

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0145

研究課題名（和文）磁性細菌細胞内で新規に合成された磁気オルガネラと細胞骨格の相互作用

研究課題名（英文）Interactions between the cytoskeletal filaments and de novo synthesized magnetic organelles in magnetotactic bacterial cells

研究代表者

田岡 東（Taoka, Azuma）

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：20401888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,200,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、磁性細菌のマグネトソームの生細胞イメージング技術と、海外共同研究者のマグネトソームの形成制御技術を用いて、新規に合成されたマグネトソームの細胞内配置過程を解析した。その結果、形成初期のマグネトソーム動態の観察に成功し、マグネトソームは2つの独立した機構によって、細胞内に直鎖状に配置されることが明らかになった。また、マグネトソーム形成初期に起こる蛋白質相互作用を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガネラの細胞骨格による制御は、真核細胞ではよく研究されているが、細菌オルガネラの細胞骨格による制御についての研究は、端緒についたばかりである。本研究で、明らかになったマグネトソーム配置メカニズムは、細菌の細胞内磁気感知センサーの構築機構に新たな知見をもたらすだけでなく、細菌オルガネラの制御技術開発の基盤となることが期待できる。また、本研究で開発された細菌オルガネラの生細胞内観察技術は、磁性細菌以外の他の細菌オルガネラにも応用できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed subcellular positioning process of de novo synthesized magnetosomes using live-cell imaging techniques and a magnetosome inducible strain developed by the overseas collaborator. The imaging of dynamic magnetosome positioning indicated that linearly magnetosomes positioning is maintained by two independent mechanisms. Furthermore, we screened protein interactions that occur in initial stages of magnetosome formation.

研究分野：分子微生物学

キーワード：細胞骨格 磁気感知 原核細胞オルガネラ 細菌 磁気微粒子 イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

鳥類、爬虫類、両生類、節足動物などの動物から、原生生物、細菌にいたる広い生物種で、生物が磁気を感じ、それを生存戦略に役立てることが知られている (*PLoS Biol.* 15: e2003234, 2017)。磁気感知を行うための磁気受容体について、分子レベルでの研究が最も進展している生物は、磁性細菌である。磁性細菌は、湖沼、河川、海洋などの水環境に広く生育する微好気性または嫌気性の細菌である。磁性細菌は、地磁気を感じ、地磁気に沿って移動する（走磁性）ことで、水環境中で酸素の濃度勾配に沿った上下方向に移動方向を限定し、生育に有利な微好气的環境や嫌气的環境を見いだす (*Nature Reviews Microbiology* 14: 621-637, 2016)。磁性細菌の磁気感知を可能にしているのは、マグネトソームとよばれるナノサイズの細胞内構造である (図1)。マグネトソームは、真核細胞のオルガネラのように、リン脂質二重膜で覆われており、膜小胞の内部に鉄イオンが取り込まれ、磁鉄鉱 (Fe_3O_4) の結晶が生成される。この磁気センサーであるマグネトソームは、真核細胞のオルガネラ的特性を有する。マグネトソームは、リン脂質膜小胞により細胞質から区分され、棒磁石のような特化した形態と磁気センサーとしての機能をもつ。このように、真核細胞のオルガネラと比較しても遜色ない構造と機能をもつことから「原核細胞オルガネラ」とよばれる。

