

課題番号	GR056
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	バクテリオナノファイバー蛋白質の機能を基盤とする界面微生物プロセスの構築
研究機関・ 部局・職名	名古屋大学・大学院工学研究科・教授
氏名	堀 克敏

1. 当該年度の研究目的

<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>ataA</i>遺伝子導入効率の向上と宿主内での安定的保持のため、接着性ナノファイバーAtaAの機能部位を明らかにし、他種微生物に導入して付着性を発揮させる部位の縮小を図る。 2. 異種微生物での <i>ataA</i> の発現量を増大させる。 3. <i>ataA</i> との同時導入により、他種微生物の付着性をいっそう向上させる可能性があるOmlTについて、AtaAとの相互作用を解析する。 4. 工業用微生物に <i>ataA</i>, <i>omlT</i> 遺伝子を導入し、付着性を付与する。 5. AtaAファイバーを介する微生物と固体表面との物理化学的相互作用についての検討を進め、付着しやすい材質、付着しにくい材質についての知見を得る。 6. AtaA蛋白質の構造解析のため、フラグメントの組換え蛋白質または天然AtaAファイバーを分離精製する。 7. 前年度に引き続き、Hisタグ、Flagタグ、ソルターゼA認識配列といった機能性/標識ペプチドをAtaAファイバー上に提示する。 8. バクテリオナノファイバーの水中AFM計測を行い、水中でのファイバーの形態やファイバーの力学特性などを明らかにする。 9. タイプ1ピリをコードするfimオペロンの下流レギュレーターが、タイプ1ピリ形成の調節機構として機能しているかどうかを明らかにする。 10. 前年度に得られたFil破壊株を用いて、Filファイバー蛋白質の機能と構造を解明する。

2. 研究の実施状況

<ol style="list-style-type: none"> 1. 付着性を維持しながら AtaA を縮小することに成功した。機能部位の完全マッピングと構造解析について、ドイツマックスプランクと共同研究を開始した。 2. 異種微生物での <i>ataA</i> の発現量の増大に成功した。 3. OmlT と AtaA が相互作用することを、免疫沈降等により実証した。また、OmlT は通常のリポ蛋白質のように脂質修飾されることはなく、リポ蛋白質ではない可能性が高まった。 4. 化学品やバイオ燃料などを生産する複数菌に <i>ataA</i> 遺伝子を導入し、付着性を付与することに成功した。方法にもよるが、固定化には OmlT は必須ではないようである。 5. AtaA は何にでも接着する性質を有するが、材料表面の電荷や疎水・親水性によって、接着しやすさや強度が異なることがわかった。また AtaA の接着特性にもとづいて、微生物細胞を不可逆的に脱離させる方法を発明した。
--

6. AtaA の各部位の組換え蛋白質断片の設計、分離精製、構造解析についてマックスプランク研究所と共同研究を開始した。一部結晶が得られた。天然 AtaA ファイバーについては、プロテアーゼ認識部位の導入により細胞表面提示部の分離精製に成功し、接着特性の解析や電顕による構造解析に供している。

7. 各種機能性ペプチドのファイバー上提示に成功した。より大きな蛋白質提示の検討を開始した。

8. AFM による付着力の水中計測の手法を確立した。その結果、AtaA による付着性は一般的な抗原抗体反応の相互作用よりも高いだけでなく、アビジン-ビオチン相互作用を凌ぐ可能性も出てきた。

9. タイプ1ピリの発現制御機構の概要がわかってきた。

10. Fil 蛋白質の機能については、ある条件下で細胞付着とバイオフィーム形成を阻害する働きがあることを証明するに至った。

3. 研究発表等

雑誌論文 計8件	(掲載済み一査読有り) 計3件 1. M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori ; AtaA, a New Member of the Trimeric Autotransporter Adhesins from <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 Mediating High Adhesiveness to Various Abiotic Surfaces, PLoS ONE 7 (2012) : e48830 2. S. Matsutomo, A. Ohtaki, and K. Hori ; Carbon fiber as an excellent support material for wastewater treatment biofilms, <i>Environ. Sci. Technol.</i> 46 (2012), 10175-10181. 3. M. Ishikawa, K. Shigemori, A. Suzuki, and K. Hori ; Evaluation of adhesiveness of <i>Acinetobacter</i> sp.Tol5 to abiotic surfaces, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 113 (2012), 719-725. (掲載済み一査読無し) 計3件 4. 堀 克敏 ; 微生物付着・バイオフィームの制御と応用から界面微生物工学へ; オレオサイエンス 11 , (2012)19-24. 5. 堀 克敏 ; バクテリオナノファイバー蛋白質の機能を基盤とする界面微生物プロセスの構築; 化学工学, 76 , (2012), 4, 212-214 6. 堀 克敏 ; 界面微生物工学によるグリーン・イノベーションを目指して; 化学工業 63 , (2012), 1, 70-74 (未掲載) 計2件 7. M. Ishikawa, K. Hori ; A new simple method for introducing an unmarked mutation into a large gene of non-competent Gram-negative bacteria by FLP/FRT recombination, <i>BMC Microbiology</i> 13 (2013):86 8. H. Liu, M. Ishikawa, S. Matsuda, Y. Kimoto, K. Hori , K. Hashimoto, S. Nakanishi; Extracellular electron transfer of the highly-adhesive and metabolically versatile bacteria <i>Acinetobacter</i> sp. strain Tol 5, <i>ChemPhysChem.</i> accepted
会議発表 計13件	専門家向け 計13件 1. (招待講演) 堀 克敏 ; 水中における微生物の付着・バイオフィーム形成と水処理への応用, 水の先進理工学第 183 委員会, 高山, 2012.11.30-12.1 2. (招待講演) K. Hori ; Wastewater treatment using biofilms, ISAWST-1, Nagoya, 2012.11.11-13 3. (Keynote lecture) K. Hori ; Bacterionanofiber mediating cell adhesion and its application, ISABE2012, Guilin, China, 2012.10.25-29 4. (招待講演) 堀 克敏 ; 界面微生物工学の廃水処理における応用成功事例, 第 28 回日本微生物生態学会大会, 豊橋, 2012.9.22 5. (招待講演) 堀 克敏 ; バクテリオナノファイバーが繋ぐもの, 分子ロボティクス研究会, 名古屋, 2012. 4. 27. 6. S. Yoshimoto, M. Ishikawa, K. Shigemori, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori ; Adhesion profiles of <i>Acinetobacter</i> sp.Tol 5 mediated by nanofiber, ISABE2012, Guilin, China, 2012.10.25-29 7. 吉本将悟、石川聖人、重盛一希、中谷肇、鈴木淳巨、 堀 克敏 ; バクテリオナノファイバー蛋白質 AtaA を介した <i>Acinetobacter</i> sp.Tol 5 の付着特性, 化学工学会第 78 年会, 大阪, 2013.3.17-19 8. 小原優季、石川聖人、吉本将悟、中谷肇、重盛一希、 堀 克敏 ; 接着性ナノファイバー蛋白質 AtaA を用いたグラム陰性細菌の固定化, 化学工学会第 78 年会, 大阪, 2013.3.17-19 9. (自ら企画) 堀 克敏 ; バクテリオナノファイバーの解析と界面微生物工学への展開, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 2012.10.23-26

