

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03466

研究課題名（和文）マグネトソーム膜のin vivo改質による膜タンパク質の機能向上

研究課題名（英文）Magnetosome membrane engineering to improve membrane protein activities in the magnetosome display system

研究代表者

吉野 知子（Yoshino, Tomoko）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30409750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、磁性細菌を宿主として用い、膜タンパク質の精製や再構築膜の作製等の前工程を必要とせずに創薬探索に直接利用できる、新しい膜タンパク質の調整方法を開発した。磁性細菌が合成するマグネトソーム（磁性粒子）を被覆する脂質膜を膜タンパク質のプラットフォームとして用い、遺伝子工学的な手法により膜組成を改質することで、ヒト由来膜タンパク質の機能発現を実現した。この方法により創製したヒト由来膜タンパク質-磁性粒子複合体は、創薬研究のハイスループット化を実現する画期的な方法へ応用することが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は、細胞のストレス応答やシグナル伝達などの生命現象を司る重要な役割を担い、主な臨床治療標的である。治療薬の多くがこの膜タンパク質に直接的または間接的に作用することから、膜タンパク質の解析ツール開発は創薬研究への貢献が期待できる。本研究では、マグネトソーム上への膜タンパク質発現に加え、さらなる機能化、利用性の拡大を図るためにマグネトソーム膜の改変技術確立した。本技術により、創薬研究のハイスループット化を実現する画期的な方法を提供すると共に、膜タンパク質の活性と脂質組成との関連性の包括的な理解が進むことが期待されることから、学術的な意義は大きいと判断される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new method for the preparation of membrane proteins using magnetic bacteria as a host, which can be directly used for drug discovery without the need for complicated processes such as purification of membrane proteins or preparation of reconstituted membranes. The lipid membrane covering the magnetosomes (magnetic particles) biosynthesized by magnetic bacteria was used as a platform for expression of membrane proteins, and the functional expression of human-derived membrane proteins was realized by modifying the composition of the membrane using a genetic engineering method. The human-derived membrane protein-magnetic particle complexes created by this method can be applied to innovative methods to realize high-throughput drug discovery research.

研究分野：生物学

キーワード：膜タンパク質 リン脂質 マグネトソーム 磁性細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞のストレス応答やシグナル伝達などの生命現象を司る重要な役割を担い、主な臨床治療標的となっている。治療薬の多くがこの膜タンパク質に直接的または間接的に作用することから、製薬メーカー各社はこの創薬探索研究に多くの資金を投入している。創薬探索の第一スクリーニングには膜タンパク質へのリガンド結合試験が欠かせないが、その前調製、すなわち「膜タンパク質の大量生産」、「精製」、「再構築膜の作製」に多くの技術的なハードルがある。膜タンパク質ごとに条件設定をする必要があるため、多くの時間と労力がこの前調製に費やされていた。また膜タンパク質の活性は細胞膜の脂質組成によっても影響を受けることが知られるが、膜環境とタンパク質活性との相関やその包括的な理解はほとんどなされていない。したがって、簡易・汎用化した脂質-膜タンパク質の調製法が確立できれば、創薬探索における革新的なプロセスを提案できることとなる。