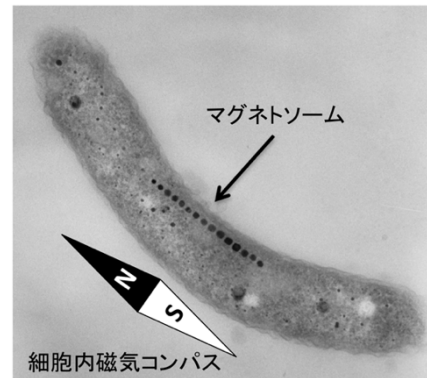


図1 *Magnetospirillum* 属の磁性細菌の電子顕微鏡写真。細胞中央の直鎖状の構造が磁気コンパスの働きをするマグネトソーム。

興味深いことに、マグネトソームは、真核細胞のオルガネラと同様に細胞骨格と結合している。この細胞骨格は、MamK とよばれるアクチン様蛋白質から構成される。2017年、研究代表者の研究により MamK 細胞骨格の生理的役割が明らかになった。すなわち、MamK 細胞骨格はマグネトソームを棒磁石のように直鎖状に固定し、細胞内への物理的な拡散や磁気相互作用による凝集を防ぐことでマグネトソームを磁気センサーとし機能させている (*mBio* 8:e00679-17, 2017)。しかし、MamK 細胞骨格が、どのようにしてマグネトソームを細胞骨格上に結合させ、最密に配列し、凝集を防ぎ、直鎖状に固定するのか、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、アクチン様蛋白質である MamK によって構成される細胞骨格によるマグネトソームの配置調節機構を解析する。従来、オルガネラや細胞骨格は、真核細胞の特徴とされていたが、可視化技術の進歩に伴い、原核細胞にもオルガネラや細胞骨格が存在することが明らかとなった。しかし、その具体的な機能や仕組みは不明である。本研究では、海外共同研究者が開発したマグネトソームの形成を分子生物学的に制御できる磁性細菌株 (Q_{Ind} 株) (*mBio* 7:e01898-01815, 2016) を用いて、細胞内に合成されたマグネトソームがどのように細胞骨格に結合し、直鎖状に配置されるのか、その様子を可視化する。

3. 研究の方法

(1) Q_{Ind} 株の生細胞蛍光イメージング

本研究では、海外共同研究者が磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株をもとに作成した Q_{Ind} 株を用いて、マグネトソーム形成過程をイメージングした。 Q_{Ind} 株では、マグネトソーム小胞形成に必須の蛋白質をコードする *mamQ* 遺伝子が欠失しており、プラスミド上から薬剤依存的に MamQ 蛋白質を発現させることで、マグネトソームを任意のタイミングで形成できる。本研究には、 Q_{Ind} 株の使用と細胞内マグネトソームの高解像度のイメージング技術が必須であり、これらを有する Q_{Ind} 株の開発者が所属する米国カリフォルニア大学バークレー校の研究室で実施した。

Q_{Ind} 株細胞をセルチャンバー内にゲルで固定し、MamQ 誘導を開始する薬剤を添加し、10% 酸素の微好气的環境下で培養した。薬剤添加後、任意の時間に全反射蛍光顕微鏡 (ZEISS, Elyra または Nikon, Eclipse Ti 電動 TIRF セット) を用いた遮光照明法で、細胞内のマグネトソーム動態を動画観察した。成熟マグネトソームマーカーであるマグネトソーム局在タンパク質 MamC または MmsF と緑色蛍光蛋白質 (GFP) の融合蛋白質を用いて、マグネトソームを蛍光標識した。

(2) マグネトソーム形成初期に起こるタンパク質相互作用の同定

Halotag 蛋白質を融合した MamI 及び MamQ を *M. magneticum* AMB-1 に発現させ、その細胞内局在を調べた。抗 MamI 及び抗 MamQ ポリクローナル抗体を作製し、AMB-1 野生株細胞内

のタンパク質発現と局在を確認した。MamI と MamQ と相互作用する蛋白質を同定するため Halotag アフィニティクロマトグラフィーを用いたタンパク質間相互作用解析を行った。MamI-Halotag 及び MamQ-Halotag 発現細胞から得た細胞抽出液を、Halotag 特異的に結合する HaloLink Resin カラムにかけた。対照実験として、Halotag のみを発現させた細胞の抽出液をカラムにかけた。それぞれのカラムに吸着した蛋白質を質量分析機により同定した。

(3) 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) の位相モードを用いた膜小胞の物性解析

リポソーム及び細胞外膜小胞は、アミノシラン処理したマイカ基板上に固定し、PBS 緩衝液中で AFM 観察した。高速 AFM (*Nat. Protoc.* 7:1193-1206, 2012) は、研究室作製のタッピングモード AFM を使用した。位相差の検出には、HF2LI lock-in-amplifier (Zurich Instruments, Switzerland)を用いた。

