

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	129,000,000	129,000,000	0	129,000,000	129,000,000	0	0
間接経費	38,700,000	38,700,000	0	38,700,000	38,700,000	0	0
合計	167,700,000	167,700,000	0	167,700,000	167,700,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	81,740	42,290,513	24,890,235	20,973,228	88,235,716
旅費	38,100	824,020	685,460	3,043,840	4,591,420
謝金・人件費等	0	8,136,399	7,529,087	17,829,312	33,494,798
その他	20,160	255,167	1,217,721	1,185,018	2,678,066
直接経費計	140,000	51,506,099	34,322,503	43,031,398	129,000,000
間接経費計	42,000	14,467,922	8,941,410	15,248,668	38,700,000
合計	182,000	65,974,021	43,263,913	58,280,066	167,700,000

4. 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
原子間力顕微鏡	アサイラムテクノロジー製 MFP-3D-BIO-NH型	1	20,160,000	20,160,000	2011/12/20	名古屋大学
フローサイトメーター	米国BD社製 FACSCanto II 2レーザー4カラータイプ	1	14,280,000	14,280,000	2012/1/31	名古屋大学
マルチラベルリーダー	米国バーキネンルマー社製 ARVO X3システム2030-0030J	1	2,992,500	2,992,500	2012/1/25	名古屋大学
圧力式ホモジナイザー	(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
微量高速冷却遠心機	トニ-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 標準モデル	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 Instrument	1	1,407,000	1,407,000	2013/10/11	名古屋大学

5. 研究成果の概要

新規の接着性バクテリオナノファイバーAtaA蛋白質の構造解析の結果、剛直な部分を可動な節でつないだ竹のように柔軟ながら丈夫な構造をしていることがわかり、バンブーモデルを提唱した。AtaAを利用して、世界で唯一無二の実用的で着脱可能な微生物細胞の固定化法を確立した。また、有用な機能を有するペプチドや蛋白質をAtaAファイバーに融合した機能性毛を、微生物細胞から生やすことに成功した。これはヒトに例えれば、遺伝子工学により直毛の人を天然パーマにしたり、黒髪の人を茶髪にしたりするような画期的な技術である。化学物質や燃料を超効率的に生産できるバイオプロセスを構築するための、基盤技術を構築できた。現在、そのようなバイオプロセスの設計を行っている。

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Research Project on the Construction of Interfacial Microbial Processes Based on the Function of Bacterionanofiber Proteins
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	名古屋大学・大学院工学研究科・教授
	Nagoya University・Graduate School of Engineering・Professor
氏名 (下段英語表記)	堀 克敏
	Katsutoshi Hori

研究成果の概要

(和文):新規に発見した微生物固定化ナノファイバー蛋白質 AtaA を利用して、従来法の欠点を克服した汎用的・迅速・着脱可能な微生物固定化法を、世界で初めて開発した。また、AtaA ナノファイバーに、機能性ペプチドや蛋白質を遺伝子レベルおよびファイバー形成後に融合することにより、機能性の毛で覆われた微生物細胞を作出した。さらに、微生物細胞から生えている天然ファイバーを分離回収する新手法を確立し、分子の生化学的性質や接着特性を明らかにした。原子間力顕微鏡計測により、AtaA の非生物表面に対する接着力は、アビジン-ビオチン相互作用の2倍以上であることがわかった。マルチドメイン巨大蛋白質である AtaA 全長の8割に及ぶ結晶構造を決定することができた。

(英文):By utilizing the immobilizing-nanofiber protein AtaA discovered, a universal, rapid, and reversible immobilization method for microbial cells has been first developed in the world. We have also succeeded in producing functionally hairy bacteria by fusing functional peptides or proteins with AtaA nanofibers in the DNA level or by post-assembly modification. In addition, a new method for the excision and purification of natural AtaA fibers from bacterial cells was established, and the biochemical and adhesion properties of the AtaA molecule were revealed. AFM analysis revealed that adhesion forces of AtaA for abiotic surfaces are two times or more as strong as the avidin-biotin interaction. The crystal structure of about 80% of the full length of the multidomain protein AtaA could be determined.

