

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18913

研究課題名（和文）生体内物質輸送に資する磁場制御可能な革新的細胞型キャリアの構築

研究課題名（英文）Construction of innovative cellular carrier controllable with magnetic field for in vivo material transport

研究代表者

新垣 篤史（Arakaki, Atsushi）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10367154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細菌の磁性ナノ粒子合成能と細胞膜組成を改変し、磁場への高い応答性と自発的な運動能を備えた細胞型キャリアを作出することを目的とした。遺伝子組換えによって、細胞の磁性ナノ粒子の数とサイズの制御が可能であり、これによって細胞の磁場応答性が向上することを示した。また、細胞の磁気応答機能を定量的に評価する新しい系を構築し、磁性ナノ粒子合成能の異なる細胞の磁気応答能の定量的な評価が可能であることを示した。さらに、ホスファチジルコリン合成酵素の遺伝子発現により、細胞膜組成におけるホスファチジルコリンの含有量を高めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝子組換えによる細菌細胞の磁気応答能と膜構造を大きく改変可能であることを示した。遺伝子組換えによる人工細胞創出の方法と実現可能性を示した点で学術的な意義がある。将来的な応用としては、磁気ドラッグデリバリーシステムへの利用に加え、磁気ハイパーサーミアやMRI造影剤としての利用が考えられる。また本研究で得られる成果は、生物による物質生産の回収技術、ナノ材料開発等の分野にも波及効果があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to modify the magnetic nanoparticle synthesis capability and cell membrane composition of bacteria to construct a cell-type carrier with high magnetic responsiveness and spontaneous motility. We showed that genetic modification can control the number and size of magnetic nanoparticles in cells, thereby enhancing magnetic responsiveness of the cells. We also established a new method to quantitatively evaluate the magnetic response function of cells, and showed that it is applicable to quantitatively evaluate the magnetic response ability of cells with different magnetic nanoparticle synthesis capabilities. Furthermore, we succeeded in increasing the content of phosphatidylcholine in the cell membrane composition by gene expression of phosphatidylcholine synthase.

研究分野：生物工学

キーワード：物質輸送 バイオミネラルリゼーション 遺伝子発現制御 生体機能利用

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

磁性ナノ粒子は、外部磁場の照射により誘導可能であることから、磁気ドラッグデリバリーシステム (DDS) 等に利用するキャリア材料として医療への応用展開が期待されている。その実現に向けた大きな技術課題として、腫瘍へのキャリアの到達効率の低さが挙げられている。約 10 年間の DDS 及び磁気ハイパーサーミアに関する調査研究によると、血中投与した磁性ナノ粒子の腫瘍部への平均到達率は約 0.7%と報告されている (Nat. Rev. Mater., 1, 16014 (2016))。この主な要因として、生体内投与した磁性ナノ粒子のターゲティング機能の低さと共に、粒子がヒトの生体防御に関わる免疫細胞により捕捉され、標的組織へ送達できないことが挙げられている。この課題解決に向けては、腫瘍マーカー抗体を表面修飾した磁性ナノ粒子の利用や、ポリマーに包埋した磁性ナノ粒子を腫瘍に効率的に集積化する手法等が提案されている。

2. 研究の目的

標的組織へのキャリア到達率の向上を目的として、本研究では、外部磁場によって、人為的に泳ぐ方向を制御可能な磁性細菌を磁気 DDS の新規キャリア材料としての利用を提案した。磁性細菌は、多様な水圏に生息する一種の環境細菌である。環境水中に含まれる微量の鉄イオンを細胞の中に取り込み無機化することで、直径約 40 nm の酸化鉄(Fe_3O_4)磁性ナノ粒子を合成する機能を持つ。この細菌は、鞭毛モーターを持つことから自発的に泳動することができ、外部磁場の照射によって泳ぐ方向を制御することができる。細菌は数 μm であり、血球細胞より小さく、直径 5 ~ 20 μm の毛細血管も十分にすり抜けられるサイズである。さらに遺伝子組換え技術が確立されていることから、細胞表面構造の改変や細胞表層への分子発現による多機能化や、薬として機能する抗体等の生体分子を細胞内で産生させることも可能であり、将来的には拡張性の高いキャリアとなり得ると考えた。

本研究では、磁性細菌を基本骨格として利用し、遺伝子組換えによって生体内物質輸送に利用する新規細胞型キャリアを構築することを最終ゴールとして、具体的には、下記の 2 項目について検討を行った。

