

接着性人工細胞触媒のボトムアップ創製

石川 聖人^{1*}・堀 克敏²

はじめに

近年、化学物質、生体分子、マイクロデバイスなどを組み合わせて、一部の細胞機能をボトムアップで再現しようとする試みが世界的に活発化している。これはボトムアップ合成生物学 (Bottom-up Synthetic Biology) と呼ばれ、細胞機能を創って・調べて・理解する合成生物学の1分野である¹⁾。解析対象とする生物機能がきわめて複雑である場合、構成する要素を分解・分離して調べる従来のトップダウンアプローチでは太刀打ちできないことがある。一方、ボトムアップアプローチでは、研究者自らが定義した材料を用いることで実験系をシンプルにできる。そのため、ボトムアップ合成生物学は複雑過ぎて解釈困難な生物機能を理解するためのアプローチとして重要視されている。

人工細胞の創製はボトムアップ合成生物学の中心的課題である。ここで言う人工細胞とは、さまざまな化合物や生体システムを収容するにより、生物機能の一部を再現した膜小胞を指す。人工細胞をボトムアップで創ることで、予期せぬ結果が得られ、新たな生物学的洞察が生まれることや、新しい生物学技術の開発につながることもある。これまでさまざまな細胞機能を再現した人工細胞が創製されてきたが、細胞表層の機能を再現した報告はきわめて少ない。細菌の細胞表層の機能を再現した人工細胞の研究については、その重要性に反してまったく報告がなかった。

接着ナノファイバータンパク質AtaA

接着ナノファイバータンパク質AtaAは、筆者らが高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5より発見した新奇の接着タンパク質である²⁾。配列類似性から三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) ファミリーに分類されるが、構成するアミノ酸残基数は3,630と非常に多く、ドメイン構造に特徴がある。何より、その接着性がユニークである。他のTAAのほとんどは、宿主細胞上の細胞外マトリックスタンパク質などの生体分子に特異的な接着性を示すのに対し、AtaAは疎水性プラスチック、親水性ガラス、金属など、さまざまな材料でできた非生物表面にも接着することができる。さらに、AtaA

が媒介する接着性は、もっともよく研究されているTAAであるYadAが媒介するものよりもはるかに高い。このようなAtaAの接着特性により、AtaAファイバーに覆われた細菌細胞は、さまざまな材質の固体表面に容易に固定化できる³⁾。任意の担体に固定化された細菌細胞は全細胞触媒として利用可能なため、触媒の繰り返し使用、連続反応系の構築、気相微生物反応⁴⁻⁵⁾といった効果的なバイオプロセスを構築することができる。筆者らはこれまで、細菌細胞にAtaAファイバーを生やして固定化微生物触媒とする研究を広く行ってきた^{3,6-7)}。一方、本稿では、細菌細胞サイズのリポソーム、すなわち、人工細菌細胞にAtaAファイバーを生やしたボトムアップ合成生物学研究⁸⁾について概説する (図1)。

AtaAファイバーの大腸菌細胞内生産

天然の細菌細胞は、タンパク質を細胞表層に局在・機能させるために、タンパク質の分泌とアッセムリーを仲介する輸送装置を有している⁹⁾。しかし、このような複雑な分子機構を人工細胞に組み込み、完全に再現することは達成されていない。実際に筆者らも、リポソーム内でセルフリー合成したAtaAタンパク質をリポソームの表層に局在させようとしたが、うまくいかなかった。そこで、AtaAファイバーを分子部品として分離精製し、リポソームの表層に融合させることで、細菌の細胞表層構造を模倣した人工細胞を創ることに取り組んだ (図1)。以前の研究で、AtaAファイバーを生やした細菌から、プロテアーゼ処理によって刈り取る方法を開発したが¹⁰⁾、大量のAtaAファイバーを得ようとするプロテアーゼ