様式21

1. 執行金額 167,700,000円
(うち、直接経費 129,000,000円、間接経費 38,700,000円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

付着微生物と菌体外ポリマーからなるバイオフィルムの研究は国内外で盛んであるが、微生物が非生物表面に非特異的に付着する分子機構にまで踏み込んだ研究はほとんどない。研究実施者は、驚異的な表面付着性を示す芳香族分解微生物 *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 を分離し、このバクテリアの付着の分子機構を調べてきた。そして、細胞表層上の3種の周毛性ナノファイバーを発見、構成分子を同定した。三量体型オートトランスポーターアドヘシン(TAA)、Fim (タイプ1ピリ)、Fil 蛋白質である。この中で Tol 5 に付着性を与えているのは TAA である。

既報の TAA は病原性グラム陰性細菌の表層に存在する接着蛋白質で、宿主生体分子への特異的接着・感染機能の他、自らを細胞外に輸送し外膜にアンカーリングする自己分泌機能をもつ。ホモ三量体から成り、各ペプチドの長さは 300 から 3000 アミノ酸を超えるものまで多様だが、典型的にはアミノ(N)末端からカルボキシル(C)末端に向かって、頭部、首、柄、外膜結合部という順番に並ぶ。Tol 5 株の TAA (AtaA と命名)は次の点でユニークな新規蛋白質である。

- (1) これまでに知られている TAA 中で最大である(350 kDa)。
- (2) ユニークな一次構造: いくつもの非常に長い繰り返し構造がモザイク状に配置する。N 末端側に加え C 末端側の外膜結合部寄りにも二つ目の頭部が存在する。
- (3) 既報の TAA が全て病原性細菌上に存在して宿主の生体分子に特異的に結合するのに対し、AtaA は特定のレセプターに対してではなく、非生物表面に接着する。
- (4) 種々の固体表面に対する親和性・接着性は極めて高い。

以上の背景をふまえ、研究期間内に下記のことを明らかにし、達成する。

- (1) **微生物固定化技術の開発**: 付着特性を利用して大腸菌などの有用な微生物の固定化技術・バイオプロセスを開発する。
- (2) **機能性被毛微生物の作出(細胞表層提示技術)**: 機能性ペプチドや蛋白質を融合した AtaA ナノファイバーで細胞表面が覆われた機能性被毛微生物を作出し、バイオプロセスに適用する。
- (3) **AtaA の構造・機能説明**: AtaA の機能部位と作用機構、接着力、界面との相互作用、強度・弾性などのファイバーの力学特性を解析し、非特異的ながら高付着性を発揮する分子機構についての知見を得る。
- (4) **他のバクテリオナノファイバーの分子・機能説明**: AtaA 以外のバクテリオナノファイバーの分子、機能についての知見を得る。

4. 研究計画・方法

各項目の計画と方法は次のとおりである。

(1) **微生物固定化技術の開発**

①有用なグラム陰性細菌である *Acinetobacter* 属細菌や大腸菌へ *ataA* 遺伝子を導入し、細胞内で発現させて付着性を付与する。②この分子育種により得られた付着性組換え微生物を担体に固定化し、これを生体触媒とするバイオプロセスを構築する。③また、新たに見つかった *AtaA* の付着機能を補佐する蛋白質の機能を解明するとともに、微生物の付着性のさらなる向上に利用する。④宿主細胞中でのファイバー蛋白質発現の安定化についても検討する。⑤さらに、*AtaA* による付着を利用した固定化技術を、電流生産菌や水素生産嫌気性細菌などにも拡げる。

