

産業上有用な大腸菌の迅速簡便な固定化技術を開発 ～バイオプロセスによるものづくりを加速～

【本研究のポイント】

- ・細菌の強力な接着蛋白質 AtaA^{注1)}を、機能を維持したまま小型化することに成功。
- ・小型化 AtaA を生やした大腸菌を担体と混合するだけで、菌体を担体に迅速固定。
- ・外来蛋白質の AtaA を生やしても、大腸菌の増殖や酵素活性は低下しないことを確認。
- ・カゼイン加水分解物により可逆的に菌と担体を分離可能で、世界唯一の反復着脱可能な微生物固定化技術。担体も微生物も再使用可能。
- ・大腸菌以外にも他の多くの細菌に幅広く適用可能な技術である。
- ・バイオプロセスによるものづくりを加速し、カーボンニュートラルの実現に貢献することが期待される。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科の堀 克敏 教授、吉本 将悟 助教らの研究グループは、マックスプランク研究所^{注2)}(ドイツ)のアンドレイルパス教授、オスロ大学(ノルウェー)のディルク リンケ教授らとの共同研究で、薬や化成品の生産に使用され、産業上有用な微生物である大腸菌を迅速簡便に担体に固定化^{注3)}する新手法を開発しました。固定化することで、微生物を反応バッチごとに捨てることなく、連続的に又は繰り返し使えるようになります。また、微生物と生産物の分離が容易になります。従来はゲルに閉じ込めるなどの方法で固定してきましたが、反応効率の深刻な低下を招くなど、実用的ではありませんでした。

新手法では、堀教授らの独自の材料である AtaA と名付けられた接着蛋白質の毛を利用します。堀教授らは AtaA の毛を細菌細胞に生やし、簡便で強力、しかも可逆的な微生物固定化法を開発してきましたが、AtaA 蛋白質が大きすぎて、限られた細菌にしか生やすことはできませんでした。本研究では、AtaA の接着部位を特定し、機能を維持したまま小型化することに成功しました。これにより、小型化 AtaA を大腸菌に生やすことに成功しただけでなく、大腸菌の増殖速度や他の酵素活性の低下も避けることができました。本研究成果は、環境負荷の低いバイオプロセスによるものづくりを加速し、カーボンニュートラルの実現に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2023 年 1 月 9 日付国際学術雑誌「Frontiers in Bioengineering and Biotechnology」に掲載されました。

【研究背景と内容】

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、カーボンニュートラルや持続可能な社会の実現に寄与することが期待されています。用いられる生体触媒としては、精製した単一の酵素だけでなく、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、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です。高価で脆弱な微生物細胞を効率的に利用するため担体への固定化が行われますが、物質移動律速や担体からの細胞の漏出、細胞の生存率や触媒活性への悪影響など様々な課題がありました。

これまでに、堀克敏教授らのグループは、独自に発見した *Acinetobacter* sp. Tol 5^{注4)}由来の接着蛋白質 AtaA を用いた細菌固定化法を開発してきました。この方法では、AtaA をコードする遺伝子を他の有用細菌に導入し、AtaA を生やすことで Tol 5 と同様の接着性を有用細菌に付与し、担体に固定化することができます。しかし、AtaA は 3630 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖が三量体を形成した非常に巨大な蛋白質であるため、異種細菌で AtaA を生やすことは容易ではなく、適用できる細菌種が限られていました。

そこで本研究では、AtaA の接着に関わる領域(ドメイン)を特定し、その知見を基に不必要な領域を欠損させた小型の AtaA (mini-AtaA) を設計しました(図 1)。これまで AtaA を生やすことが難しかった大腸菌で mini-AtaA は効率的に生やすことができ、増殖やその他の酵素の活性も低下しませんでした。mini-AtaA を生やした大腸菌細胞の懸濁液に、多孔性のポリウレタン担体を加えて振とうすると、大腸菌細胞が担体に迅速に固定化され、懸濁液は透明になりました。ポリウレタン担体の表面を光学顕微鏡で観察したところ、多数の大腸菌細胞が固定化されている様子が見られました(図 2)。大腸菌細胞が固定化された担体は繰り返し反応溶液に浸漬することで、酵素反応を複数回行うことができました。さらに、固定化した大腸菌細胞は、カゼイン加水分解物の水溶液で担体から剥離し、元の溶液に懸濁することで再度固定化することもできました。本手法は、世界唯一の反復着脱可能な微生物固定化技術です。