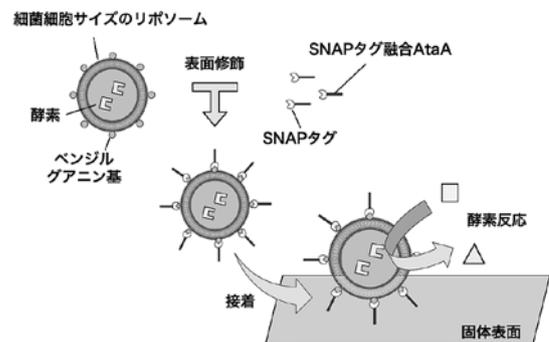


図1. 接着性人工細胞のボトムアップ創製概念図

の費用がかさむ。将来の生物工学利用を見越して考えると、他の機能性タンパク質の生産に利用されるような大腸菌発現系で大量生産できることが望ましい。しかし、AtaAは膜貫通(TM)部位を有していること、300 kDaを越える高分子量のタンパク質であることから、大腸菌発現系での生産は困難が予想された。一般に、膜タンパク質の大腸菌発現は不溶化しやすく発現量が低い。60 kDaを越える分子量のタンパク質は発現が困難であることが知られている¹¹⁾。筆者らは、AtaAを大腸菌発現系で生産できるようにするために、TM部位と、接着機能に関わらない部位を削除することにした。ただし、単に膜貫通部位を除去してしまうと、リボソームの表層にAtaAを埋め込むことはできなくなる。そこで、AtaAのC末端側のTM部位の代わりにSNAPタグを融合することにした(図2)。SNAPタグは約20 kDaのタンパク質で、基質であるベンジルグアニン(BG)と共有結合を形成する^{12,13)}。そのため、BG誘導体で修飾された脂質でリボソームを作れば、リボソームの表層にSNAPタグ融合AtaAを提示させることができると考えた。TM部位に加え、以前の研究¹⁴⁾でAtaAの接着機能に必須でないことが明らかになったChead、Cstalkドメインを含むAtaA₂₉₀₄₋₃₆₃₀領域を除去した。代わりに、AtaAの組

換えタンパク質の三量体構造を安定化させるGCN4アダプターを連結し、SNAPタグと融合させた。さらに、細胞質内での発現を可能とするために、ペリプラズム空間への移行シグナルであるAtaA₁₋₅₈(シグナルペプチド, SP)を除去した。このNheadとNstalkドメインから構成されるSNAPタグ融合タンパク質をNhNs-AtaA-SNAPと呼称する。

天然のAtaAから分子量を50 kDaほど減量することはできたものの、巨大タンパク質であることに変わりはない。三量体を形成すると900 kDa以上にも及ぶため大腸菌発現系でのタンパク質生産に不安はあった。ところが、実際に発現条件を検討してみると、非常に多くのNhNs-AtaA-SNAPを大腸菌破碎液の可溶性画分に得ることができた。タンパク質の二次構造や会合状態を調べるために、生産されたNhNs-AtaA-SNAPを精製し、円偏光二色性(CD)スペクトルや動的光散乱(DLS)解析を行った。NhNs-AtaA-SNAPのCDスペクトルは、細胞表層から切り離して精製したAtaA¹⁰⁾と類似の形状を示し、AtaA特有の二次構造を形成していることを示した(図3A)。このスペクトルは、NhNs-AtaA-SNAPに熱処理を施すと、ランダムコイル構造を含む形状に変化した。DLS解析で測定された散乱強度から、精製したNhNs-AtaA-SNAP