(2) **被毛微生物の作出(細胞表面提示技術)**

AtaA は 3630 アミノ酸からなる巨大ポリペプチドが細胞表面でホモ三量体を形成し、ファイバーとして細胞から生えてくる超分子である。このファイバーに機能性ペプチドや蛋白質を遺伝子レベルで融合し、発現、分泌、アッセンブリーさせ、機能性分子と融合したファイバー構造を細胞表面に再構築することは、大変高度な技術である。人に例えれば、遺伝子工学により直毛を天然パーマにしたり、黒髪を茶髪にしたりするようなものであり、美容院に行く必要はなくなる。他方、蛋白質以外の人工の髪飾りを付けた毛髪を遺伝子工学で生やすことは、理論的に不可能であり、これは生えた髪をあとから飾るよりほかに手段はない。今回、我々は、①遺伝子レベルで機能性分子を *AtaA* に融合して機能性ファイバーを生やす前者の技術と、② *AtaA* ファイバーをポストアッセンブリー的に修飾する後者の技術の両方を追究することにより、機能性のファイバーを細胞表面に生やした微生物(機能性被毛微生物と命名)を作出するという新技術の構築を目指した。

(3) ***AtaA* の構造・機能解明**

① *AtaA* の機能部位を遺伝子の部分欠損等により特定する。② *AtaA* 蛋白質断片の組換え蛋白質を分離精製し、結晶化、X 線構造解析に供する。③水中での細胞の AFM 計測技術を導入し、*AtaA* による細胞付着力や *AtaA* 分子自体の接着力などを求める。④ネイティブ *AtaA* を分離精製する技術を確立し、天然 *AtaA* ファイバーの特性を直接的に解析する。

(4) **他のバクテリオナノファイバーの分子・機能解明**

①タイプ1ピリの遺伝子群の一部を破壊し、ファイバー形成および生理機能への影響を調べる。②Filピリの遺伝子群の一部を破壊し、ファイバー形成および生理機能への影響を調べる。

5. 研究成果・波及効果

前項に示した研究項目ごとに成果と波及効果を記載する。

(1) **微生物固定化技術**

①色素を生産する *Acinetobacter* 属細菌 ST550 や細胞表面エステラーゼを有する *Acinetobacter* 属細菌 ADP1 に *ataA* 遺伝子を導

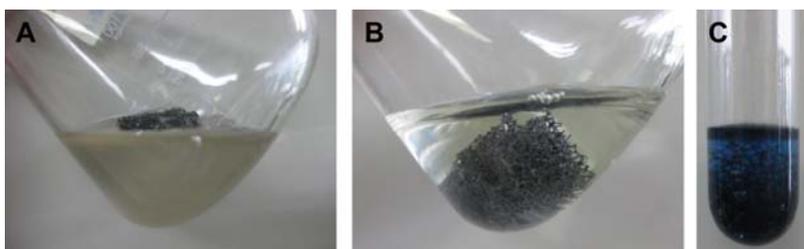


図 1. スポンジに固定した微生物による青色色素の生産
A) 固定化前、B) *AtaA* 発現による固定化後、C) 色素生産

入し、付着性を付与することに成功した。同様な手法で大腸菌にも付着性を付与することができたが、*Acinetobacter* 属細菌ほど付着性は高くなく、改善の余地はある。

②色素生産菌をポリウレタン製スポンジに固定し、基質インドールから青色色素インディゴを生産するバイオプロセスモデルを構築した。微生物を固定したスポンジを反応液に放り込むだけで色素を生産できるという、簡便なプロセスを構築できた(図 1)。しかも、固定化により毒性基質に対する耐性が向上し、基質濃度を上げて反応させることができるようになったため、生産効率が飛躍的に向上した。本成果は海外で高く評価され、論文が掲載された国際学術誌でスポットライトされた。さらに、簡単な操作で固定化した微生物を可逆的に剥離させることができることを発見し、唯一無二の反復着脱可能な微生物固定化技術の発明に至った(特許出願済み)。

③AtaA 蛋白質と相互作用する新規の蛋白質を発見した。この蛋白質は AtaA の分泌を助けている可能性を示唆する実験結果を得た。ある種の微生物では、この蛋白質の遺伝子を *ataA* 遺伝子と一緒に導入することで、付着性をより高めることができる。

④大腸菌に *ataA* を導入しても、*Acinetobacter* 属ほど高い付着性を付与することができないという問題があった。原因として、AtaA の外膜結合部位であるベータバレルが大腸菌の外膜蛋白質と異なるため、アッセンブリーが不安定、または不完全であることが考えられた。そこで大腸菌のTAAのベータバレルと交換しキメラ蛋白質をつくることで、安定化と付着性の向上に貢献した(特許出願済み)。