- キャリア細胞の磁気応答機能の強化と評価系の構築
- キャリア細胞の膜組成の改変

3. 研究の方法

本研究では、複数種類の磁性細菌分離株の中から *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株を選択し、利用することとした。本株については、全ゲノム情報が得られ、遺伝子組換え技術が確立されている。また、磁性ナノ粒子の合成に関わる遺伝子群が同定され、その分子機構の詳細がわかっている。AMB-1 株は、長鎖 DNA を高効率にゲノムに組み込むことで大規模組換えが可能であることから、同株を細胞型キャリア構築の材料として選択した。

(1)磁性ナノ粒子合成遺伝子を高発現する細胞の作出

誘導剤の添加により制御可能なオペレーター配列をプロモーター部位に連結し、磁性ナノ粒子合成に関わる 2 つの遺伝子オペロンの発現が制御可能なプラスミドをそれぞれ作製した。同オペロンを含むプラスミドを AMB-1 株に導入した遺伝子組換え細胞を、それぞれ A 株、B 株とした。遺伝子の発現量は、RT-qPCR により評価した。磁性ナノ粒子の合成数は、透過型電子顕微鏡観察により評価した。磁性ナノ粒子の粒子サイズは、電子顕微鏡像における粒子の長径と短径の平均として求めた。

(2)ホスファチジルコリン合成酵素を発現する細胞の作出

AMB-1 株の遺伝子組換えにより、ホスファチジルコリン合成酵素をコードする遺伝子を導入した細胞を作出した。培養液に終濃度が 0, 20, 80, 200 μM となるようにコリンを添加し、細胞の培養を行った。細胞から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを用いてリン脂質組成の解析を行った。

(3)細胞の磁気応答機能の評価方法

モデル細胞として、遺伝子組換えにより磁性ナノ粒子数が向上した組換え株、および磁気微粒子合成能を失った遺伝子欠損株の 2 株を用いた。顕微鏡観察下の細胞に磁場を 180° 回転させながら印加し、その時の細胞の動きを動画として記録した。その後、取得した動画から得られた任意の時間の画像を画像解析ソフトウェアで処理し、各細胞を楕円に近似することで軸の回転角度を算出した。

4. 研究成果

(1)細胞の磁性ナノ粒子合成能の強化

細胞の磁気応答機能を強化するため、磁性ナノ粒子合成に関わる遺伝子の発現誘導が可能な2種類の細胞を作出した。誘導剤添加に伴う遺伝子発現量の変化を解析したところ、遺伝子発現量は誘導剤濃度に依存して増加した。A株では、相対発現量は誘導剤濃度が500 ng/mlの条件で最大となり、未添加条件の約2.5倍であった。一方、B株では、誘導剤濃度が300 ng/mlの条件においてその相対発現量が最大となり、未添加条件の約2.5倍であった。

次に、誘導剤添加が、細胞の磁性ナノ粒子合成に与える影響を評価した。細胞内の磁性ナノ粒子の数及びサイズは、透過型電子顕微鏡により観察した。A株は、誘導剤濃度が300 ng/mlの条件において、磁性ナノ粒子のサイズが最大となり、 55.4 ± 23.0 nmの平均粒子サイズを示した(Table 1)。B株においても誘導剤濃度300 ng/mlの条件において、最大 60.6 ± 19.2 nmの平均粒子サイズを示した。いずれの細胞においても、未添加条件と比較して粒子サイズが約2倍に増加した。また、B株においては誘導剤濃度の増加に伴い、1細胞当たりの粒子数が増加した。以上より、磁性ナノ粒子合成に関わる遺伝子の発現制御により、細胞の合成する磁性ナノ粒子の数とサイズの制御が可能であることを示した。

Table 1 磁性ナノ粒子合成に関わる遺伝子の発現誘導の粒子数、粒子サイズへの影響

細胞	誘導剤濃度 (ng/ml)	粒子数 (粒子/細胞)	粒子サイズ (nm)
A	0	19.2 ± 2.9	26.1 ± 10.7
	100	16.4 ± 3.4	29.4 ± 15.1
	300	22.8 ± 2.9	55.4 ± 23.0
	500	13.2 ± 4.9	21.0 ± 10.0
B	0	18.6 ± 2.9	29.1 ± 9.1
	100	22.2 ± 5.5	33.2 ± 10.6
	300	29.0 ± 3.8	60.6 ± 19.2
	500	0	N.A.

N.A.: not applicable.

