

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25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"> <li>1 AtaA の機能部位解析と他の微生物での発現</li> <li>2 AtaA の細胞外輸送機構を利用した表層提示</li> <li>3 バイオプロセスの構築</li> <li>4 AtaA の構造解析</li> <li>5 その他のナノファイバーの分子機能解析</li> </ol>
--

2. 研究の実施状況

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 構造解析の結果や、ドイツの研究グループとの共同研究により提供されたより詳細な AtaA の構造予測に基づき、ファイバー上の構造モチーフを欠損した様々な変異体ファイバーをデザインし、それらをコードする発現コンストラクトを多数作成し AtaA 欠損株に発現させて、その付着凝集や表層提示への影響を明らかにした。また、他種微生物で発現させた AtaA ファイバーを回収しその物性の評価を行った。</li> <li>2. 酵素などの蛋白質の融合例として、EGFPとSNAPタグについて遺伝子レベルで融合し、機能的融合ファイバーを細胞から生やすことに成功した。</li> <li>3 AtaA を発現させた有用物質生産菌をポリウレタン担体に固定化し、これを固定化微生物触媒として用いた繰り返し反応プロセスを行った。色素生産菌を固定化してその有用性を実証したところ、投稿論文が国際学術雑誌でスポットライトされるなど、世界の注目を集めた。特に、毒性基質に対する耐性が向上し、基質濃度を上げられるようになったため、生産性が飛躍的に向上したことが評価された。</li> <li>4 ドイツの研究グループと共同し、AtaA ファイバーを構成する各構造モチーフについて、組換え蛋白質を精製し、各構造モチーフを含む AtaA ファイバーの断片を結晶化した。結晶化した蛋白質は逐次、X線結晶構造解析によって構造決定を行った。その結果、AtaA ファイバーの構造の8割を決定するに至った。</li> <li>5 Fim オペロン上に存在する2つの調節遺伝子を両方または片方欠損させた変異体を作成し、変異体における fimA の発現を定量的 RT-PCR によって確認し、FimA 蛋白質の生産量をウエスタンブロッティングで確認した。</li> </ol>
---

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み－査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. M. Ishikawa, K. Shigemori, <b>K. Hori</b>; Application of the adhesive bacterionanofiber AtaA to a novel microbial immobilization method for the production of indigo as a model chemical, <i>Biotechnol. Bioeng.</i> <b>111</b> (2014) 16-24.</li> <li>2. T. Kubota, O. Koiwai, <b>K. Hori</b>, N. Watanabe, K. Koiwai; TdiF1 recognizes a specific DNA sequence through its helix-turn-helix and AT-hook motifs to regulate gene transcription, <i>PLoS ONE</i> <b>8</b> (2013) e66710.</li> <li>3. H. Liu, M. Ishikawa, S. Matsuda, Y. Kimoto, <b>K. Hori</b>, K. Hashimoto, S. Nakanishi; Extracellular electron transfer of a highly adhesive and metabolically versatile bacterium, <i>ChemPhysChem</i> <b>14</b> (2013) 2407-2412.</li> <li>4. M. Ishikawa, <b>K. Hori</b>; 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> <b>13</b> (2013) 86.</li> </ol> <p>(掲載済み－査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. 松本 慎也、堀 克敏; 炭素繊維が微生物を集めて水を浄化するメカニズム; 繊維機械学会誌66,(2013)29-33</li> </ol> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 40 件</p>	<p>専門家向け 計 38 件 【国際学会】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Y. Ohara, M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; Construction of Novel Bacterial Immobilization Model Using High Adhesive Nanofiber Protein AtaA, Asia Bio-HyLinks2013, Osaka, Japan, 2013.11.22-24.</li> <li>2. N. Ding, K. Shigemori, H. Nakatani, K. Hori; Immobilization of Enterobacter aerogenes by a trimeric autotransporter adhesin, AtaA and its application to bio-hydrogen production, Asia Bio-HyLinks2013, Osaka, Japan, 2013.11.22-24.</li> <li>3. S. Yoshimoto, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori; Reversible bacterial immobilization based on the adhesive property of a novel adhesin from Acinetobacter sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>4. T. Ishikawa, M. Ishikawa, K. Hori; Functional analysis of a novel bacterionanofiber, Fil fimbria, in the highly adhesive bacterium, Acinetobacter sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>5. A. Okano, M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; Functional analysis of Fim gene clusters in a highly adhesive bacterium, Acinetobacter sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>6. M. Nagai, M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; Functional evaluation of the membrane anchor domain-chimera of the highly adhesive protein, AtaA, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>7. Y. Ohara, M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; Construction of novel bacterium immobilization model using high adhesiveness nanofiber protein AtaA, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>8. E. Terada, H. Nakatani, M. Ishikawa, K. Hori; Construction of a reporter gene system for Acinetobacter and measurement of the promoter activity of ataA gene of strain Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>9. M. Ishikawa, K. Izumitani, S. Yoshimoto, K. Hori; Identification and characterization of novel protein interacting with a trimeric autotransporter adhesin, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> <li>10. Y. Miyachi, K. Hori; Analyzing adhesion property of AtaA using atomic force microscopy, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3.</li> <li>11. H. Nakatani, M. Ishikawa, K. Hori; Construction of the functionally hairy bacteria with a novel trimeric autotransporter adhesin from Acinetobacter sp. Tol 5 strain, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</li> </ol>