様式19 別紙1

	<p>10. 重盛一希、石川聖人、堀 克敏; バクテリオナノファイバーAtaA を応用した固定化微生物細胞によるインディゴ生産, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 2012.10.23-26</p> <p>11. 石川聖人, 堀 克敏; 二つの自殺ベクターを用いた長鎖遺伝子断片の切除, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 2012.10.23-26</p> <p>12. 中谷 肇、石川聖人、堀 克敏; バクテリオナノファイバーを介したペプチド表層提示技術、第 11 回微生物研究会、2012.9.22、東京</p> <p>13. 吉本将悟、重盛一希、石川聖人 堀 克敏; ナノファイバーを介した <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 の付着特性、第 11 回微生物研究会、2012.9.22、東京</p> <p>一般向け 計0件</p>
図 書	
計0件	
産業財産権 出願・取得状 況	<p>(取得済み) 計1件</p> <p>(米国) METHOD AND GENE FOR PROVIDING OR ENHANCING NONSPECIFIC ADHESIVE PROPERTY AND/OR AUTOAGGLUTINATING PROPERTY FOR MICROORGANISMS, Katsutoshi Hori inventor), Nagoya Univ. (assignee), WO2009/104281, USA 8,399,240, 2013.3.19. (Issue date of patent)</p> <p>(出願中) 計0件</p>
計1件	
Webページ (URL)	名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻生物機能工学分野環境生物工学グループ堀研 (http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/nubio2/index.html) 研究紹介、研究プロジェクト
国民との科 学・技術対話 の実施状況	バクテリオナノファイバー蛋白質の機能を基盤とする界面微生物プロセスの構築, テクノ・フェア名大 2012 名未来を明日に近づける技術, 名古屋大学豊田講堂, 2012.9.22, 対象:一般市民、企業人、参加者数約 70 名、本研究課題について講演とポスターで発表した。
新聞・一般雑 誌等掲載 計5件	<p>2012. 8. 30. 中日新聞 「炭素繊維の水浄化解明」</p> <p>2012. 9. 5. Yahoo ニュース 「炭素繊維が微生物を集めて水を浄化するメカニズム解明」</p> <p>2012. 11. 16. 朝日新聞 「触媒として産業利用に期待 微生物に「毛」生やす 名大教授蛋白質発見」</p> <p>中日新聞 「大事な微生物離しません 粘着力あるタンパク質発見 名大グループ「医薬品製造の効率向上」」</p> <p>2013. 1. 17. 毎日新聞 「粘着性たんぱく質発見 名大チーム医薬品などに活用」</p>
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	129,000,000	65,720,000	34,720,000	28,560,000	0
間接経費	38,700,000	19,716,000	10,416,000	8,568,000	0
合計	167,700,000	85,436,000	45,136,000	37,128,000	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	14,073,901	34,720,000	0	48,793,901	34,322,503	14,471,398	0
間接経費	5,206,078	10,416,000	0	15,622,078	8,941,410	6,680,668	0
合計	19,279,979	45,136,000	0	64,415,979	43,263,913	21,152,066	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	24,890,235	実験装置、実験試薬、消耗品等
旅費	685,460	研究成果発表旅費(中国、国内)等
謝金・人件費等	7,529,087	プロジェクト研究員人件費
その他	1,217,721	学会参加費、年会費等
直接経費計	34,322,503	
間接経費計	8,941,410	
合計	43,263,913	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
圧力式ホジナイザー	(株)エスエムテ-製 LAB2000 2段式	1	4,000,000	4,000,000	2012/11/29	名古屋大学
粒子径・ゼータ電位・ 分子量測定装置	英国 MalvernInstruments 社製 ゼータサイザー ナノ ZSP ZEN5600	1	8,500,000	8,500,000	2012/12/21	名古屋大学
中型恒温振とう培 養機	TAITEC製 BR- 40LF	1	910,040	910,040	2013/3/25	名古屋大学