

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02868

研究課題名(和文) 分子イメージングによる原核細胞のナノオルガネラ制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of prokaryotic nanosized-organelle regulatory mechanism using molecular imaging

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁性細菌の細胞内磁気センサーであるマグネトソームの細胞内配置を制御するための仕組みを明らかにすることを目指し、MamK細胞骨格結合蛋白質であるMamJの機能を明らかにした。MamJおよびアクチン様蛋白質MamKを精製し、主に高速原子間力顕微鏡を用いてMamK重合におけるMamJの役割を検証した。その結果、MamJは、MamK繊維に結合し、短く動的な細胞骨格繊維を形成させることが分かり、新しい細菌細胞骨格の調節蛋白質であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小な細菌の細胞内にも多様なオルガネラや細胞骨格系が存在する。しかし、このようなナノサイズの細菌オルガネラの役割や、細胞骨格による制御機構は、真核細胞のオルガネラと比較して未知である。マグネトソームは、その形成と制御に関わる蛋白質群が同定されており、細菌オルガネラのモデルとして適している。本研究では、細胞骨格MamKとその結合蛋白質MamJが、どのような特性の細胞骨格繊維を形成するかを分子レベルで調べ、マグネトソーム表層に形成される細胞骨格の実態を明らかにした。この結果は、細胞骨格による細菌オルガネラの制御機構に知見をもたらし、細菌オルガネラを用いた応用研究にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the molecular mechanism for intracellular positioning of bacterial organelle magnetosomes that function as an intracellular magnetic sensor of magnetotactic bacteria. To do this, we examined the function of MamJ protein that is known as a MamK cytoskeleton binding protein. The role of MamJ on MamK polymerization was assessed using high-speed atomic force microscopy. As a result, we found that MamJ binds to MamK polymers and regulate MamK polymerization to form short and dynamic cytoskeletal filaments. These provided new view on a bacterial cytoskeleton binding protein for organelle positioning.

研究分野：分子微生物学

キーワード：細菌 オルガネラ イメージング 細胞骨格 磁性細菌 アクチン

1. 研究開始当初の背景

生命の歴史は、巨大な磁石である地球上で営まれており、多くの生物が磁気を感じることが知られている (Nature 558:50-59, 2018)。生物磁気感知の分子機構に関する研究は、端緒にすぎたばかりであるが、その中では、磁性細菌は最も研究が進んでいる生物である。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、生育に有利な環境を見いだしている

(Nature Rev Microbiol 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磁気センサーの役割を果たすナノサイズの細胞内構造である (図1)。図1は、磁性細菌のモデル生物である *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の透過型電子顕微鏡写真である。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いる。マグネトソーム小胞は、細胞質膜 (内膜) が細胞質側へ貫入することで形成され、直径 50 nm の均一な大きさに保たれる。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。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組織化された構造と機能をもつことからマグネトソームは、「原核細胞オルガネラ」の代表例の一つである (Annu Rev Cell Dev Biol 34: 217-238, 2018)。

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 (Science 311:242-245, 2006)。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、研究代表者らの研究により 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 (Taoka et al., mBio 8(4): 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。一方、MamJ は、2006年に発見された MamK 結合蛋白質であり (Nature 440:110-114, 2006)、従来、マグネトソームと MamK 細胞骨格を繋ぎマグネトソームを固定するリンカー蛋白質であると考えられてきた。ところが最近の研究で、MamK 繊維の重合脱重合平衡による動態 (トレッドミル) がマグネトソームの細胞内配置に関わることが示唆された (BMC Biol. 14:88, 2016)。さらに、mamJ 遺伝子欠損株では、MamK 細胞骨格の動態が喪失することが明らかになり、MamJ は MamK 細胞骨格の制御に関わる分子であることが示唆された (Mol. Microbiol. 82:342-354, 2011)。これらの研究状況から、マグネトソーム配置の分子機構を理解するために、MamJ の MamK 細胞骨格における分子レベルの役割の解明が、マグネトソーム配置の分子機構を明らかにするために必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、「マグネトソーム」の配置と機能を制御するための仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的とし、細胞骨格による原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の配置と機能を制御する分子レベルの仕組みの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MamK、MamJ の蛋白質精製

MamK および MamJ は、大腸菌内で発現させ、組換え蛋白質をそれぞれ精製した。MamK の精製では、細胞抽出液を塩析し、沈殿として MamK 画分を得た。アルカリ性緩衝液により脱重合した MamK 蛋白質をゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィによって精製した。ゲル濾過により精製した MamK の分子サイズが単量体 MamK と一致することを確認した。MamJ の精製では、N 末端に His タグを付加した MamJ 蛋白質を発現させた大腸菌の菌体を、グアニジン塩酸塩を含む緩衝液で溶解し、変性条件中でニッケルアフィニティクロマトグラフィにより精製した。得られた精製標品を透析によってリホールディングし、その後、ゲル濾過を行うことで精製した。