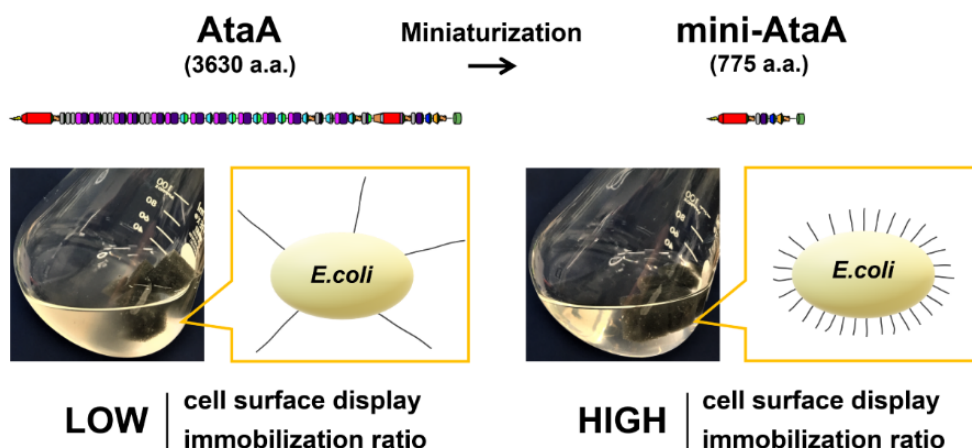


図 1. 本研究の概要図。AtaA を小型化することで大腸菌に生やし担体に固定化することに成功した。

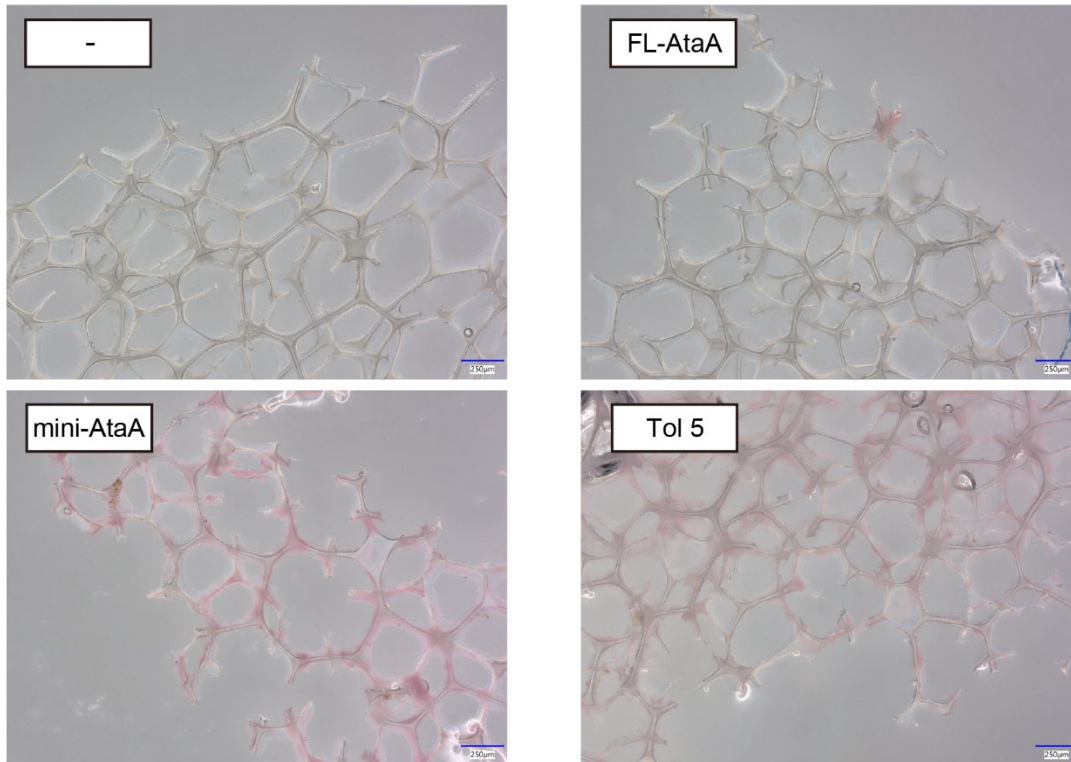


図 2. ポリウレタン担体に固定化された大腸菌細胞の光学顕微鏡写真。mini-AtaA を生やした大腸菌はTol 5と同様に多数の細胞が固定化されていた。 -:AtaAを生やしていない大腸菌、FL-AtaA: AtaAを生やした大腸菌、mini-AtaA:小型化したAtaAを生やした大腸菌、Tol 5:元々AtaAを有しているTol 5株(赤色:染色された細菌細胞)

【成果の意義】

AtaA は非常に巨大な蛋白質であるため、AtaA を用いた固定化はこれまで一部の細菌に限られていましたが、mini-AtaA を用いることで、大腸菌のみならず他の多くの細菌の迅速簡便な固定化が可能になります。本研究で得られた成果は、大腸菌による医薬品や化成品の生産だけでなく、環境負荷の低いバイオプロセスによるものづくりを加速し、カーボンニュートラルの実現にも貢献することが期待されます。

本研究は、科学研究費助成事業(JP17H01345,JP20H00319,JP18K14062)、外国人研究者招へい事業(L22530)、the Research Council of Norway (Grants 331752,286467)の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注 1)AtaA:

堀教授のグループが高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 から発見した接着性ナノファイバー蛋白質。プラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して非常に高い接着性を示す。

注 2) マックスプランク研究所:

ドイツの基礎科学研究を担うマックスプランク学術振興協会傘下の研究所で、多くのノーベル賞学者を輩出してきた世界有数の研究所。

注 3) 固定化:

化学物質やバイオ燃料などを生産したり、有害物質を分解したりする有用な微生物を、担体に固定することで、繰り返しまたは連続的に利用できるようにする技術。従来は、高分子ゲルに微生物細胞を閉じ込めることで固定する方法が主流であったが、反応速度の低下や固定の非効率性などの問題があった。堀教授のグループは、好きな材料で好きな形状に加工した材料表面に、接着蛋白質を使って直接、微生物細胞を固定する新技術を開発し、注目されている。

注 4) *Acinetobacter* sp. Tol 5:

アシネトバクター属細菌 Tol 5 株は、堀教授のグループによりトルエン分解細菌として排ガス処理用のリアクターから単離された細菌。堀教授は、プラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して非常に高い接着性を示すという Tol 5 株のユニークな特徴に注目し、研究を進めてきた。

【論文情報】

雑誌名: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*

論文タイトル: Identification of the adhesive domain of AtaA from *Acinetobacter* sp. Tol 5 and its application in immobilizing *Escherichia coli*

著者: Shogo Yoshimoto¹, Sota Aoki^{1†}, Yuki Ohara^{1†}, Masahito Ishikawa^{1†}, Atsuo Suzuki¹, Dirk Linke², Andrei N. Lupas³, Katsutoshi Hori¹

¹Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, Japan

²Department of Biosciences, University of Oslo, Oslo, Norway

³Department of Protein Evolution, Max Planck Institute for Biology, Tübingen, Germany

† Present address: Masahito Ishikawa, Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Nagahama, Japan

Sota Aoki, Meidensha Corporation, Tokyo, Japan

Yuki Ohara, Friend Microbe Inc., Nagoya, Japan

DOI: 10.3389/fbioe.2022.1095057

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.1095057/full>