

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2010 年

課題番号：20246119

研究課題名（和文）磁性細菌のバイオミネラリゼーション機構を利用した高機能ナノ粒子の創製

研究課題名（英文）Development of functional nano-particles using biomineralization process in magnetic bacteria

研究代表者

松永 是 （ MATSUNAGA TADASHI ）

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10134834

研究成果の概要（和文）：本研究では、磁性細菌の酸化鉄バイオミネラリゼーションに関与するタンパク質を利用したナノ無機材料合成法の開発を目的とした。磁性細菌が合成する磁性ナノ粒子の形態制御タンパク質を用いて、粒子の形態、サイズ、特性を精密制御する系を構築した。また、Bar domain 構造を持つタンパク質を利用したリポソームの空間制御による粒子の形態制御を可能とする技術、鉄イオントランスポーターを利用したシーケンシャルな粒子形成プロセスの構築に成功した。ここで開発されたナノ磁性材料は、バイオテクノロジー分野における高性能磁性担体や磁気記録材料等としての利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for synthesis of functional nano-particles using proteins involved in magnetite biomineralization of magnetotactic bacteria. Shape, size and magnetic property of nano-particles were regulated by using proteins responsible for magnetite crystal formation. Bar domain protein was used to control space for nano-crystal synthesis, and iron transporter protein was used for establishment of sequential crystal formation process in liposomes. The nano-particles developed in this study will be used as nano-materials in the fields of biotechnology and magnetic recordings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	20,000,000	6,000,000	26,000,000
2009 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオミネラリゼーション、バイオミネティクス、結晶核形成、微小反応場、高保磁力磁性材料、機能性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

温和な条件下において緻密に制御されたバイオミネラルの合成機構は、自己組織化に基づくボトムアップ的ナノ構造形成プロセスの代表的な例であり、現在、このバイオミ

ネラリゼーション機構を模倣した次世代の機能性材料の創製に向けて、盛んに研究が行われている。

磁性細菌は細胞内にナノサイズの磁性粒子を合成する微生物である。この粒子は、マ

グネタイトの単結晶であり、緻密な制御の下で、多面体や弾丸状、勾玉状といった細菌種によって異なる形態を持つ粒子が合成される。これまで我々は、世界で初めて磁性細菌の全ゲノム解析に成功し、これに基づいてプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を行ってきた。このうち、磁性ナノ粒子に強固に結合した4つのタンパク質 Mms5、Mms6、Mms7、Mms13 を発見し、これらのタンパク質が粒子の結晶核形成を制御していることを見出した。また、Bar domain 構造を有する新規のタンパク質の発見により、リボソームのチューブ化にも成功した。そこで、磁性細菌の磁性ナノ粒子の形成機構を利用し、工学的に利用価値の高い磁性体の材料開発を行うことが可能であると考えられ、用途に合わせた形態や磁気特性を有する磁性ナノ粒子の合成技術の確立が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、磁性細菌の細胞内に合成される磁性ナノ粒子の形成機構を利用した高機能ナノ粒子の創製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結晶核形成タンパク質の核形成部位を利用した磁性ナノ粒子の合成

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株の磁性ナノ粒子に強固に結合するタンパク質 Mms6 により粒子結晶の核形成が制御されることが示され、Mms6 を利用した磁性ナノ粒子の結晶核形成制御技術が確立された。そこで、当該技術をさらに発展させ、Mms6 のアミノ酸配列を模倣したペプチドまたはこのアミノ酸配列を改変したペプチドの存在下で部分酸化法により磁性粒子を合成し、透過型電子顕微鏡を用いて粒子の形態観察を行った。また、振動試料型磁力計を用いた粒子の磁気測定により、合成した粒子の磁気特性を評価した。さらに、Mms6 の C 末端の酸性アミノ酸領域のペプチド存在下で合成した粒子に対し、金コロイドを反応させ、粒子の結晶面上における金コロイド標識ペプチドの局在性解析を行った。

(2) Bar domain タンパク質を利用したリボソームの空間制御による磁性ナノ粒子の形態制御

成長過程にある数 nm~数十 nm サイズの粒子に局在する Bar domain 構造を持つタンパク質 MamY を利用し、リボソームのチューブ化能評価を行った。また、同タンパク質を用いて、磁性ナノ粒子合成の微小空間内としてのリボソームの形態制御について検討を行った。