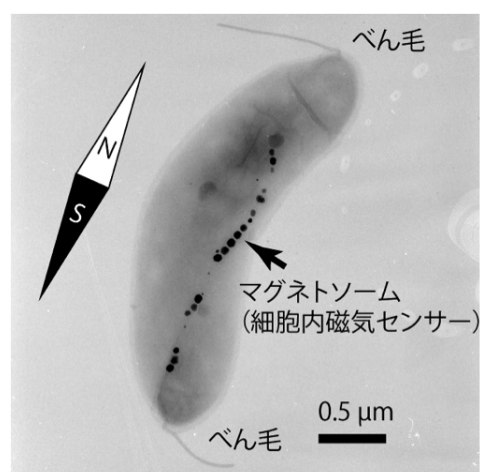


図1 磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の電子顕微鏡写真。細胞中央の直鎖状の構造が磁気センサーの働きをするマグネトソーム。

(2) MamK 重合反応

MamK の重合反応は、精製 MamK 標品を重合緩衝液に加え、1 mM ATP を添加することで重合反応を開始した。ATP 添加後、25°C で 10 分間恒温し、重合反応を行った。必要に応じて反応液中に MamJ 精製標品を加えて実験を行った。ペレティングアッセイでは、重合反応後に、超遠心 (100,000 xg , 1 時間) を行い、上清と沈殿画分に含まれる MamK または MamJ 量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により解析した。形成された MamK 繊維の蛍光顕微鏡観察を行う場合は、MamK 精製標品を Alexa568 蛍光標識した試料を用いて重合反応を行った。

(3) MamK 重合の高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) 観察

高速 AFM 観察には、金沢大学ナノ生命科学研究所の安藤教授らが開発したタッピングモードの高速 AFM 顕微鏡装置を用いた。カンチレバーは窒化シリコン製の BL-AC10-DS (オリンパス) を、探針には電子線積層した炭素探針を用いた。観察時のタッピング力は、MamK 繊維へのダメージが最小になるように調節した。MamK 繊維の観察基板には、アミノシランで処理したマイカ基板を用いた。観察チャンバー内に、MamK 重合反応液を添加し、反応液中でマイカ基板上に結合した MamK 繊維を観察することで、MamK 繊維の動的な重合過程を観察した。

(4) マグネトソームの生細胞イメージング

マグネトソームの細胞内動態の観察には、マグネトソームマーカーである Mms6-GFP を発現させた AMB-1 株を用いた。細胞を培養用のチャンバー内のポリ L リジン処理したカバーガラス上に固定した。チャンバー内の細胞を恒温装置のついた全反射蛍光顕微鏡内で、培養を行いつつ、遮光照明法で約 20 時間のタイムラプス観察を行い、細胞周期を通じたマグネトソームの細胞内動態を観察した。

4. 研究成果

(1) MamJ の MamK 細胞骨格繊維重合における機能解析

MamK 細胞骨格によるマグネトソーム配置機構をナノレベルの分解能で観察し、その分子機構を解析するため MamK 細胞骨格の *in vitro* 再構成系を構築し、蛍光顕微鏡及び高速 AFM を用いて行った。MamK 繊維と MamJ 間の蛋白質間相互作用をペレティングアッセイにより調べたところ、MamJ が MamK 繊維と共沈することを確認した。次に、蛍光標識した MamK 蛋白質と用いて、全反射蛍光顕微鏡により、MamJ の結合による MamK 繊維構造への影響を調べた。MamK のみで重合させた試料と、MamK に等モル量の MamJ を加えて重合させた試料を比較観察したところ、MamK のみで重合した場合は、長さが数百 μm におよぶ大きな束状の繊維が観察 (図 2) されたことに対し、MamJ を加えて MamK を重合した場合は、このような大きな MamK 繊維は見られなくなった。このことから、MamJ は、MamK 重合特性に何らかの影響を及ぼし、束状の長い MamK 繊維の形成を防ぐことが示唆された。そこで、高速 AFM を用いて、MamJ が MamK 重合に与える影響を調べた (Kikuchi *et al.* *Nanoscale* 12: 7950–7959, 2020)。高速 AFM では、マイカ基板上で単量体 MamK が、らせん状の繊維に重合する様子を動的に観察することに成功した (図 2)。MamJ 存在下で形成された MamK 繊維は、MamJ 非存在化に比べて、その繊維の長さは明らかに短く、かつ均一な長さ分布を持つことがわかった (図 3)。単量体 MamK に MamJ と ATP を加えて、動的な MamK 重合過程を高速 AFM 観察したところ、MamK 繊維は一定の長さまで成長し、その後繊維の成長を停止した。形成された MamK 繊維端は伸長と短縮を繰り返している様子が観察されたことから、MamJ 存在下では、MamK 繊維の重合と脱重合が平衡状態に達してお