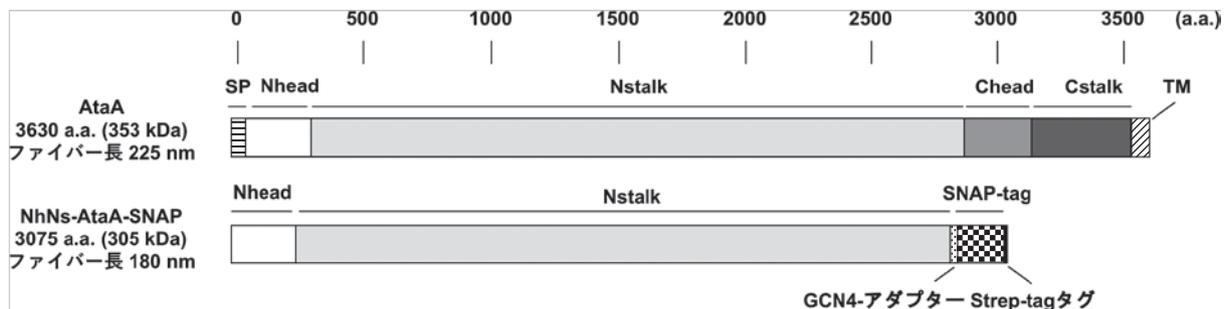


図2. 天然のAtaAとNhNs-AtaA-SNAPの模式図

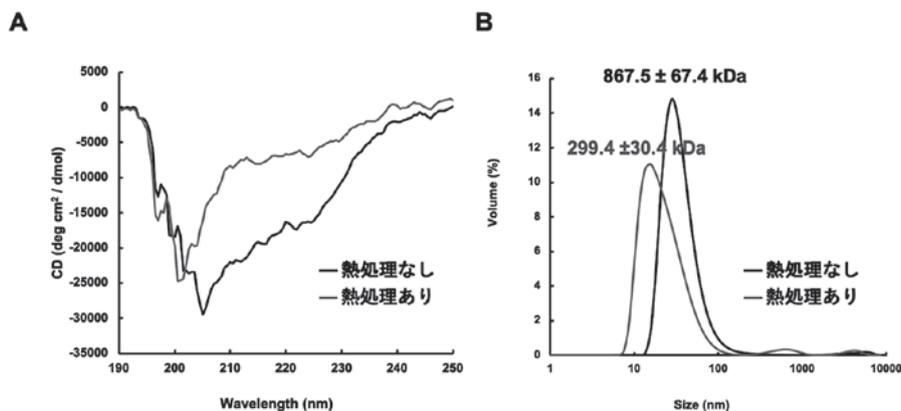


図3. 精製NhNs-AtaA-SNAPの(A) CDスペクトル解析および(B) DLS解析

の分子質量は約867.5 kDaと見積もられ、3量体の計算値 ($305 \text{ kDa} \times 3$) と概ね一致した (図3B)。熱処理を施すと、ピークはシフトして分子量は約299.4 kDaと見積もられ、NhNs-AtaA-SNAPの単量体の分子量 (305 kDa) と概ね一致した。以上、大腸菌細胞質内でAtaAの組換えタンパク質を生産することはチャレンジングな試みではあったが、精製タンパク質を用いたこれらの解析により、得られたNhNs-AtaA-SNAPは適切なフォールディングで三量体構造の複合体を形成していることを確認した。

AtaA ファイバーで修飾した細菌サイズリポソーム

適切なフォールディングで三量体を形成するSNAPタグ融合AtaAを得ることができたので、細菌細胞サイズのリポソームをこれで装飾することを試みた。BG誘導体で修飾した1,2-ジステアロイル-SN-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンと卵黄ホスファチジルコリンを用いて細菌サイズのリポソームを調製し、これをNhNs-AtaA-SNAPを生産する大腸菌の細胞破砕液と混合した。この細菌サイズリポソームは遠心分離することができるため、NhNs-AtaA-SNAPで装飾されたリポソーム