研究代表者は、脂質二重膜で被覆されたナノメートルサイズの磁性粒子(マグネトソーム)を生合成する磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 を用い、そのナノ反応場であるマグネトソーム膜を外來タンパク質の足場として利用できることを示してきた。このマグネトソームを利用する最大の利点は、遺伝子組み換えにより、標的タンパク質と磁性粒子の複合体を生合成でき、外部磁場により細胞破砕液から磁気分離によって精製できることにある。申請者は膜タンパク質を局在させるプラットフォームとしてマグネトソーム表面を利用することを提唱してきた。これまでに、ヒト由来の G タンパク質共役受容体 (GPCR) (Yoshino et al. *AEM*, 2004) やチロシンキナーゼ受容体 (Sugamata et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013) とマグネトソームの複合体の創成に成功している。一連の研究を通して、同じ GPCR においてもマグネトソーム上での比活性が著しく異なっており、また総じて活性が低下する傾向にあることを見出している。主な原因の一つに真核生物と原核生物との細胞膜組成の違いが挙げられる。真核生物の細胞膜はホスファチジルコリン (PC) を主要成分とし、ホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルグリセロール (PG)、スフィンゴミエリン (SM)、糖脂質、コレステロールなどによって構成されているのに対し、原核生物である磁性細菌の細胞膜は主に PE、PG 及びカルジオリピン (CL) によって構成されている。原核生物の 90% が真核生物の主要なリン脂質である PC を持っていないことがわかっており、磁性細菌も PC を合成していないことが確認されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、磁性細菌のマグネトソーム膜の組成を自由に設計する技術を確立し、これまで困難であったヒト由来膜タンパク質を機能発現したマグネトソームの創製の実現を目指した。具体的には、(1) 磁性細菌の脂質代謝を明らかとし、遺伝子工学的な手法による代謝改変により、磁性細菌内での PC 合成を行った。また、(2) PC 含有量の異なるマグネトソームの作製技術を確立した。さらに(3) PC 導入の有無により、膜タンパク質の機能への影響評価を行った。マグネトソーム膜上への PC の導入に加え、(4) 動物細胞の主要な脂質の一つであるコレステロールの導入技術を確立し、膜タンパク質活性に与える影響も評価した。本研究により創製したヒト由来膜タンパク質-磁性粒子複合体は、リガンド結合能評価に利用できることから、創薬研究のハイスルーブット化を実現する画期的な方法へ応用することが可能である。

3. 研究の方法

PC 合成遺伝子には、CDP-diacyl-glycerol から PC を合成する PC synthase (pcs)、及び PE から PC を合成する phosphatidyl-ethanolamine N-methyltransferase (pemt) を用いた。pcs には、大腸菌の先行研究により PC 合成が確認されている *Legionella pneumophila* 由来遺伝子を、また pemt には磁性細菌 AMB-1 と系統的に近縁種である *Azospirillum brasilense* 由来の遺伝子を用いた。また、モデルヒト由来膜タンパク質として、これまでにマグネトソーム膜上への発現に成功している 1 回膜貫通タンパク質である受容体型チロシンキナーゼ: TrkA (神経栄養因子受容体) 及び 7 回膜貫通タンパク質である G タンパク質共役受容体: TSHR (甲状腺刺激ホルモン受容体) を用いた。磁性細菌で複製可能な pUMG ベクターに PC 合成酵素及び膜タンパク質の遺伝子をそれぞれ導入した発現ベクターを構築した後、磁性細菌の形質転換を行った。得られた各形質転換体を定常期まで培養後、細胞回収・細胞破砕を行い、磁気分離によりマグネトソーム画分を回収した。マグネトソーム膜は、クロロホルム/メタノール溶液により抽出し、以降の脂質解析に用いた。マグネトソーム膜、及び細胞膜成分を二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) により解析した。また、定量解析には得られたリン脂質をメチルエステル化し、GC-MS 解析を行った。得られた脂肪酸メチルエステルの定量結果からリン脂質組成を算出した。各形質転換体から得られたリン脂質プロファイル結果、及び磁性細菌 AMB-1 のゲノム情報に基づいた KEGG pathway 解析により、磁性細菌 AMB-1 の脂質代謝経路を明らかとした。各形質転換体から得られたマグネトソーム上の膜タンパク質の発現解析には、ウェスタンブロット及び ELISA による確認を行った。さらに各膜受容体の機能解析には、各受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを用いて、リガンド結合試験を行い、PC 導入の有無による結合能を評価した。

4. 研究成果

(1) 磁性細菌の脂質代謝経路の解析と PC 合成経路の導入

磁性細菌 AMB-1 のゲノム情報に基づいた KEGG pathway 解析により、磁性細菌 AMB-1 の脂質代謝経路を明らかとした。その結果、磁性細菌 AMB-1 のゲノムには PC を合成する酵素群がコードされていないことが示された。この結果は、磁性細菌膜の脂質組成