4. 研究成果

(1) Q_{Ind} 株を用いた新規に合成されたマグネトソーム配置過程の生細胞蛍光イメージング

本研究では、海外共同研究者が開発したマグネトソームの形成を分子生物学的に制御できる磁性細菌株 (Q_{Ind} 株) と、申請者が開発したマグネトソームの生細胞イメージング技術を用いて、細胞内で新規に合成されたマグネトソームの細胞内配置過程を解析した。具体的には、野生型 Q_{Ind} 株と *mamK* 遺伝子を欠損させた Q_{Ind} 株において、マグネトソーム形成誘導後のマグネトソーム動態を生細胞蛍光イメージングにより比較した。その結果、マグネトソームの細胞内配置は2つの機構 (Long-range alignment と Short-range alignment) によって行われていること、Short-range alignment は MamK 細胞骨格によって行われているが、Long-range alignment は MamK 細胞骨格に非依存的機構で、未知の分子がマグネトソームの配置に関わることが明らかになった (図2)。一方で、Long-range alignment によるマグネトソームの直鎖状固定は不十分であり、マグネトソームを安定な直鎖状に固定するためには、MamK 細胞骨格による short-range alignment が必須であることもわかった。これまで、マグネトソームの形成に関わる蛋白質の機能は、電子顕微鏡による静止画的観察結果をもとに議論されてきた。本研究では、生細胞イメージングによるマグネトソーム動態観察法を用いて、 Q_{Ind} 株や *mamK* 欠損株の表現型を解析することで、MamK 細胞骨格の機能の詳細を明らかにした。

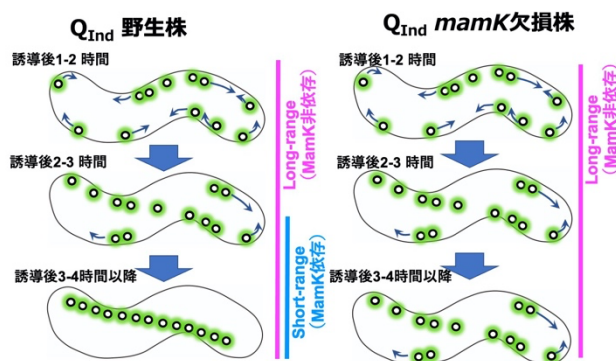


図2 Q_{Ind} 株生細胞イメージング結果。*mamK* 欠損株でも、マグネトソーム誘導後にマグネトソームが細胞長軸方向に沿って配置される様子が観察された。このことから、MamK 非依存的な新規のマグネトソーム配置機構 (Long-range arrangement) の存在が示された。しかし、*mamK* 欠損株では、マグネトソームを完全に固定することはできず、一部のマグネトソームは細胞内を拡散し続けた。マグネトソームが完全に安定した直鎖状構造に固定するためには、MamK 細胞骨格 (Short-range arrangement) が必要であることが明らかになった。

(2) マグネトソーム形成時に起こる蛋白質相互作用の同定

mamI 及び *mamQ* 遺伝子はマグネトソーム形成の初期段階で働くことが、遺伝子欠損株を用いた分子生物学的な研究により示されている。本研究では、これらの蛋白質の実態を調べることを目的に、蛋白質の局在、蛋白質相互作用を解析した。抗 MamI 抗体、抗 MamQ 抗体を作成し、ウエスタンブロッティングにより細胞内局在を調べたところ、マグネトソーム画分に MamQ 及び MamI の局在を確認した。また、 Q_{Ind} 株で MamI-Halotag を発現させたところ、MamI の局在はマグネトソームマーカーの MmsF と一致した (図3)。MamI と MmsF の共局在は、マグネトソーム形成誘導後、4時間後から観察された (図3)。この結果から、マグネトソームの初期形成は、融合後4時間以内に起こるものと考えられ、現在この間に起こる蛋白質相互作用に着目している。

AMB-1 株に、MamI-Halotag または MamQ-Halotag の融合蛋白質を発現させ、Halotag アフィニティクロマトグラフィーを用いて、MamI または MamQ と相互作用する蛋白質をスクリーニングした。その結果、MamI-Halotag カラムと MamQ-Halotag カラムからの溶出サンプルに共通