は沈殿物として回収できる。NhNs-AtaA-SNAPがリポソーム上にナノファイバー構造を形成しているかどうかを調べるために、回収したリポソームのサイズ分布をDLSで解析した。ちなみに、細菌細胞 (Tol 5とその $\Delta ataA$ 変異体) の場合、DLSによるサイズ分布は、AtaAファイバーの存在と非存在の間で明確な違いを示す (図4A)。Tol 5細胞の支配的なサイズは $\Delta ataA$ 細胞のサイズよりも約440 nm大きく、この差は、天然のAtaAファイバーの長さ ($225 \text{ nm} \times 2$) から予測されるサイズとほぼ一致する。リポソーム上のNhNs-AtaAがファイバー構造を有しているのであれば、細菌細胞の時と同様に、AtaAファイバーの有無によってサイズ分布に違いがあるはずである。BG基修飾脂質を用いて作製したリポソームのサイズ分布のピークは825 nmであるが、これをNhNs-AtaA-SNAPを含む大腸菌破砕液で処理した場合、825 nmのピークは1281 nmにシフトした (図4B)。この差は、NhNs-AtaAファイバーの長さ ($180 \text{ nm} \times 2$) から予測されるサイズとほぼ一致する。このようなピークシフトは、NhNs-AtaA-SNAPを含まない細胞溶解液で処理した場合は生じない。さらに、NhNs-AtaA-SNAPを含む大腸菌破砕液で処理したリポ

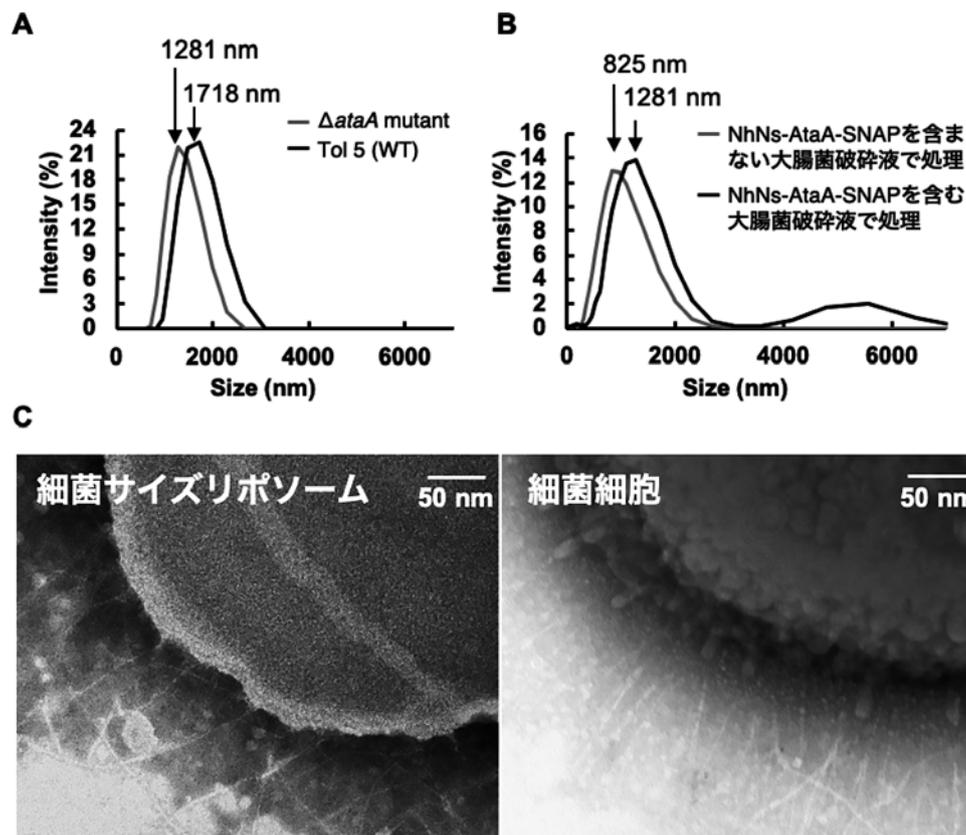


図4. 細胞サイズリポソーム上のNhNs-AtaAファイバーの解析。(A) DLS解析による *Acinetobacter* sp. Tol 5とその $ataA$ 欠損変異株の細胞サイズ分布。(B) 大腸菌細胞破砕液で処理したBG基修飾リポソームのサイズ分布。(C) NhNs-AtaA-SNAPを含む大腸菌細胞破砕液で処理したBG基修飾リポソームとAtaAファイバーを提示したTol 5細胞のTEM画像。