(3) 結晶核形成タンパク質の発現制御によ

る磁性ナノ粒子の形態制御

相同性組み換え法により、磁性細菌 AMB-1 株の磁性ナノ粒子の結晶形態を制御することが示唆される4つの遺伝子 (*mms5*, *mms6*, *mms7*, *mms13*) について、各遺伝子を欠損させた欠損株の構築を行った。透過型電子顕微鏡を用いて、各欠損株の細胞内に合成された磁性粒子の形態観察を行った。また、構築した欠損株に対し欠損させた遺伝子のコンプリメンテーションを行い、コンプリメンテーション株の解析を行った。

(4) リボソームのナノ空間を用いたシーケンシャルな結晶形成反応プロセスの構築

磁性細菌 AMB-1 株から同定されたタンパク質 MagA は、磁性粒子表面膜上に存在し、鉄イオンの輸送活性を有する。そこで、組み換え大腸菌から調製した MagA を用いて反転膜小胞を作製し、ATP の添加によりプロトン勾配を形成させた後、鉄イオンを添加し、鉄イオンの輸送活性の評価を行った。さらに、シーケンシャルな結晶形成反応プロセス構築に向けたリボソーム内へのイオン導入システムの確立及び構築したリボソーム内での磁性結晶合成を検討した。

(5) タンパク質の自己集積化能を利用した磁性ナノ粒子の形態制御

磁性細菌 AMB-1 株から分離されたタンパク質 Mms6 は、鉄結合タンパク質であることが示唆されている。そこで、Mms6 を利用し、溶液中での分子集合状態の制御に基づいた磁性ナノ材料の合成について検討を行った。まず、組み換え大腸菌から、非イオン性界面活性剤を用いて構造を保持する Mms6 の調製を行った。この Mms6 に対し、鉄イオンの添加を行った上で、多角度光散乱検出器、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いて解析を行った。また、円二色性分散計を用いて、鉄イオンの添加における二次構造変化を測定した。

(6) バイオミネラリゼーションによる無機粒子材料の合成

磁性細菌 AMB-1 株の培地中にマンガン、コバルト、銅などの金属イオン、及び酸化テルル、セレンを添加して培養を行った。その後、透過型電子顕微鏡を用いて磁性細菌の観察を行い、これらの無機イオンの取り込みによる細胞の影響を評価した。

(7) 生体適合性の高い磁性ナノ粒子の合成

細胞への非特異的吸着の低減に向けた新規の磁性ナノ粒子の開発を目的とし、中性アミノ酸かつ極性アミノ酸から成る NS ポリペプチドをリンカーとして用いた protein G を磁性細菌の粒子上に発現させる系の構築を

行った。この protein G 発現粒子に対し、粒子と細胞の相互作用に及ぼす NS ポリペプチドリンカーの効果について評価を行った。

4. 研究成果

(1) 結晶核形成タンパク質の核形成部位を利用した磁性ナノ粒子の合成

Mms6 のアミノ酸配列を模倣したペプチドの存在下で磁性ナノ粒子合成を行った。透過型電子顕微鏡による粒子の形態観察を行った結果、Mms6 の C 末端の酸性アミノ酸領域から成るペプチド存在下で合成した粒子から 14 面体の形態が確認された (図 1)。この結

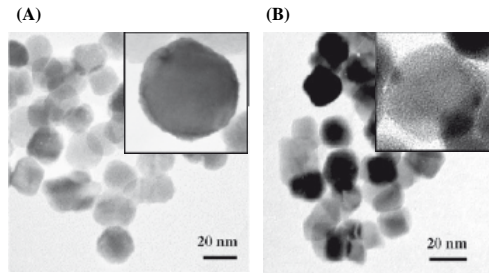


図 1. Mms6 存在下 (A)、Mms6 の C 末端ペプチド存在下 (B) で合成した磁性ナノ粒子の電子顕微鏡写真

果は、磁性ナノ粒子及び Mms6 存在下で合成された粒子と同様の形態を示すことから、Mms6 の酸性アミノ酸を多く含む C 末端領域が鉄イオンと相互作用をし、磁性ナノ粒子の結晶核形成を行う機能性部位であると考えられた。また、ペプチド存在下で合成した磁性ナノ粒子に対し、振動試料型磁力計を用いた特性評価を行った。その結果、Mms6 の自己集積化能に寄与していると考えられるグリシン、ロイシンの繰り返し配列を示す N 末端部位と結晶核形成配列である C 末端部位を融合したペプチドの存在下で合成した粒子において、高い保磁力を示す磁性粒子の合成が可能であることが示された。さらに、合成された粒子の結晶面上における金コロイド標識ペプチドの局在性解析を行った。その結果、Mms6 の C 末端の酸性アミノ酸領域のペプチドが粒子の (100) 面に局在する傾向が見られた。したがって、Mms6 の C 末端部位のペプチドが粒子の (100) 面に特異的吸着を行うことにより、粒子の形態制御が行われていることが考えられた。以上の結果から、磁性ナノ粒子の結晶核形成分子の結晶面認識が解明され、結晶核形成タンパク質の結晶核形成分子の改変による高機能な磁性ナノ粒子合成の基盤技術が確立された。

