* 遺伝子を導入しても、一部の限られた微生物しか AtaA ファイバーを効率的に生やすことはできず、高付着性・凝集性を付与できていない。これを打破するには、グラム陰性細菌の表層タンパク質分泌機構について鑑みる必要がある。

## グラム陰性細菌の外膜タンパク質分泌

グラム陰性細菌は外膜と内膜の二つの脂質二重膜を有しており、エネルギー変換に関わる電子伝達系は内膜に、外界との相互作用に関わる構造タンパク質は外膜にそれぞれ配置されている。この明確な膜の役割分担がグラム陰性細菌にとってどれほど合理的であるか定かではないが、細胞内で合成されたタンパク質は外膜まで運ばれる必要がある。この仕事にはエネルギーが要求される。エネルギー変換に係る装置は内膜に局在するため、表層タンパク質の外膜挿入や表層提示はATPの加水分解で生じるエネルギーと共役することができない。そのため、外膜へのタンパク質輸送はフォールディングによる自由エネルギーが主な駆動力となり、それを補助するシャペロンタンパク質がペリプラズム内にはいくつも存在している。現在、グラム陰性細菌の外膜タンパク質分泌機構はタイプIからVIまで報告されている<sup>5)</sup>。もっともシンプルなシステムとされるタイプV経路は別名、オートト

ランスポーター経路と呼ばれ、発見当初は他のシャペロンタンパク質の介在を受けず、単独で自己分泌すると考えられていた<sup>6)</sup> (図2)。ところが、この十年あまりの間、 $\beta$ -barrel assembly (Bam) complexの関与や、フォールディングを補助するペリプラズムシャペロンの存在が相次いで明らかとなり、当初の自己分泌モデルは大幅に修正された<sup>7-9)</sup>。未だ表層提示機構については多くの議論があり、もっともシンプルな分泌経路さえも完全には理解されていない。

### AtaAとタンパク質複合体を形成するペリプラズムタンパク質 TpgA

タイプV経路はさらに五つのサブファミリーに分類できる(図3)<sup>9)</sup>。これらの共通点は、ベータバレル構造の

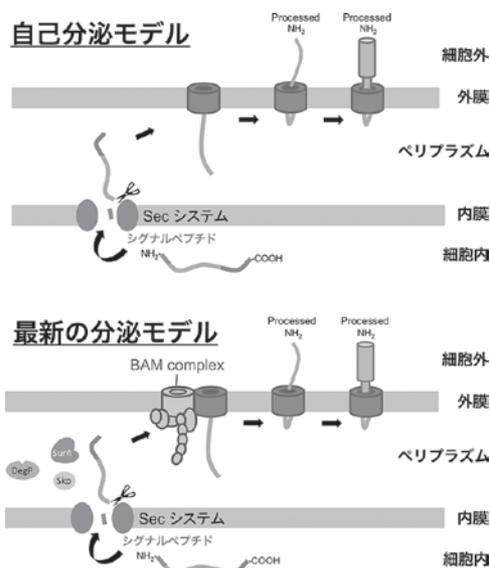


図2. タイプV分泌におけるタンパク質分泌機構

膜結合ドメインを有し、他のタンパク質とヘテロ複合体を作ることなく、単独で外膜に局在していることである。筆者らが扱っているAtaAは、その配列相同性からタイプVcの三量体型オートトランスポーターアドヘシン(TAA)ファミリーに属する。タイプVc経路における分泌メカニズムは、もっとも研究されているタイプVaと概ね同じであるとされているが、その研究報告はあまり多くなく、よくわかっていない。

筆者らが発見した*ataA*遺伝子のすぐ下流に存在し、共にオペロンを構成する遺伝子は、Bam complexの構成因子であるBamEと、ペプチドグリカン結合タンパク質であるPalに一部相同性を示すタンパク質をコードする。筆者らはこのタンパク質をTpgA (TAA and peptidoglycan associated protein A) と名付け、細胞分画分析、プルダウンアッセイ、*in vivo*ペプチドグリカン結合試験などにより、タンパク質としての特徴を調べた<sup>10)</sup>。その結果、TpgAはペリプラズム空間に局在する単量体タンパク質であるが、驚くことに*in vivo*ではAtaA、およびペプチドグリカンに結合して複合体を形成していることがわ