⑤AtaA の付着力を利用して Tol 5 細胞自体を電極に固定化することで、トルエンのような汚染物質を電子供与体として電流を生産することに成功した(論文リスト)。また、水素生産菌 *Enterobacter* に *ataA* を導入して付着性を付与することにも成功し、水素を反復生産するバイオプロセスを構築した(図書および論文執筆中)。このバイオ水素生産技術は、国内外の学会で注目を集め、中国清華大学との共同研究に発展している。

(2) 被毛微生物の作出

①長さを変えた AtaA の先端に Flag タグと His タグを融合したファイバーの生えた被毛微生物の作出に成功した(特許出願済み;論文執筆中)。His タグは AtaA ファイバー上でも機能し、ニッケルセファロースビーズに微生物細胞を固定化することに成功した。さらに、ペプチドタグだけではなく、蛍光蛋白質を融合した AtaA の作出し、蛍光毛の生えた微生物を分子育種することに成功した。また、セルロース系バイオマスの分解酵素を融合した AtaA の生えた微生物を作出した。この微生物は、期待通り、元来保有していなかったバ

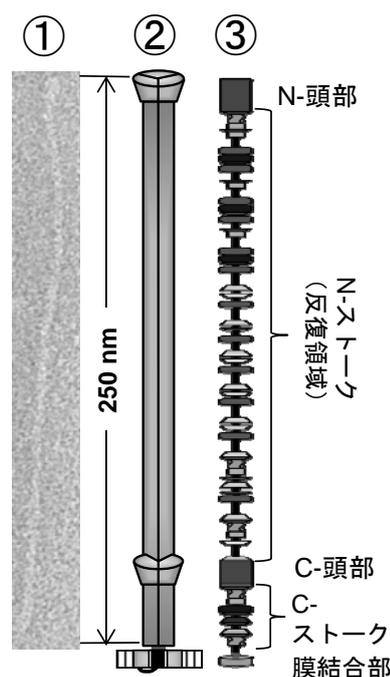


図 2. AtaA ファイバー.

①プロテアーゼにより細胞表面から切断回収されたファイバーの電顕写真。②ファイバー模式図。③ドメイン構造。各種ドメインを様々な形と濃淡で模式的に示した。頭部や膜結合部もドメイン構造の一種である。ストローク領域は複数のドメインの反復により構成されている。

イオマス分解能力を獲得した。

②ソルターゼ認識配列を AtaA ファイバー先端に遺伝子レベルで融合し、細胞から生やした融合ファイバーに対し、ソルターゼで蛍光蛋白質をポストアッセンブリー的に連結した。その結果、蛍光蛋白質で修飾された AtaA ファイバーで覆われた微生物細胞の作出に成功した(論文執筆中)。

(3) AtaA の構造・機能解明

①ドイツマックスプランク研究所のバイオインフォマティクスの専門家との共同研究により、AtaA の詳細なマルチドメイン構造を決定した(図 2)。AtaA は、ドメインをホモ三量体のコイルドコイルが繋いでいる。機能部位を特定するために AtaA を縮小するには、これらドメイン構造やコイルドコイルが縮小後に再構築されるように、精密設計せねばならない。一アミノ酸ずれただけでもファイバーの立体構造が再生できず、そのために機能部位が残っていても機能を失う可能性がある。3630 アミノ酸の全長に対し精密設計を行い、PCR エラーなどが無いかも含め全て配列確認をし、多数の欠損変異体ライブラリーを揃えるのには、相当な年月がかかる。特に欠損により、接着や凝集、分泌、アッセンブリーといった AtaA の機能を失ったり低下を招いたりした場合、それが機能部位の削除によるものなのか、構造が崩れたことによるものなのかについて、慎重に検討を重ねないと間違った結論に至るおそれがある。本研究期間内にこの欠損体ライブラリーを完成させ、機能部位を特定するには至らなかったが、上述の精密設計の方法論を確立することはできた(論文執筆中)。ライブラリーの9割を構築でき、機能部位特定の一手前まで来ている。