(2) Bar domain タンパク質を利用したリポソームの空間制御による磁性ナノ粒子の形態制御

サイズの小さな磁性ナノ粒子に特徴的に

存在するタンパク質 MamY は Bar domain 構造を有し、細胞内において膜小胞の形成に関与している。また、Bar domain 構造を持つタンパク質はリポソームのチューブ化能を有することが知られており、MamY についても同様の機能を有することが確認された。そこで、MamY を用いて、磁性粒子合成のための微小空間内でのリポソームの形態制御を検討した。その結果、タンパク質濃度やイオン強度、pH といった反応条件の緻密な制御により、リポソームの形態を球状またはチューブ状に制御することが可能であることが示された (図 2)。以上の結果から、MamY はある特定のサイズの球状リポソームの曲面を認識し、結合することにより、リポソームの形態を制御すると考えられた。このことから、高度に制御された微小空間内における磁性ナノ粒子の形態制御が可能であることが示された。

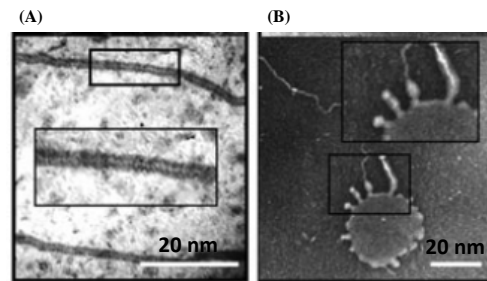


図 2. MamY 濃度の違いによるリポソームの電子顕微鏡写真
リポソームとの反応に低濃度 (A) 及び高濃度 (B) の MamY を用いた。

(3) 結晶核形成タンパク質の発現制御による磁性ナノ粒子の形態制御

磁性細菌 AMB-1 株に対し、磁性ナノ粒子の結晶形態を制御することが示唆されている 4 つの遺伝子 *mms5*, *mms6*, *mms7*, *mms13* について、相同性組み換え法により各遺伝子を欠損させた欠損株を構築した。透過型電子顕微鏡を用いて、各遺伝子欠損株が合成した磁性ナノ粒子を観察した結果、野生株の細胞内に合成された粒子が 14 面体であるのに対し、*mms6* 遺伝子欠損株では長形、*mms7* 遺伝子欠損株ではダンベル状の粒子が合成され、これら 2 種の遺伝子欠損株について大幅な粒子の形態変化が確認された (図 3)。また、これらの欠損株に対し、粒子の結晶面を高分解能透過型電子顕微鏡により観察した結果、野生株は主に (110) と (111) 面から構成されていたが、欠損株は全体的に不明瞭な結晶面を保持していることが確認された。さらに、粒子の長径及び短径を測定し、遺伝子欠損株と野生株の粒子サイズの比較結果から、欠損株では粒径の小さな粒子が合成されていることが明白であった。すでに *in vitro* の実験系において Mms6 タンパク質が磁性ナノ粒子の形態

制御に関与していることが示唆されているが、今回 *in vivo* の実験系においてこれらのタンパク質が粒子の形態制御に機能していることが示された。加えて、欠損株における遺伝子のコンプリメンテーションを行った結果、結晶形態及びサイズの回復が確認された。以上の結果から、同タンパク質の発現制御によって結晶形態の制御を行うことに成功した。