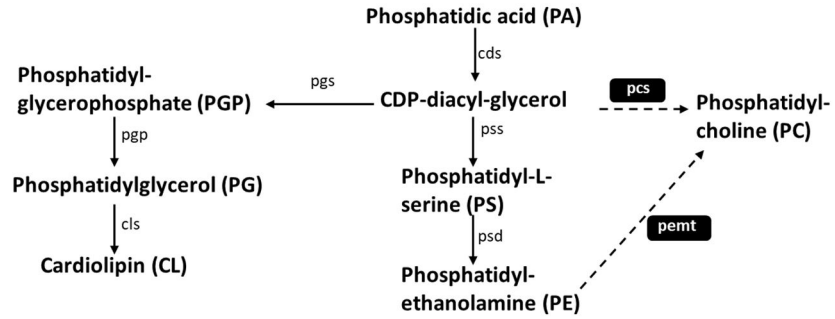


図1 磁性細菌AMB-1株のリン脂質合成経路（実線）とPC合成酵素(pcs or pemt)の導入によるPC合成経路（点線）

成解析の結果と一致した。次いで、2種類の方法により PC 合成遺伝子のノックインを行った（図1）。作出した形質転換体から総脂質を抽出し、TLC、および GC-MS による解析を実施したところ、両形質転換体において PC が新規に合成されていることが確認された（図2）。*Azospirillum brasilense* 由来の PC 合成酵素の遺伝子保持株において PC 導入率は 19%、また *Legionella pneumophila* 由来の PC 合成酵素の遺伝子保持株において 33%であった。野生株では PC 導入率が 0%であることより外来性の PC 合成酵素が磁性細菌内で機能していることが示された。また、磁性細菌の細胞膜に加えて、マグネトソーム膜上へも PC 導入が確認された。さらに、各形質転換体および野生株が含有する脂肪酸の組成解析により、膜タンパク質の流動性に関連する不飽和度は、PC 合成酵素の発現により変化しないことが示された。以上より、PC 合成酵素の遺伝子導入により、磁性細菌の脂質代謝を制御することが可能であり、マグネトソーム上に PC を *in vivo* で導入できることが示された。

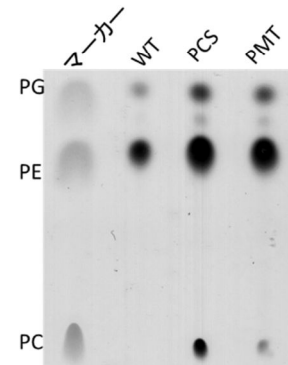


図2 各形質転換体から得られた細胞膜のTLC解析結果
WT: 野生株
PCS: pcs導入株
PMT: pemt導入株

(2) PC 含有量の異なるマグネトソームの作製

PC 合成酵素の発現には、その発現量調節が可能な発現誘導システム（テトラサイクリン誘導型）を利用した。研究代表者は既に磁性細菌内でアンヒドラテトラサイクリン (ATc) を発現誘導剤とし、ATc の濃度により標的遺伝子の発現量の調節が可能であることを示している (Yoshino et al. AEM, 2010)。本技術を利用することで PC 合成酵素の発現量を調節し、マグネトソーム上の PC 含有率の調節を試みた。各培養菌体から抽出したマグネトソーム膜のリン脂質組成解析を行った結果、誘導剤濃度の変更により、マグネトソーム上の PC 導入率が変化することが示された。また、発現誘導剤以外の調節方法として、培養時に添加するコリン濃度を変更することによる PC 導入率についても評価した。その結果、コリン添加濃度依存的な PC 含有率の増加が示された。さらに、PC 合成に伴う PE の減少がみられた一方で、PG 含有率に大きな差は示されなかった。これらの結果より、培地中の ATc 添加またはコリンの添加により、マグネトソーム膜上の PC 導入率を制御できることを実証した。