②巨大な AtaA 蛋白質全体を結晶化することは不可能であるので、断片化して組換え蛋白質を設計せねばならないが、①と同じ問題があるため、やはり同様の精密設計が必要である。各組換え蛋白質断片を分離精製し、結晶化し、その立体構造を決定し、AtaA 全長の構造を完全決定するには、やはり相当の年月を要する。しかしながら、先述のマックスプランク研究所の三量体化タグ付加技術を利用し、全体構造の8割を決定するに至った。残る2割は結晶化が困難な柔軟な領域を含むため、まだ難航が予想されるが、1年以内を目途に全体構造の決定に至ることを目指している。既に *Acinetobacter* 属細菌の TAA によく保存されている C 末側ヘッド-ストーク領域の結晶構造は決定しており、機能解析が終わり次第、論文を執筆する。

③AFM で Tol 5 細胞の付着力を測定し、他のバイオフィルム形成細菌などと比較した。その結果、Tol 5 細胞は他の微生物細胞が付着しにくい負電荷表面を含む様々な表面に対し、4~10nN という強い付着力を示すことが明らかとなった。他のバイオフィルム形成細菌である緑膿菌などは、疎水性表面に対してのみ 2nN ほどの付着力を示した。また、フォースカーブから、AtaA 1分子の接着力は 300~350pN であることが求まり、生物界最強の相互作用と言われるアビジン-ビオチン相互作用の 150pN をはるかに超えることがわかった。これが分子の大きさに起因する多点接着効果によるものかどうか、ドイツのフランクフルト大学の共同研究者からほぼ同じ大きさの TAA である BadA をもつ微生物を分譲してもらい、現在、解析を進めているところである。

④AtaA ナノファイバーの根元に特殊なプロテアーゼ認識部位を遺伝子レベルで導入し、AtaA ファイバーのアッセンブリー後、プロテアーゼ消化によりネイティブ AtaA ファイバーを切断回収するという新しい分離精製技術を確立した。この方法で精製した AtaA ファイバーを電子顕微鏡(図 2①)、

CD 等で解析し、熱や pH 安定性などを明らかにした(論文執筆中)。また QCM や ELISA に供し、各種材料表面に対する高い親和性を明らかにするとともに、純水中では親和性を失うことを明らかにし、先述の可逆的固定法の発明に至った。

(4) 他のバクテリオナノファイバーの分子・機能解明

① Tol 5 のタイプ1ピリはマンノース結合能を有しておらず、機能は不明のままであるが、重複した遺伝子のファイバー形成への寄与や、発現調節機構の解明に至った(論文執筆中)。

② Fil ピリは他に相同性ある機能性蛋白質が報告されていないが、Tol 5 では、AtaA による付着やバイオフィルム形成を立体障害的に邪魔することが明らかとなった(論文執筆中)。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 13 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 8 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. M. Ishikawa, K. Shigemori, K. Hori; 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> 111 (2014) 16-24. 2. T. Kubota, O. Koiwai, K. Hori, 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> 8 (2013) e66710. 3. H. Liu, M. Ishikawa, S. Matsuda, Y. Kimoto, K. Hori, K. Hashimoto, S. Nakanishi; Extracellular electron transfer of a highly adhesive and metabolically versatile bacterium, <i>ChemPhysChem</i> 14 (2013) 2407-2412. 4. 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. 5. 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, <i>PLoS ONE</i> 7 (2012) : e48830 6. 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. 7. 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. 8. K. Hori, M. Ishikawa, M. Yamada, A. Higuchi, Y. Ishikawa, H. Ebi; Production of peritrichate bacterionanofibers and their proteinaceous components by <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 cell affected by growth substrates, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 111 (2011) 31-36. <p>(掲載済み一査読無し) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 9. 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 10. 堀 克敏; 微生物付着・バイオフィル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. 11. 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 12. 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 13. 堀 克敏; バクテリオナノファイバーの細胞接着機能と応用; 高分子 60, (2011), 10, 747-748 <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 61 件</p>	<p>専門家向け 計 57 件 【国際学会】</p> <ol style="list-style-type: none"> 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. 2. N. Ding, K. Shigemori, H. Nakatani, K. Hori; Immobilization of <i>Enterobacter aerogenes</i> by a trimetric autotransporter adhesin, AtaA and its application to bio-hydrogen production, Asia Bio-HyLinks2013, Osaka, Japan, 2013.11.22-24. 3. S. Yoshimoto, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori; Reversible bacterial immobilization based on the adhesive property of a novel adhesin from <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan,