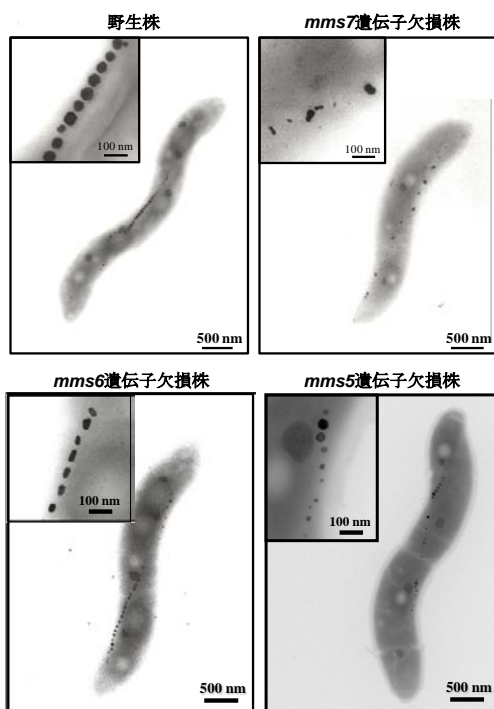


図3. 磁性細菌の野生株と遺伝子欠損株の電子顕微鏡写真

(4) リポソームのナノ空間を用いたシーケンシャルな結晶形成反応プロセスの構築

磁性細菌AMB-1株のタンパク質MagAを組み換え大腸菌から調製後、反転膜小胞を作成し、MagAにおける鉄イオンの輸送活性の評価を行った。その結果、ATPの添加により生じたプロトン勾配が駆動力となり、リポソーム上に導入されたMagAがリポソーム内に能動的に鉄イオンの取り込みを行うことが確認された。また、MagAを同リポソーム内へ構築し、鉄イオンの輸送を行うことにより、磁性ナノ粒子の形成が可能となった。以上の結果により、リポソームというナノ空間内において結晶合成を行うことに成功し、生体適合性の高い脂質二重膜被覆結晶を合成する基礎技術を確立した。

(5) タンパク質の自己集積化能を利用した磁性ナノ粒子の形態制御

組み換え大腸菌から調製したMms6に対し、鉄イオンの添加を行い、多角度光散乱検出器、

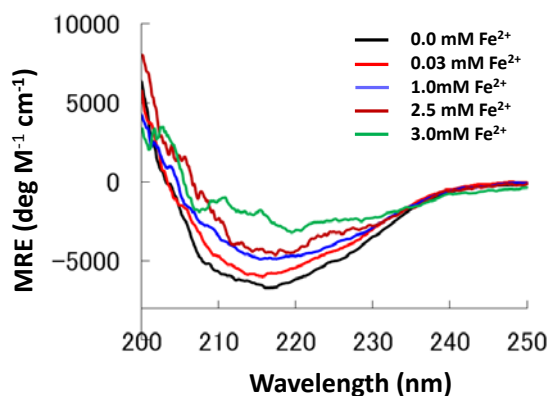


図4. 鉄イオンとの結合に伴うMms6の二次構造変化

電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いて解析した結果、均一なサイズの分子集合体が確認された。このことから、鉄との結合により、溶液中のMms6が自己集合し、多量体を形成したと考えられた。さらに、円二色性分散計を用いた測定により、鉄イオン存在下ではMms6の二次構造が変化することが確認された(図4)。また多量体を形成したタンパク質を用いて磁性粒子合成を行った結果、単量体のタンパク質を用いた場合とは異なるサイズ、形態を有する粒子が合成された。以上の結果から、Mms6の溶液中での分子集合状態が鉄イオンの存在により制御可能であることが明らかになり、この制御によって形態やサイズを自在に制御する磁性ナノ粒子の合成技術を構築した。

(6) バイオミネラリゼーションによる無機粒子材料の合成

磁性細菌AMB-1株の培地中に酸化テルルを添加した結果、磁性細菌の細胞内に酸化テルルが取り込まれ、酸化鉄結晶とテルリウム結晶がそれぞれ独立して形成されることが確認された。本研究により、磁性細菌への酸化テルルの取り込みが初めて確認され、磁気回収を利用した磁性細菌によるバイオレメディエーションが可能であることが示された。また、磁性細菌の細胞内への無機イオンの蓄積は、セレンについても同様に確認された。また、マンガン、コバルト、銅については、磁性細菌の粒子結晶へのドーピングによる磁性粒子特性の変化が確認され、磁性粒子特性の制御が可能であることが考えられた。以上の結果から、磁性細菌のバイオミネラリゼーション機構を利用することで、磁性ナノ粒子を用いた新規の材料合成のための基盤技術を確立することに成功した。