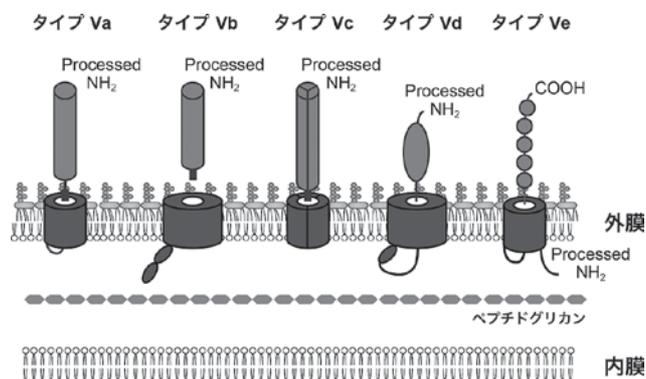


図3. タイプV経路の五つのサブファミリー

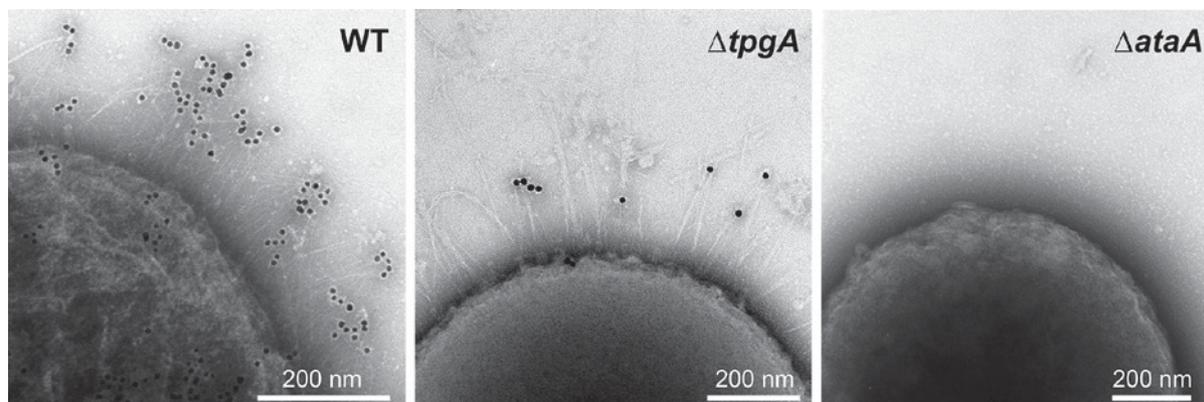


図4. TpgAがAtaAファイバーの表層提示に与える影響。抗AtaA抗体を一次抗体、金コロイド結合抗体を二次抗体として免疫染色した細胞の電子顕微鏡写真。WT, Tol 5野生株;  $\Delta tpgA$ , *tpgA*欠損株;  $\Delta ataA$ , *ataA*欠損株。

かった。さらに、*tpgA* 遺伝子の欠損株は野生株と比べて付着性が有意に低下していた。フローサイトメトリー分析や、免疫蛍光顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察を実施したところ、*tpgA* 欠損による付着性低下は AtaA ファイバーの表層提示量の低下に起因することがわかった (図4)。詳細な分子機構は不明であるが、TpgA は AtaA の細胞表層提示を補助する因子である。配列相同性解析を実施したところ、TpgA はグラム陰性細菌に広く保存されていることがわかった。興味深いことに、いくつかのグラム陰性細菌では、Tol 5 株と同様に TAA をコードする遺伝子と *tpgA* 遺伝子が連続し、カセットとなって保存されている。これは TAA-TpgA のようなタンパク質複合体が他のグラム陰性細菌にも存在し、TpgA が TAA タンパク質の表層提示過程において普遍的な役割を担っていることを示唆している。上述したように、TAA ファミリータンパク質を含むタイプ V 経路はヘテロ複合体を形成することなく、単独で外膜に局在することが一つのコンセンサスであった。したがって、TpgA の発見は、タイプ V 分泌経路にさらなる修正を迫る、もしくは分泌経路の新しいバリエーションを提案するものである。

### おわりに

表層タンパク質の分泌には、もっともシンプルなタイプ V 分泌経路でさえ、複数の輸送因子が必要である。ゆえに、思い通りにタンパク質を微生物表層に提示し、自己と他者の相互作用を操ることは容易ではない。それではなぜ、ADP1 株や ST-550 株は *ataA* 遺伝子の単独導入だけで、AtaA ファイバーを効率的に生やすことができたのであろうか。おそらく、ADP1 株や ST-550 株に元来備わっている表層タンパク質の輸送機構に AtaA が“相乗り”しているからであろう。実際、ADP1 株には TpgA のホモログが保存されている<sup>10)</sup>。しかし、*ataA-tpgA* 遺伝子カセットを大腸菌に導入しても、AtaA 発毛にはわ

ずかな改善しか認められなかった。TpgA は AtaA 発毛に不可欠な因子ではあるが、大腸菌に効率良く AtaA ファイバーを生やすには他の補助因子も必要なのであろう。AtaA ファイバーを細胞表層に生やして高付着性を付与する試みは、単なるタンパク質の異種発現のように容易ではなく、外膜タンパク質分泌システムの総導入が必要であることを示唆している。そして、そのためにはタイプ V 分泌経路のさらなる理解が必要となる。

合成生物学分野では、代謝回路や遺伝子ネットワークを設計導入することで、思い通りの物質生産を行う微生物を創る研究が盛んに行われている。表層タンパク質 AtaA の分泌経路に関わる因子を同定、導入することで高付着性被毛微生物を創るという試みは、細胞表層構造の再構築、いわば表層タンパク質の合成生物学と捉えることができる。また、本来は存在しない生物（もしくは細胞）を人工的に創り出すことだけでなく、生物システムを創りながら理解することも合成生物学の一つの目的である<sup>11)</sup>。高付着性被毛微生物の創成はバイオプロセス効率化へ実学的に寄与し、明らかとなる AtaA 分泌に関わる因子はグラム陰性細菌の表層タンパク質分泌経路に重要な学術的知見をもたらす。

### 文 献

- 1) Ishikawa, M. *et al.*: *PLoS ONE*, **7**, e48830 (2012).
- 2) Koiwai, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **291**, 3705 (2016).
- 3) Ishikawa, M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 16 (2014).
- 4) Hori, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 5025 (2015).
- 5) Costa, T. R. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 343 (2015).
- 6) Girad, V. and Mourez, M.: *Res. Microbiol.*, **157**, 407 (2006).
- 7) Leyton, D. L. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 213 (2012).
- 8) Pavlova, O. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 938 (2013).
- 9) Bernstein, H. D. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **97**, 205 (2015).
- 10) Ishikawa, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **101**, 394 (2016).
- 11) 竹内 昌治ら: 実験医学, **7**, 18 (2011).