	<p>2013. 9. 1-3. (自ら企画)</p> <p>4. T. Ishikawa, M. Ishikawa, K. Hori; Functional analysis of a novel bacterionanofiber, Fil fimbria, in the highly adhesive bacterium, <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</p> <p>5. A. Okano, M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; Functional analysis of Fim gene clusters in a highly adhesive bacterium, <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>8. E. Terada, H. Nakatani, M. Ishikawa, K. Hori; Construction of a reporter gene system for <i>Acinetobacter</i> and measurement of the promoter activity of <i>ataA</i> gene of strain Tol 5, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</p> <p>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)</p> <p>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.</p> <p>11. H. Nakatani, M. Ishikawa, K. Hori; Construction of the functionally hairy bacteria with a novel trimeric autotransporter adhesin from <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 strain, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan, 2013. 9. 1-3. (自ら企画)</p> <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>15. M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Shigemori, S. Yoshimoto, A. Suzuki, K. Hori; A new nanofiber protein which immobilizes Gram-negative bacteria onto various material surfaces, German-Japanese International Workshop "Structure and Control for Interfaces" Berlin, Germany, 2013. 1. 9-11.</p> <p>16. S. Yoshimoto, M. Ishikawa, K. Shigemori, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori; Adhesion profiles of <i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5 mediated by nanofiber, ISABE 2012, Guilin, China, 2012.10.25-29</p> <p>17. K. Hori and M. Ishikawa; Bacterionanofiber responsible for cell adhesion and its</p>
--	--

	<p>application, 17th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' community, Incheon, Korea, 2011.10.7-9</p> <p>18. K. Hori; A unique nanofibrous adhesion confers nonspecific, high adhesiveness to bacteria, Interfacial Microbial Engineering, International Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, Japan, 2011.9.6-10. (自ら企画)</p> <p>【招待講演】</p> <p>19. 堀 克敏; 細菌固定化蛋白質の構造・機能と応用; C F C & 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>20. 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>21. K. Hori; Bacterionanofiber mediating cell adhesion and its application, Asia Bio-HyLinks2013, Osaka, 2013.11.22-24.</p> <p>22. 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>23. 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>24. K. Hori; Wastewater treatment using biofilms, ISAWST-1, Nagoya, 2012.11.11-13 (招待講演)</p> <p>25. K. Hori; Bacterionanofiber mediating cell adhesion and its application, ISABE2012, Guilin, China, 2012.10.25-29 (Keynote lecture)</p> <p>26. S. Yoshimoto, M. Ishikawa, K. Shigemori, H. Nakatani, A. Suzuki, K. Hori; Adhesion profiles of Acinetobacter sp. Tol 5 mediated by nanofiber, ISABE2012, Guilin, China, 2012.10.25-29</p> <p>27. K. Hori; Bacterionanofibers applicable to a new method for surface immobilization of microbial cells, 14th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress, Singapore, 2012. 2.21-24. (招待講演)</p> <p>28. 堀 克敏; 日中バイオ水素研究の日本側研究概要、Asia High Technology Network for BioHydrogen Workshop in Osaka 2012、大阪 (大阪大学)、2012.2.6-7 (招待講演)</p> <p>29. 堀 克敏; バクテリオナノファイバー蛋白質と界面微生物工学への展開, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, 筑波, 2011.9.12-13 (招待講演)</p> <p>30. 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、界面動電現象研究会サマースクールー微生物とコロイドのソフト界面ー, 界面動電現象研究会, 筑波, 2011.8.27 (招待講演)</p> <p>31. D. Okamura, Y. Mori, T. Hashimoto, K. Hori; Microbial Degradation of Biofoulants in a Membrane Bioreactor for Water Purification, Defence Science & Research Conference (DSR 2011), SINGAPORE, 2011.8. 3-5 (招待講演)</p> <p>32. K. Hori; Bacterial Cell Adhesion through Bacterionanofibers, 25th Bacterial Adherence and Biofilm, Tokyo, 2011.7. 8. (招待講演)</p> <p>【国内学会】</p> <p>33. 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>34. 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>35. 宮地佑典, 堀 克敏; Analyzing the Bacterial Adhesion of the highly adhesive bacterium Acinetobacter 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>36. 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 Acinetobacter 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>37. 堀 克敏, 石川聖人, 中谷肇, 吉本将悟, 小原優季, 蟹江純一; 新規バクテリア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>38. 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>39. 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>40. 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>41. 寺田瑛美, 中谷肇, 石川聖人, 堀 克敏; Acinetobacter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>42. 石川智也, 石川聖人, 堀 克敏; 高付着性Acinetobacter属細菌Tol 5株の付着とバイオフィーム形成を阻害する新規バクテリアオナノファイバー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>43. 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>44. 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回日本微生物生態学会大会, 鹿児島, 2013.11.23-25</p> <p>45. 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</p> <p>46. 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</p> <p>47. 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</p> <p>48. 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</p> <p>49. 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</p> <p>50. 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</p> <p>51. 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</p> <p>52. 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 (招待講演)</p> <p>53. 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 (招待講演)</p> <p>54. 堀 克敏; バクテリア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. (招待講演)</p> <p>55. 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,</p>
--