(7) 生体適合性の高い磁性ナノ粒子の合成

NSポリペプチドリンカーを用いて、protein Gを効率的に磁性ナノ粒子表面に発

現する系の構築に成功した。このうち、アミノ酸 100 残基の鎖長から成る NS ポリペプチドリンカーを用いた磁性粒子では、溶液中での粒子の分散性の向上が確認され、これが起因となり、抗体固定化粒子の抗原細胞結合能が向上した。また、細胞の非特異的吸着による回収を評価した結果、複数の細胞について非常に低いことが確認された。これは、粒子表面に存在する NS ポリペプチドリンカーの立体障害によって粒子と細胞間の相互作用が減少した結果、粒子上への細胞の非特異的吸着が抑制されたことが考えられた。以上の結果により、100 残基のアミノ酸から成る NS ポリペプチドを磁気担体として用いた磁気細胞分離により、高純度かつ高回収率に目的細胞の分離を行うことが可能であると考えられた。また、本磁性細菌のタンパク質発現システムおよび NS ポリペプチドリンカーを用いた磁性ナノ粒子の表面修飾技術の利用により、様々な機能性粒子の開発が可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① M. Tanaka, E. Mazuyama, A. Arakaki, T. Matsunaga: “Mms6 Protein Regulates Crystal Morphology during Nano-sized Magnetite Biomineralization *In Vivo*.” *J. Biol. Chem.*, 286, 6386-6392 (2011) 査読有
- ② Y. Maeda, T. Yoshino, T. Matsunaga: “*In Vivo* Biotinylation of Bacterial Magnetic Particles by Truncated form of *Escherichia coli* Biotin Ligase and Biotin Acceptor Peptide.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 5785-5790 (2010) 査読有
- ③ M. Takahashi, T. Yoshino, T. Matsunaga: “Surface Modification of Bacterial Magnetic Nanoparticles Using Asparagines-serine Polypeptide Designed to Control Interactions with Cell Surface.” *Biomaterials*, 31, 4952-4957 (2010) 査読有
- ④ M. Tanaka, A. Arakaki, SS. Stanilan, T. Matsunaga: “Simultaneously Discrete Biomineralization of Magnetite and Tellurium Nanocrystals in Magnetotactic Bacteria.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 5526-5532 (2010) 査読有
- ⑤ M. Tanaka, A. Arakaki, T. Matsunaga: “Identification and Functional Characterization of Liposome Tubulation Protein from Magnetotactic Bacteria.” *Mol. Microbiol.*, 76, 480-488 (2010) 査読有
- ⑥ A. Arakaki, M. Shibusawa, M. Hosokawa, T. Matsunaga: “Preparation of Genomic DNA from a Single Species of Uncultured Magnetotactic Bacterium by Multiple Displacement Amplification.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1480-1485 (2010) 査読有
- ⑦ T. Yoshino, A. Shimojo, Y. Maeda, T. Matsunaga: “Inducible Expression of Transmembrane Proteins on Bacterial Magnetic Particles in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1” *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1152-1157 (2010) 査読有
- ⑧ P. Kaur, Y. Maeda, AC. Mutter, T. Matsunaga, Y. Xu, H. Matsui: “Three-dimensional Directed Self-assembly of Peptide Nanowires into Micrometer-sized Crystalline Cubes with Nanoparticle Joints.” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 49, 8375-8378 (2010) 査読有
- ⑨ A. Arakaki, F. Masuda, Y. Amemiya, T. Tanaka, T. Matsunaga: “Control of the Morphology and Size of Magnetite Particles with Peptides Mimicking the Mms6 Protein from Magnetotactic Bacteria.” *J. Colloid Int. Sci.*, 343, 65-70 (2010) 査読有
- ⑩ 新垣 篤史: “ナノ磁石を合成する細胞内小器官化学” 65, 68-69 (2010) 査読無
- ⑪ 松永 是, 新垣 篤史: “磁石を作る細菌のゲノム” *生物の科学*, 64, 85-91 (2010) 査読無
- ⑫ H. Nakazawa, A. Arakaki, S. Narita-Yamada, I. Yashiro, K. Jinno, N. Aoki, A. Tsuruyama, Y. Okamura, S. Tanikawa, N. Fujita, H. Takeyama, T. Matsunaga: “Whole Genome Sequence of *Desulfovibrio magneticus* Strain RS-1 Revealed Common Gene Clusters in Magnetotactic Bacteria.” *Genome Res.*, 19, 1801-1808 (2009) 査読有
- ⑬ Y. Maeda, T. Yoshino, T. Matsunaga: “Novel Nanocomposites Consisting of *In Vivo*-biotinylated Bacterial Magnetic Particles and Quantum Dots for Magnetic Separation and Fluorescent Labeling of Cancer Cells.” *J. Mater. Chem.*, 19, 6361-6366 (2009) 査読有
- ⑭ M. Kuhara, T. Yoshino, M. Shiokawa, T. Okabe, S. Mizoguchi, A. Yabuhara, H.