(2)細胞の磁気応答機能の評価系の構築

細胞の磁気応答機能は、細胞が有する磁性ナノ粒子数とサイズに依存すると考えられる。そこで、顕微鏡観察下における細胞の磁場への応答能を、1細胞レベルで定量的に評価する系を構築した。モデルとして、磁性ナノ粒子の合成数が既知の複数の細胞を用いた。細胞の磁気応答機能の評価する特徴量として、外部から印加した磁場の回転に伴う細胞の回転運動に着目した。顕微鏡観察下において、複数細胞を1細胞レベルで同時観察することで細胞回転運動の評価指標を抽出し、これを用いて細胞磁気応答能の新しい定量的評価系を構築した。細胞に 180° の回転磁場を印加しながら動画撮影したところ、磁性ナノ粒子を持たない細胞は磁場方向に依存しない運動をするのに対し、磁性ナノ粒子を持つ細胞は磁場方向に従って 180° 回転する様子が観察された。この2株を用いて、磁場を 180° 回転する1秒間における細胞の角度変位をグラフ化し、磁気応答機能を定量的に示すことが可能であった。本評価系により、これまでに作出した磁性ナノ粒子合成能の異なる細胞の磁気応答能の定量的な評価が可能であることを示した。

(3)細胞の膜組成の改変

細胞の膜組成を改変するため、遺伝子組換えによって、ホスファチジルコリン合成酵素を発現する細胞株を作出した。同細胞をコリン濃度の異なる培地で培養した後、細胞から抽出した脂質の組成解析を行った結果、コリン濃度に依存してホスファチジルコリン含有率の増加が確認された (Fig. 1)。AMB-1株はホスファチジルコリンを合成しないことから、その含有率の増加は、導入したホスファチジルコリン合成酵素によることが示された。コリン添加濃度 $0 \mu\text{M}$ の条件ではホスファチジルコリン含有率は0%であったのに対し、 $20 \mu\text{M}$ では約6%、 $80 \mu\text{M}$ では約13%、 $200 \mu\text{M}$ では約20%まで増加した。また、ホスファチジルコリン含有率の増加に伴い、ホスファチジルグリセロール含有率の低下が確認された。このことから、リン脂質合成酵素の導入により、細胞の膜組成を調節可能であることが示された。また、同手法によって、AMB-1株の膜組成をヒト細胞の膜組成に近づけることが可能であることが示された。

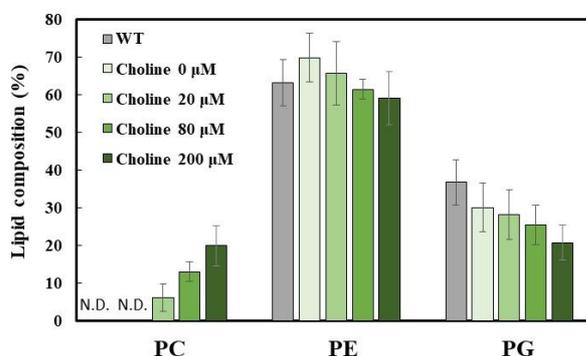


Fig. 1 ホスファチジルコリン合成酵素発現株の細胞膜組成。PC: ホスファチジルコリン、PE: ホスファチジルエタノールアミン、PG: ホスファチジルグリセロール。WT: 野生株。

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 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kosuke Arai, Satoshi Murata, Taifeng Wang, Wataru Yoshimura, Mayumi Oda-Tokuhisa, Tadashi Matsunaga, David Kisailus, Atsushi Arakaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Adsorption of Biomineralization Protein Mms6 on Magnetite (Fe3O4) Nanoparticles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23105554	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 該当する

1. 著者名 Ryoto Tomoe, Kazushi Fujimoto, Tsuyoshi Tanaka, Atsushi Arakaki, David Kisailus, Tomoko Yoshino	4. 巻 136
2. 論文標題 Lipid Membrane Modulated Control of Magnetic Nanoparticles within Bacterial Systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 253-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.06.007.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三浦知優、篠原奈々美、松永是、新垣篤史
2. 発表標題 磁気微粒子の形態制御に向けた磁性細菌固有の遺伝子群の異種発現
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新垣篤史
2. 発表標題 バイオミネラリゼーションタンパク質の 無機物吸着機能
3. 学会等名 第回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga
2. 発表標題 Adsorption of Biomineralization Protein to Inorganic Materials and its Relationship with Crystal Formation
3. 学会等名 International Marine Biotechnology Association Symposium: Biomaterials from the Sea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊野未菜、松永是、新垣篤史
2. 発表標題 結晶成長遺伝子群の発現量調節による磁性細菌粒子のサイズ制御
3. 学会等名 第12回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巴瞭斗、田中剛、吉野知子
2. 発表標題 シャペロン共発現によるマグネトソーム膜上の受容体活性の向上
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦知優、篠原奈々美、松永是、新垣篤史
2. 発表標題 ロッド状磁気微粒子の合成機構解明に向けた磁性細菌固有の遺伝子群の異種発現
3. 学会等名 第18回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生命分子工学研究室
<http://web.tuat.ac.jp/~biomol/index.html>

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 分 担 者	吉野 知子 (Yoshino Tomoko) (30409750)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

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
---------	---------