(3) PC 導入による膜タンパク質機能への影響評価

PC 合成酵素遺伝子に加え、膜タンパク質遺伝子の同時発現が可能であるかについて検討を行った。標的として 1 回膜貫通タンパク質である受容体型チロシンキナーゼ: TrkA (神経栄養因子受容体) 及び 7 回膜貫通タンパク質である G タンパク質共役受容体: TSHR (甲状腺刺激ホルモン受容体) の発現を試みた。マグネトソーム上に元来存在するタンパク質 Mms13 をアンカー遺伝子とし、膜タンパク質との融合遺伝子を構築した。さらに PC 合成酵素遺伝子を上記融合遺伝子とオペロンとして発現させるためのベクターを構築し、磁性細菌を形質転換した。得られた形質転換体を対象に上記と同様に PC の生合成、及び膜タンパク質の発現を確認した。また、コントロールとして PC 合成酵素の遺伝子を導入していない膜タンパク質のみを発現させた磁性細菌の形質転換体も作出し、PC 導入の有無による影響を評価した。各形質転換体から抽出した膜画分の TLC 解析の結果、PC 合成酵素を導入した形質転換体においてのみ PC の生合成が確認できた。また、2 割以上の PC 導入が確認され、主に PE が PC に置き換わっているものと考えられた。次に、各形質転換体から抽出したマグネトソームへの ELISA 解析を行った結果、PC 合成の有無で膜受容体の発現量に変化は確認されなかった。そこで、膜受容体を発現したマグネトソームを用いたリガンド結合試験を行った結果、各形質転換体に

において濃度依存的なリガンド結合が確認された。Scatchard 解析結果から、TSHR を発現した磁気微粒子においては、粒子膜上への PC 合成により K_d 値が 1.25×10^{-7} M から 2.50×10^{-8} M に変化することが示され、TSHR のリガンド結合能の向上が確認された。一方、TrkA を発現した磁気微粒子においては、PC 合成による膜組成改変は TrkA のリガンド結合能に影響しないことが示唆された。そこでリガンド結合有無による自己リン酸化能を確認したところ、PC 合成により自己リン酸化能が向上することが示された。細胞膜上の脂質組成がリガンド結合能や酵素活性に影響することが報告されていることより、本結果においてもマグネトソーム上の膜脂質組成の変化が膜受容体の機能向上に寄与したことが考えられた。本技術は、リン脂質の組成変化が膜タンパク質の機能へどのように影響を与えるかを評価するためのプラットフォームとして有効であると考えられる。

(4) コレステロール導入による膜タンパク質機能への影響評価

PC に次いで動物細胞の主要な脂質の 1 つであるコレステロールの導入技術を確認し、膜タンパク質活性に与える影響も評価した。標的とする受容体として、7 回膜貫通タンパク質である G タンパク質共役受容体である $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) のマグネトソーム上へのディスプレイを試みた。先行研究の結果から、 $\beta 2AR$ の活性は細胞膜のコレステロール存在の有無にも大きく影響することが知られている。そこで PC の導入に加え、コレステロールによるマグネトソームの膜改変技術の確立も行った。コレステロールの導入には Methyl- β -cyclodextrin ($M\beta CD$) を用いた。導入条件を検討した結果、マグネトソーム上の膜やタンパク質のプロファイルを変化させることなく、コレステロールを導入できる条件を見出すことに成功した。また、コレステロールの有無と $\beta 2AR$ 活性との関連を確認した結果、コレステロールの添加によりわずかに機能向上も確認された。