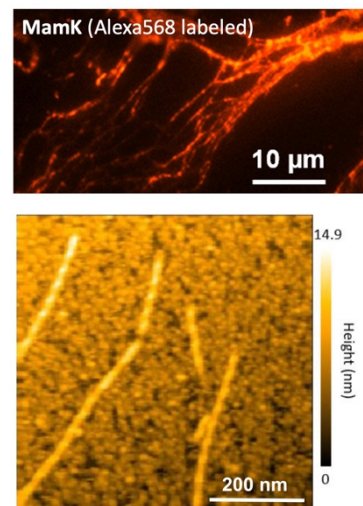


図 2 (上) MamK 単独で形成される束上の MamK 繊維の蛍光顕微鏡写真。(下) 形成された MamK 繊維の AFM 像。

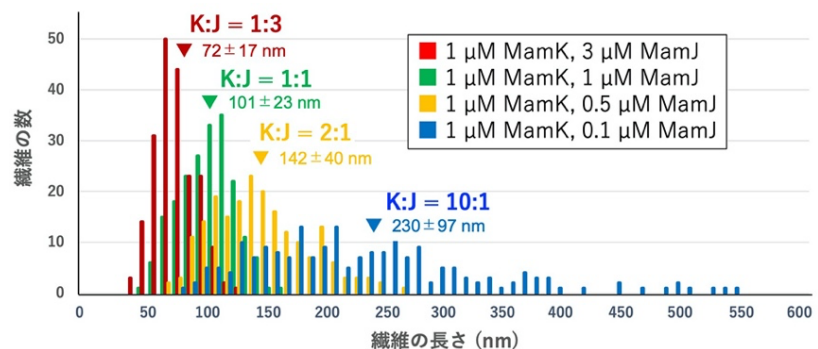


図 3 MamJ の MamK 繊維の長さへの影響。MamJ 濃度の上昇とともに、短く均質な長さの MamK 繊維が形成された。

り、MamK 繊維が短く保たれていることが示唆された。反応液中の MamK と MamJ の存在量比を変え、形成された MamK 繊維の長さの分布を調べたところ、MamK 繊維の長さは、MamJ 濃度に依存的に短くなった (図 3)。MamK と MamJ の量比が 10:1 の時の MamK 繊維の平均値は 230 ± 97 nm であったのに対し、2:1 では 142 ± 40 nm、1:1 では 101 ± 23 nm、1:3 では 72 ± 17 nm であった。細胞内の MamK/MamJ の存在比を細胞抽出液のイムノブロッティングにより調べたところ、その存在比は 1:2 であった。この MamK/MamJ 比で試験管内で形成された MamK 繊維の長さは、クライオ電子線トモグラフィ観察により細胞内で報告された MamK 繊維の長さとは矛盾しない。以上のことから、MamJ は MamK の重合特性を調節する蛋白質であることが初めて示された (論文投稿準備中)。

MamJ は、マグネトソームの細胞質側表層にある蛋白質層 (マトリクス) に局在する。そこで、MamJ を表面に固定したマグネトソームに見立てビーズを MamK 重合反応液に加えることで、マグネトソーム再構成実験を行った。その結果、ビーズの表面に MamK が濃縮され繊維が形成されることがわかった。以上の結果から、MamJ の機能として以下のモデルを提案した。MamJ はマグネトソーム表層で MamK 繊維と相互作用し、MamK 繊維をマグネトソーム表層に濃縮する。マグネトソーム表層では、MamJ の働きにより、短くかつ動的な MamK 繊維を形成される。この短く動的な MamK 繊維が、マグネトソームの凝集や分散を防ぎ、直鎖状につなぎ止める。

(2) MamK 細胞骨格の機能保存性

磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 の *mamK* 欠損株では、マグネトソームは、直鎖状に繋ぎとめられず細胞内を拡散する。*mamK* 遺伝子を欠損 AMB-1 株に、プラスミド上から MamK 蛋白質を発現すると、マグネトソームの直鎖状の配置が回復する。この *mamK* 欠損株に *Alpha-*、*Gamma-*、および *Delta-Proteobacteria* に分類される別種の磁性細菌の *mamK* 遺伝子を発現させたところ、マグネトソームの直鎖状配置がレスキューされた。この結果は、MamK 細胞骨格のマグネトソームを直鎖状に配置し、固定するという機能が磁性細菌間で保存されていることを示唆している。