- Takeyama, T. Matsunaga: “Magnetic Separation of Human Podocalyxin-like Protein 1 (hPCLP1)-positive Cells from Peripheral Blood Using Anti-hPCLP1 Monoclonal Antibody and Protein A Expressed on Bacterial Magnetic Particles.” *Cell Struct. Funct.*, 34, 23-30 (2009) 査読有
- ⑮ T. Matsunaga, M. Nemoto, A. Arakaki, M. Tanaka: “Proteomic Analysis of Irregular Bullet-shaped Magnetosomes in the Sulfate-reducing Bacterium *Desulfovibrio magneticus* RS-1.” *Proteomics*, 9, 3341-3352 (2009) 査読有
- ⑯ T. Yoshino, T. Nishimura, T. Mori, S. Suzuki, H. Kambara, H. Takeyama, T. Matsunaga: “Nano-sized Bacterial Magnetic Particles Displaying Pyruvate Phosphate Dikinase for Pyrosequencing.” *Biotechnol. Bioeng.*, 103, 130-137 (2009) 査読有
- ⑰ M. Takahashi, Y. Akiyama, J. Ikezumi, T. Nagata, T. Yoshino, A. Iizuka, K. Yamaguchi, T. Matsunaga: “Magnetic Separation of Melanoma-specific Cytotoxic T Lymphocytes from a Vaccinated Melanoma Patient’s Blood Using MHC/Peptide Complex-conjugated Bacterial Magnetic Particles.” *Bioconjugate Chem.*, 20, 304-309 (2009) 査読有
- ⑱ M. Takahashi, T. Yoshino, H. Takeyama, T. Matsunaga: “Direct Magnetic Separation of Immune Cells from Whole Blood Using Bacterial Magnetic Particles Displaying ProteinG.” *Biotechnol. Prog.*, 25, 219-226 (2009) 査読有
- ⑲ Y. Maeda, T. Yoshino, M. Takahashi, H. Ginya, J. Asahina, H. Tajima, T. Matsunaga: “Noncovalent Immobilization of Streptavidin on *In Vitro* and *In Vivo*-biotinylated Bacterial Magnetic Particles.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5139-5145 (2008) 査読有
- ⑳ T. Yoshino, C. Kajia, M. Nakai, F. Saito, H. Takeyama, T. Matsunaga: “Novel Method for Evaluation of Chemicals Based on Ligand-dependent Recruitment of GFP Labeled Coactivator to Estrogen Receptor Displayed on Bacterial Magnetic Particles.” *Anal. Chim. Acta*, 626, 71-77 (2008) 査読有
- ㉑ T. Yoshino, H. Hirabe, M. Takahashi, M. Kuhara, H. Takeyama, T. Matsunaga:

“Magnetic Cell Separation Using Nano-sized Bacterial Magnetic Particles with Reconstructed Magnetosome Membrane” *Biotechnol. Bioeng.*, 101, 470-477 (2008) 査読有

- ㉒ T. Tanaka, Y. Kokuryu, T. Matsunaga: “Novel Method for Selection of Antimicrobial Peptides from a Phage Display Library by Use of Bacterial Magnetic Particles” *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 7600-7606 (2008) 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- ① T. Matsunaga: “Controlled Mechanism of Iron Oxide Nano-Crystal Formation in Magnetotactic Bacteria”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009/7/29, Nagoya Congress Center (Nagoya)
- ② T. Matsunaga: “Bacterial Magnetite as an Element in Nanotechnology”, Gordon Research Conference, 2008/8/13, New London (USA)
- 他 23 件

[図書] (計 2 件)

- ① 新垣 篤史 (2009) 「磁性細菌のゲノム情報に基づいた機能性ナノ磁性材料の開発」、マリンメタゲノムの有効利用、シーエムシー出版、総ページ数 13
- ② 松永 是 (2008) 「バイオナノ磁気ビーズの医療応用」、表面技術、総ページ数 5

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~matunaga/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 是 (MATSUNAGA TADASHI)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：10134834

(2) 研究分担者

新垣 篤史 (ARAKAKI ATSUSHI)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：10367154