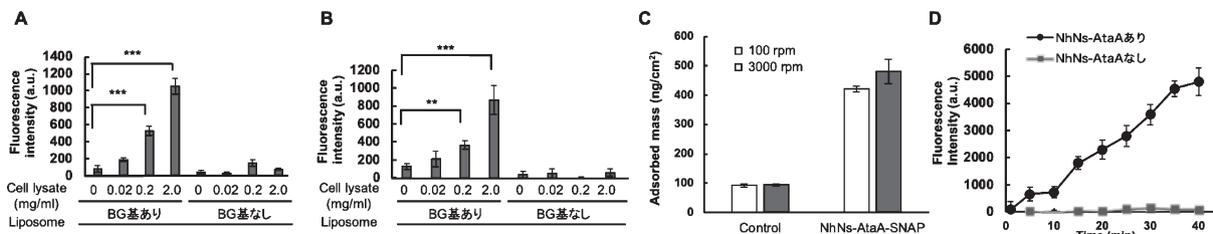


図5. NhNs-AtaA 修飾リポソームの接着性と酵素反応. (A) ポリスチレン表面と (B) ガラス表面プレートを用いた付着性評価試験. (C) QCMによる付着したリポソームの定量. (D) リポソームに内包された酵素による加水分解反応.

ソームの表面を透過型電子顕微鏡 (TEM) で直接観察したところ, AtaA ファイバーを生やした細菌とそっくりの毛むくじゃらのリポソームが観察された (図4C). DLSの結果とTEM像は, BG基修飾リポソームがNhNs-AtaAファイバーで装飾されていることを示し, 細菌の細胞表面構造を部分的に模倣した人工細胞を作製することに成功したことを実証した.

何にでもくっつく人工細胞触媒

NhNs-AtaA ファイバーで装飾した細菌サイズリポソームも, Tol 5細胞のような接着特性を有していることを, 性質の異なる表面を有する2種類の96ウェルプレートを用いて評価した. リポソームには蛍光色素Alexa Fluor 647を内包してあるため, プレート表面に付着したリポソームは蛍光を測定することで評価できる. 図5A, Bに示すように, 細菌サイズリポソーム表層にBG基修飾がある場合, どちらのプレートからも有意な蛍光シグナルが検出され, NhNs-AtaA ファイバーの装飾に用いた大腸菌細胞破碎液のタンパク質濃度が増加するに伴って, その蛍光強度が増加した. 一方, BG基修飾がないと同じ細胞溶解液で処理しても, 蛍光強度の増加は検出されなかった. 加えて, 水晶振動子マイクロバランス (QCM) 解析により, 付着したリポソームを定量的に評価することにも取り組んだ. QCMは, 周波数の変化からセンサーチップ上に付着した分子の質量を測定することができる. 流量条件を変えながら, センサーチップ (金コート電極) 上に付着したリポソームの量を測定したところ, NhNs-AtaAファイバーで装飾されたリポソームの付着質量は, コントロールのリポソーム (BG基修飾脂質なし) の付着質量の4倍であった (図5C). また, 流量条件の変化は, BGリポソームの付着質量にはほとんど影響を与えなかった. 以上の付着性評価試験から, NhNs-AtaAファイバーで装飾されたリポソームは, ポリスチレン (PS), ガラス, 金属と物性の異なる表面に付着することができ, 何にでも接着できるAtaAファイ

バーの性質を継承していることが示された.