	<p>12. M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; A new trimeric autotransporter adhesin from <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces, FEMS 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, 2013.7.21-25</p> <p>13. S. Yoshimoto, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori; AtaA, a highly adhesive bacterionanofiber, mediates ionic strength dependent-bacterial adhesion, FEMS 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, 2013.7.21-25</p> <p>14. M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Koiwai, 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, 3rd International Symposium of the SFB 766, Kaufbeuren, Germany, 2013.5.6-8</p> <p><b>【招待講演】</b></p> <p>1. 堀 克敏；細菌固定化蛋白質の構造・機能と応用；C F C &amp; S B J デザイナブルバイオインターフェイスワークショップ，福岡，2014.2.7</p> <p>2. K. Hori; A nanofibrous immobilizing protein for interfacial microbial engineering, Korea-Japan Smart Biodesign Workshop Technology exchange for green biotechnology, Sendai, Japan, 2014.1.21.</p> <p>3. K. Hori; Bacterionanofiber mediating cell adhesion and its application, Asia Bio-HyLinks2013, Osaka, 2013.11.22-24.</p> <p>4. 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，化学工学会第45回秋季大会，岡山，2013.9.16-18（自ら企画）</p> <p>5. K. Hori; AtaA, a new autotransporter adhesin mediating nonspecific, strong adhesion, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3（自ら企画）</p> <p><b>【国内学会】</b></p> <p>1. 蟹江純一，中谷肇，堀 克敏；蛍光ナノファイバーで覆われた被毛微生物細胞の創出；日本化学会第94春季大会（2014），名古屋，2014.3.27-30</p> <p>2. 吉本将悟，中谷肇，Norshariffudin Nur'Izzah，小祝孝太郎，鈴木淳巨，堀 克敏；水晶発振子を用いた高付着性最近由来ナノファイバータンパク質AtaAの接着特性解析；日本化学会第94春季大会（2014），名古屋，2014.3.27-30</p> <p>3. 宮地佑典，堀 克敏；Analyzing the Bacterial Adhesion of the highly adhesive bacterium <i>Acinetobacter</i> sp.Tol5 using Atomic Force Microscopy；日本化学会第94春季大会（2014），名古屋，2014.3.27-30</p> <p>4. 小祝孝太郎，Hartmann Marcus，Norshariffudin Nur'Izzah，三木章弘，吉本将悟，LinkeDirk，Lupas Andrei，堀 克敏；Structural analysis of <i>Acinetobacter</i> species-conserved domains of a highly adhesive bacterionanofiber protein, AtaA；日本化学会第94春季年会（2014），名古屋，2014.3.27-30</p> <p>5. 堀 克敏，石川聖人，中谷肇，吉本将悟，小原優季，蟹江純一；新規バクテリオナノファイバー蛋白質AtaAの構造・機能と応用技術；化学工学会第79年会，岐阜，2014.3.18-20</p> <p>6. 中谷肇，蟹江純一，堀 克敏；機能性周毛を持つ細菌の創出；化学工学会第79年会，岐阜，2014.3.18-20</p> <p>7. 吉本将悟，中谷肇，堀 克敏；ナノファイバー蛋白質AtaAの接着特性に基づく微生物の可逆的固定化法；化学工学会第79年会，岐阜，2014.3.18-20</p> <p>8. 蟹江純一，中谷肇，堀 克敏；蛍光ナノファイバーで覆われた被毛微生物細胞の創出；化学工学会第79年会，岐阜，2014.3.18-20</p> <p>9. 寺田瑛美，中谷肇，石川聖人，堀 克敏；<i>Acinetobacter</i>属用レポーター遺伝子システムの構築とTol 5株の接着遺伝子ataAのプロモーター活性測定；第29回日本微生物生態学会大会，鹿児島，2013.11.23-25</p> <p>10. 石川智也，石川聖人，堀 克敏；高付着性<i>Acinetobacter</i>属細菌Tol 5株の付着とバイオフィルム形成を阻害する新規バクテリオナノファイバーFilピリ；第29回日本微生物生態学会大会，鹿児島，2013.11.23-25</p> <p>11. 岡野葵，石川聖人，中谷肇，堀 克敏；高付着性細菌<i>Acinetobacter</i> sp.Tol 5株のfim遺伝子群の発現解析；第29回日本微生物生態学会大会，鹿児島，2013.11.23-25</p> <p>12. 黒住明大，渡邊哲文，福崎康博，中村安宏，川久保祐貴，堀 克敏；上向流式リアクタで馴養した嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューールの構造解析；第29回日本微生物生態</p>
--	---