(3) MamK 細胞骨格極性の制御に関わる蛋白質

本研究では、MamJ 以外の MamK 細胞骨格の特性制御に関わる蛋白質にも着目した。米国カリフォルニア大学バークレー校のコメリ教授との共同研究では、マグネトソーム鎖の長さに影響をもたらす 2 つの遺伝子の機能を解析した。マグネトソームを GFP で蛍光標識した細胞を長時間タイムラプス観察することで、細胞分裂時のマグネトソーム分配の様子を調べた。*M. magneticum* AMB-1 野生株では、マグネトソームの位置は固定されているが、これらの遺伝子の欠損株では、細胞分裂後にマグネトソームが細胞中央に向かって移動することがわかった。光刺激によって蛍光色に変化する蛍光蛋白質 Dendra2 と MamK の融合蛋白質を AMB-1 細胞に発現させ、MamK 細胞骨格の細胞内動態を野生株と遺伝子欠損株で比較した。興味深いことに、野生株では MamK 細胞骨格の動態に極性は見られなかったが、当該遺伝子欠損株では、MamK の動態に極性が見られた。このことから、MamK 細胞骨格の動態を制御することで、マグネトソーム鎖の長さを調節していることが示唆された (論文投稿中)。

原核細胞である細菌は、従来はオルガネラを含まない単純な細胞構造を持つと考えられてきた。しかし、20 世紀末からのクライオ電子顕微鏡をはじめとするイメージング技術の発展により、マグネトソームの他、フィコビリソーム、クロロソーム、アナモキシソーム、フェロソームなど多様な細菌オルガネラの存在や、真核細胞のアクチンやチューブリンに類似した多様な細菌の細胞骨格系の存在が徐々に明らかになった。しかし、このようなナノメートルサイズの前核細胞オルガネラの形成機構や、細胞骨格によるオルガネラの細胞内配置の制御機構は、真核細胞のオルガネラ研究の知見と比較して未知である。磁性細菌のマグネトソームは、オルガネラ形成と制御に関わる蛋白質群が同定されており、原核細胞オルガネラのモデルとして適している。本研究では、マグネトソームの細胞骨格系であるアクチン様蛋白質 MamK とそのアクセサリ蛋白質である MamJ が相互作用により、どのような特性の細胞骨格を形成するかを分子レベルで明らかにし、マグネトソームの表層に形成される細胞骨格の実態を明らかにした。この結果は、細胞骨格による原核細胞オルガネラの配置機構に新しい知見をもたらしており、当該分野の発展や細菌オルガネラを用いた応用研究に貢献する。

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 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 -

1. 著者名 Kikuchi Yousuke, Obana Nozomu, Toyofuku Masanori, Koderā 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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takumi Saito, Yousuke Kikuchi, Azuma Taoka
2. 発表標題 Functional Analyses of Magnetosomal Cytoskeleton Binding Protein MamJ Using High-speed Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 World Microbe Forum (ASM Microbe and FEMS Congress 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yousuke Kikuchi, Masanori Toyofuku, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Azuma Taoka
2. 発表標題 High-speed AFM phase imaging visualized physical behavior of bacterial membrane vesicles in living bacterial cell surface
3. 学会等名 EMBO Workshop Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤拓海、菊池洋輔、田岡東
2. 発表標題 マグネトソームタンパク質MamJによるMamK細胞骨格の重合制御
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下茂梨乃、菊池洋輔、田岡東
2. 発表標題 マグネトソーム鎖の細胞内配置の制御に関わるMamYタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下茂 梨乃、菊池 洋輔、田岡 東
2. 発表標題 マグネトソームの細胞内配置の制御に関わるMamY タンパク質の機能解析
3. 学会等名 2022年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤拓海、菊池洋輔、江口友佳子、田岡東
2. 発表標題 マグネトソームタンパク質 MamJ によるMamK細胞骨格の重合制御
3. 学会等名 2022年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺 信嗣, Linhao Sun, 菊池 洋輔, 田岡 東
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡による生きた細菌表層のナノスケール物性およびその動態の観察
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田岡東, 齋藤拓海, 菊池洋輔
2. 発表標題 マグネトソーム蛋白質MamJによるMamK細胞骨格の重合制御
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

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 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 澤田 新菜, 菊池 洋輔, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 マグネトソームの細胞内配置を担うアクチン様蛋白質MamKの機能保存性
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
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 田岡 東
2. 発表標題 細菌のオルガネラ?!: 磁石を作る細菌のユニークな生存戦略
3. 学会等名 e教育サロン第85回勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2020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

〔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
研究協力者	江口 友佳子 (Eguchi Yukako)		

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			
米国	University of California, Berkeley			