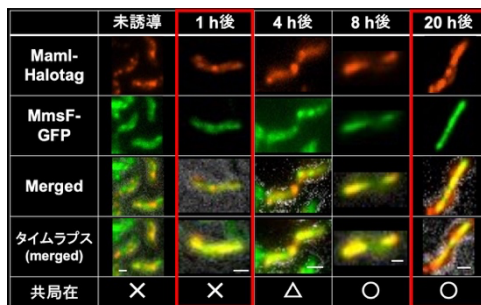


図3 Q_{Ind} 株でのマグネトソーム誘導後の MamI と Mms6 (成熟マグネトソームマーカー) の共局在。MamI と Mms6 の共局在は、誘導後4時間以降に見られた。

して、18種類のマグネトソーム結合蛋白質が同定された。興味深いことに、磁鉄鉱形成に関わる蛋白質は全く検出されなかった。このことは、MamIとMamQは、複数の蛋白質からなる蛋白質複合体を形成すること、マグネトソームの形成段階毎にマグネトソームを構成する蛋白質複合体が異なることが示唆された。

現在、マグネトソームの生細胞蛍光イメージングに用いているマーカー蛋白質は、新規合成されたマグネトソームを特異的に標識できない。マグネトソーム形成時特異的な蛋白質相互作用を同定できれば、新規合成されたマグネトソームのためのマーカー蛋白質を得ることができると可能性がある。

(3) 高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）による膜小胞の物性解析法の開発

マグネトソーム研究のための新しい解析法として、膜小胞の表面物性を高速 AFM の位相モードを用いて定量的に調べる方法を開発した。試料として、人工的に作製したリポソームと細菌の細胞外膜小胞を用いた。高速 AFM で測定される位相差の値は、試料表面と探針の間の相互作用（接着性、摩擦性、粘弾性）の強さに依存して変化する。表面物性の均一なポリスチレンビーズを標準物としてリポソームと細胞外膜小胞の位相差の値を比較した。その結果、リポソームの位相差値は均質であったのに対し、細胞外膜小胞は不均一性を示し、種類の細菌が物性の異なる膜小胞を形成することを明らかにした (Nanoscale 12: 7950-7959, 2020)。この高速 AFM による膜小胞の物性解析法は、単離マグネトソームの表現型解析にも応用できた。