さらに, 構築した人工細胞が付着した固体表面上で酵素反応を触媒できるか検討した. モデル酵素として, β -グルクロニダーゼ (GUS) をBG基のあるリポソームに内包した. NhNs-AtaA-SNAPを含む大腸菌細胞溶解液で処理し, PSプレートのウェルに入れて上述の付着性評価手順に従ってプレート表面に付着させた. その後, 酵素反応をモニターするために, 加水分解後のみ蛍光を発するGUSの膜透過性基質 (TokyoGreen- β GlcU) を添加したところ, NhNs-AtaAファイバーで装飾されたリポソームを付着させたウェルからは, 有意な蛍光強度の増加が検出された (図5D). この結果は, 構築した毛むくじゃらの人工細胞は固体表面に付着したまま酵素反応を触媒することができ, 固定化微生物触媒のように扱うことができることを示している.

おわりに

筆者らは, 高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5の接着タンパク質AtaAを用い, 細菌の細胞表層構造を再現した人工細胞の創製に成功した. これを実現できた要因は, (1) 通常細胞表層タンパク質は細胞膜で発現させる, (2) 大腸菌発現系での巨大タンパク質の生産は困難, という2つのパラダイムに挑戦したことが大きい. 「毛むくじゃらのリポソームを創ってみたい」という研究者の純粋な知的好奇心がこれらに立ち向かうモチベーションとなった. 得られた人工細胞は筆者らの自己満足に終わることなく, 細胞表層機能の解析や生物学利用に新たな洞察と指針を与えると考える. 構築した人工細胞の表層にはAtaA以外の生体分子は存在しないため, 実際の細菌細胞を用いた解析よりもAtaAの機能を詳細に調べることができる. 本稿で解説した細胞表層構造を再現する人工細胞の創製方法は, 他のタンパク質にも適用できるため, 接着・認識・取り込みなどの細胞表層構造に関わる生命現象の理解が深まると期待される. 加えて, 創製した人工細胞は接着したまま内包する酵素によって化

学反応を触媒することができた。このことは、接着性人工細胞触媒としての生物学利用を期待させる。人工細胞は自己複製しないので、遺伝子組換え生物の使用が制限される開放環境でも使用できることが接着性人工細胞触媒の強みである。触媒としての頑強性や性能は実細胞と比べて未だはるかに劣るが、所謂、破壊的なイノベーションはこれまで利用されていなかったもの、これまでにない発想から生まれるものである。ボトムアップで創製した毛むくじゃらのリポソーム(接着性人工細胞触媒)は、筆者らにそんな大きな期待を与えてくれる。

謝 辞

本稿に記載した成果は、東京工業大学の松浦友亮先生、北陸先端科学技術大学院大学の芳坂貴弘先生、渡邊貴嘉先生との共同研究によるものであり、大阪大学の植田淳子博士、名

古屋大学の吉本将悟博士、野場考策氏、澤田和秀氏の協力により進められました。ここに厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Good, M. *et al.*: *Nature*, **563**, 188 (2018).
- 2) Ishikawa, M. *et al.*: *PLoS One*, **7**, e48840 (2012).
- 3) Hori, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 5025 (2015).
- 4) Chen, Y. Y. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **154**, 107441 (2020).
- 5) Usami, A. *et al.*: *Green Chem.*, **22**, 1258 (2020).
- 6) Ishikawa, M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 16 (2014).
- 7) Nakatani, H. *et al.*: *Catalysts*, **8**, 159 (2018).
- 8) Noba, K. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 19058 (2019).
- 9) Costa, T. R. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 343 (2015).
- 10) Yoshimoto, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 28020 (2016).
- 11) Rosan, G. L. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **5**, 172 (2014).
- 12) Keppler, A. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 86 (2013).
- 13) Gautier, A. *et al.*: *Chem. Biol.*, **15**, 128 (2008).
- 14) Koivai, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **291**, 3703 (2016).