本研究では、マグネトソーム上への膜タンパク質発現に加え、さらなる機能化、利用性の拡大を図るために、PC やコレステロール導入による膜改変技術を確認した。磁性細菌が生成する磁性粒子を被覆する脂質二重膜を膜タンパク質のプラットフォームとして用い、遺伝子工学的な手法により膜組成を改質することで、ヒト由来膜タンパク質の機能発現を実現することができた。この方法により創製したヒト由来膜タンパク質-磁性粒子複合体は、リガンド結合能評価に利用できることから、創薬研究のハイスループット化を実現する画期的な方法へ応用することが可能であると考えられる。また、本技術を用いることで膜タンパク質の活性と脂質組成との関連性の包括的な理解が進むことが期待されることから、学術的な意義は大きいと判断される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tomoko Yoshino, Takumi Shimada, Yasuhito Ito, Toru Honda, Yoshiaki Maeda, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka	4. 巻 29
2. 論文標題 Biosynthesis of Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles by Magnetosome Display System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chem.	6. 最初と最後の頁 1756-1762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.bioconjchem.8b00195	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 Tsuyoshi Aketo, Yumiko Hoshikawa, Daisuke Nojima, Yusuke Yabu, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Hiroyuki Takano, Tsuyoshi Tanaka	4. 巻 5
2. 論文標題 Selection and characterization of Microalgae with Potential for Nutrient Removal from Municipal Wastewater and Simultaneous Lipid Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 565-572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.12.004	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 Anna Pohl, Steven A. Herrera, David Restrepo, Ryo Negishi, Jae-Young Jung, Chris Salinas, Richard Wuhler, Tomoko Yoshino, Joanna McKittrick, Atsushi Arakaki, Michiko Nemoto, Pablo Zavattieri, David Kisailus	4. 巻 111
2. 論文標題 Radular Stylus of Cryptochiton Stelleri: A Multifunctional Lightweight and Flexible Fiber-Reinforced Composite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Mech. Behav. Biomed. Mater.	6. 最初と最後の頁 103991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2020.103991	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 藤本 一嗣, 田山 爽也華, 前田 義昌, 田中 剛, 吉野 知子
2. 発表標題 リン脂質組成を改変した膜受容体-マグネトソーム複合体の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Negishi, Yihao Mao, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
2. 発表標題 Gel-based cell manipulation technique for genotyping of single microbial eukaryotes in seawater
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga
2. 発表標題 Bioengineering of Magnetic Nanoparticles Produced by Magnetospirillum magneticum AMB-1 for Extensive Applications
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazushi Fujimoto, Shuhei Ota, Yasuhito Ito, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino
2. 発表標題 Modification of phospholipids composition of magnetosomes by employing phosphatidylcholine synthase in magnetotactic bacteria
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sayaka Tayama, Yasuhiro Sugamata, Shuhei Ota, Yasuhito Ito, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino
2. 発表標題 Functional Expression of Transmembrane Receptors on Magnetic Nanoparticles Through a Magnetosome-display System
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 修平, 伊藤 康仁, 田中 剛, 吉野 知子
2. 発表標題 ホスファチジルコリン合成酵素の発現による磁性細菌 <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1の磁気微粒子膜の組成改変
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田 修平, 伊藤 康仁, 前田 義昌, 田中 剛, 吉野 知子
2. 発表標題 磁性細菌 <i>Magnetospirillum magneticum</i> におけるホスファチジルコリン合成酵素の発現による磁気微粒子の膜改変
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Yoshino
2. 発表標題 Molecular design of magnetic nanoparticle surfaces in magnetotactic bacteria and its application
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sayaka Tayama, Shuhei Ota, Yasuhito Ito, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
2. 発表標題 In vivo modification of membrane composition of magnetosomes via expression of phosphatidylcholine synthase in magnetotactic bacteria
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 脇 駿也, 田山 爽也華, 大垣 岳穂, 田中 剛, 吉野 知子
2. 発表標題 リン脂質組成を改変した膜受容体-マグネトソーム複合体の機能解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉野知子
2. 発表標題 磁性細菌を用いた機能性ナノ磁気微粒子の創製
3. 学会等名 令和 3 年電気学会全国大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	田中 剛 (Tanaka Tsuyoshi) (20345333)	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
---------	---------