得られた研究成果について、渡航先の海外共同研究者と共著論文を執筆している。また、米国微生物学会大会 (ASM microbe 2019) 等の国際学会と、生化学会、細菌学会、ゲノム微生物学会等の国内学会で研究成果発表を行った他、Berkeley Japanese Academic Network (BJAN)、US DOE Ames Laboratory で講演を行い研究成果の発表を行った。また、海外共同研究者と継続的に国際共同研究を展開しており、さらなる研究展開と研究交流を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuchi Yousuke, Obana Nozomu, Toyofuku Masanori, Kodera Noriyuki, Soma Takamitsu, Ando Toshio, Fukumori Yoshihiro, Nomura Nobuhiko, Taoka Azuma	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 7950 ~ 7959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NR10850E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigyō Kazuki, Sun Linhao, Yajima Riku, Takigaura Shohei, Tajima Masashi, Furusho Hirotohi, Kikuchi Yousuke, Miyazawa Keisuke, Fukuma Takeshi, Taoka Azuma, Ando Toshio, Watanabe Shinji	4. 巻 92
2. 論文標題 Geometrical Characterization of Glass Nanopipettes with Sub-10 nm Pore Diameter by Transmission Electron Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 15388 ~ 15393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 6件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 田岡 東, 福森 義宏
2. 発表標題 細菌の磁気コンパス -マグネトソーム形成の生細胞イメージング-
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 シンポジウム「磁覚と磁気応答生体物質の生物物理学」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田岡 東
2. 発表標題 細菌表層の形状と物性の変化をダイナミックに観察する、生細胞高速AFMイメージング
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会 ウェビナー「細菌の表層変化を捉え、可視化する！」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 拓海, 菊池 洋輔, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 高速AFMを用いた磁性細菌の細胞骨格結合タンパク質MamJの機能解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 洋輔, 市中 佑樹, 豊福 雅典, 尾花 望, 野村 暢彦, 田岡 東
2. 発表標題 原子間力顕微鏡の位相イメージングを用いたParacoccus denitrificans細胞に結合した膜小胞の解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 拓海, 菊池 洋輔, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 マグネトソームタンパク質MamJはマグネトソーム配置のためにMamK細胞骨格の重合を制御する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 洋輔, 市中 佑樹, 豊福 雅典, 尾花 望, 野村 暢彦, 田岡 東
2. 発表標題 生きた細菌表面に結合した細胞外膜小胞の物性測定
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口 友佳子, 高岡 祐太, 川村 想, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 両毛性磁性細菌Magnetospirillum magneticum AMB-1のべん毛運動のイメージング
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taoka, A., Kikuchi, Y., and Fukumori Y.
2. 発表標題 Imaging of Dynamic Polymerization of Actin-Like Protein MamK for Bacterial Organelle Magnetosome Positioning.
3. 学会等名 ASM microbe 2019 (米国微生物学会大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 洋輔, 市中 佑樹, 豊福 雅典, 尾花 望, 古寺 哲幸, 安藤 敏夫, 福森 義宏, 野村 暢彦, 田岡 東
2. 発表標題 Direct imaging of membrane vesicle-mediated cell-to-cell communication using high-speed AFM
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口 友佳子, 田岡 東, 福森 義宏
2. 発表標題 Analysis of pH regulation in magnetotactic bacteria using pH-sensitive fluorescent protein
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田岡 東
2. 発表標題 ナノサイズの磁石を作る細菌 - 磁性細菌の生物学
3. 学会等名 Berkeley Japanese Academic Network (BJAN) 第55回交流会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taoka, A.
2. 発表標題 Molecular machinery for bacterial magnetic organelle positioning
3. 学会等名 Ames Laboratory Seminar (米国エネルギー省エイムズ研究所セミナー) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taoka, A.
2. 発表標題 Molecular machinery for subcellular positioning of bacterial magnetic organelle
3. 学会等名 第93回日本細菌学会シンポジウム「バクテリアの表層構造の構築と機能」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Taoka, Y. Eguchi, Y. Kikuchi, Y. Fukumori
2. 発表標題 Measuring magnetosomal pH in living magnetotactic bacterial cell
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Y. Eguchi, A. Taoka, Y. Fukumori
2 . 発表標題 pH imaging in living prokaryotic cells and organelles using pH sensitive fluorescent proteins
3 . 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Y. Kikuchi, Z. Oestricher, A. Taoka, Y. Fukumori
2 . 発表標題 Characterization of MamK polymerization using high-speed atomic force microscopy
3 . 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 M. Omura, A. Taoka, Y. Fukumori
2 . 発表標題 Subcellular localization of MamQ in Magnetospirillum magneticum AMB-1
3 . 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Y. Takaoka, A. Taoka, Y. Fukumori
2 . 発表標題 Live-cell imaging of flagellar rotation during magnetotactic motility
3 . 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 I. Yamazaki, A. Taoka, Y. Fukumori
2. 発表標題 Functional analyses of MamJ which is cytoskeleton associating protein for magnetosome positioning
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高岡祐太、田岡東、福森義宏
2. 発表標題 磁性細菌の走磁性運動におけるべん毛回転運動の生細胞イメージング
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田岡 東、菊池 洋輔、福森 義宏
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いた磁性細菌の細胞骨格タンパク質MamKの重合特性解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口 友佳子、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 pH感受性蛍光蛋白質を用いた原核細胞およびオルガネラ内のpH蛍光イメージング解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 いつみ、菊池 洋輔、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 原核細胞オルガネラの細胞内配置に関わる細胞骨格および新奇細胞骨格結合タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学生体分子生理学研究室ホームページ http://pronet.w3.kanazawa-u.ac.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	コメリ アラッシュ (Komeili Arash)	米国カリフォルニア大学バークレー校・Dept. of Plant and Microbial Biology・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ合衆国	University of California, Berkeley			