様式19 別紙1

	<p>学会大会, 鹿児島, 2013.11.23-25</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>13. 石川智也、石川聖人、堀 克敏; 高付着性細菌Acinetobacter sp.Tol 5株の新規ナノファイバーFilピリの機能解析; 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013.9.27-29</li> <li>14. 吉本将悟、中谷肇、堀 克敏; 微生物由来ナノファイバータンパク質の接着特性解析; 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013.9.27-29</li> <li>15. 小原優季、石川聖人、中谷肇、堀 克敏; 接着性ナノファイバー蛋白質AtaAによる微生物固定化モデルの構築及び応用; 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013.9.27-29</li> <li>16. 岡野葵、石川聖人、中谷肇、堀 克敏; 高付着性細菌Acinetobacter sp.Tol 5株のfim遺伝子群の機能解析; 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013.9.27-29</li> <li>17. 永井美帆、石川聖人、中谷肇、堀 克敏; 高付着性タンパク質AtaAの膜アンカードメイン置換体の機能評価; 第65回日本生物工学会大会, 広島, 2013.9.18-20</li> <li>18. 小原優季、石川聖人、中谷肇、堀 克敏; 接着性ナノファイバー蛋白質AtaAによる新規微生物固定化法の有効性Acinetobacter sp.ADP1株によるエステラーゼ反応をモデルに; 第65回日本生物工学会大会, 広島, 2013.9.18-20</li> <li>19. 吉本将悟、中谷肇、堀 克敏; 接着性細胞表層タンパク質の特性に基づく微生物固定化技術; 化学工学会第45回秋季大会, 岡山, 2013.9.16-18</li> </ol> <p>一般向け 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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, INCHEM TOKYO 2013, 東京, 2013. 10. 30</li> <li>2. 堀 克敏; 微生物に非特異的付着性/凝集性を付与する遺伝子による工業用微生物の固定化技術, 国際医薬品原料・中間体展 2013, 東京, 2013. 4. 26.</li> </ol>
<p>図書 計3件</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 堀 克敏, バイオ水素エネルギー開発の新しい展開をめざして(p2-11), 水素エネルギー研究の基礎(p26-34); 『次世代のバイオ水素エネルギー』 日本化学会編, 化学同人, 2014年</li> <li>2. 丁楠, 中谷肇, 堀 克敏, 暗発酵による水素水産; 『光合成のエネルギー利用と環境応用』シーエムシー出版(p104-111)2014年</li> <li>3. 企画・監修・編集・執筆 堀 克敏 (著者他 15名) 『低コスト・ハイパフォーマンス技術による水処理革命』 コロナ社 2013年 総ページ数:242</li> </ol>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計1件</p>	<p>(取得済み) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 堀 克敏; 微生物に対して非特異的付着性及び/又は凝集性を付与又は増強する方法及び遺伝子, 特許第5261775 (特願2009-554183) 登録日2013.5.10. 特許権者: 名古屋大学</li> </ol> <p>(出願中) 計0件 公開できるものはなし(非公開情報参考)。</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>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 堀研究室 (<a href="http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/nubio2/index.html">http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/nubio2/index.html</a>) 研究紹介、研究プロジェクト</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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, 最先端研究開発支援プログラムFIRSTシンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオ, 東京, 2014.2.28-3.1</li> <li>2. 堀 克敏; 知られざる微生物の世界, 出前授業: 愛知県立西尾高校, 愛知, 2013.12.9. 約40名参加</li> <li>3. 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, テクノ・フェア名大2013 工学が挑む新時代の科学・技術, 名古屋, 2013. 9. 6. 講演聴衆者数: 45名、展示会参加企業: 242社、展示会参加人数: 45名</li> </ol>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	<p>該当なし</p>
<p>その他</p>	<p>該当なし</p>

様式19 別紙1

4. その他特記事項

1. 生物工学論文賞 2013年9月18日
2. Biotech. Bioeng に掲載された論文(リスト1)が同誌でスポットライトされた。

実施状況報告書(平成25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	100,440,000	28,560,000	0	0
間接経費	38,700,000	30,132,000	8,568,000	0	0
合計	167,700,000	130,572,000	37,128,000	0	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	14,471,398	28,560,000	0	43,031,398	43,031,398	0	0
間接経費	6,680,668	8,568,000	0	15,248,668	15,248,668	0	0
合計	21,152,066	37,128,000	0	58,280,066	58,280,066	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	20,973,228	実験装置、実験試薬、消耗品等
旅費	3,043,840	情報収集と研究成果発表等
謝金・人件費等	17,829,312	プロジェクト研究員人件費
その他	1,185,018	学会参加費、機器利用料等
直接経費計	43,031,398	
間接経費計	15,248,668	
合計	58,280,066	

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
微量高速冷却遠心 機	トミー精工製 MX- 307	1	767,550	767,550	2013/9/30	名古屋大学
分子間相互作用定 量QCM装置	イニシム製 AFFINIX Q8 標準	1	6,772,500	6,772,500	2013/10/11	名古屋大学
フローセルUV/VIS 分 光光度計	アジレントテクノロジー 製 Cary60	1	1,407,000	1,407,000	2013/10/11	名古屋大学