	<p>大阪, 2013.3.17-19</p> <p>56. 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>57. 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>一般向け 計4件</p> <p>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</p> <p>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.</p> <p>3. 堀 克敏; バイオフィアウリングの原因解明と抑制技術, 膜機構春季講演会, 神戸, 2012.3.8. (招待講演)</p> <p>4. 堀 克敏; 水処理の国際産学連携の拠点形成に向けて, 名古屋, 2011. 7. 21. (招待講演)</p>
<p>図書</p> <p>計4件</p>	<p>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</p> <p>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</p> <p>3. 堀 克敏企画・監修・編集・執筆(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</p> <p>4. K. Hori and H. Unno; Bioreactions and Bioreactor Operation Integrated production and separation, in Murray Moo-Young (ed.), "Comprehensive Biotechnology", Second Edition, volume 2, Elsevier, (2011), pp.579-590, ISBN: 9780444533524</p>
<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計1件</p>	<p>(取得済み) 計1件</p> <p>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, 登録日2013年5月10日 特許権者:名古屋大学, 国内および外国</p> <p>(出願中) 計0件</p> <p>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</p> <p>(http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/nubio2/index.html) 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>	<p>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</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>4. 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。</p> <p>5. 身近な微生物の驚くべき能力とその利用を目指す微生物研究の最前線, さかえサイエンストーク, 名古屋, 2011.10.18. 20. ジュンク堂書店ロフト名古屋店、一般市民、参加者数約20名、内容: 、身近な存在である微生物について、我々</p>

	<p>の生活との関わりと共に紹介した。次いで、沸騰水中でも生きられる、放射線を浴びても平気である、電流を生産するなど微生物の驚くべき能力について話した。そして微生物を利用する技術や研究の最前線について、本研究課題の内容も織り交ぜながら説明した。</p> <p>6. 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 2011 名大もの作り最前線—創造から技術へ—, 名古屋大学豊田講堂, 2011.9.2, 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。</p>
新聞・一般雑誌等掲載計 5 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2012. 8. 30. 中日新聞「炭素繊維の水浄化解明」 2. 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」 3. 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」 4. 2012. 11. 16. 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」」 5. 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」
その他	<ol style="list-style-type: none"> 1. 生物学論文賞 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。

7. その他特記事項 なし。