

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01794

研究課題名(和文)細胞内コンパートメントを利用した磁性ナノ粒子の精密バイオ合成プロセスの構築

研究課題名(英文) Development of sophisticated biosynthetic process for magnetic nanoparticles by using intracellular compartment

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)・准教授

研究者番号：10367154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁性細菌が細胞内に形成する磁気微粒子合成のためのコンパートメントの機能を遺伝子工学的に改変することで、磁気微粒子合成のバイオプロセス制御を行った。磁性細菌のゲノムに磁気微粒子合成関連遺伝子群を含む長鎖DNAを導入する手法を確立することで多様な組換え株を作出し、遺伝子の組合せや発現量によって形態・サイズ・数の制御が可能であることを示した。また、異種細菌由来の金属イオントランスポーター遺伝子の導入によって、磁気微粒子組成の改変が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、磁性細菌の遺伝子を設計することで、磁気微粒子の形態・サイズ・組成と磁気特性の制御が可能であることを示した。遺伝子やゲノムに基づいてバイオプロセスを設計し、無機結晶合成を制御した世界初の例である。今後、酸化鉄磁気微粒子のみならず多様な無機結晶のバイオ合成法の開発に繋がる可能性があり、学術的・社会的に意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the regulation of manufacturing process for magnetic nanoparticles was investigated by using compartment in genetically modified magnetotactic bacteria. The method for introduction of large DNA fragment into the genome of magnetotactic bacteria was established. Control of shape, size and number of magnetic particles were shown by designing introduced gene sets or regulating gene expressions. Moreover, composition of magnetic particles was modified by the expression of metal ion transporter gene in the cell.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：磁性ナノ粒子 コンパートメント バイオプロセス 遺伝子組換え 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エネルギーや資源の枯渇に伴い、省エネルギー・省資源さらに環境への負荷が少ない新しい無機材料合成プロセスが求められている。生物による無機化合物形成作用はバイオミネラリゼーションと呼ばれ、穏やかな環境下において、人工系では真似のできない精緻な構造を持つ無機材料の合成を実現している。近年、バイオミネラリゼーションを利用した無機材料合成法が提案されているが、工学的利用において最適な形態や特性を持つ材料を自在に合成するには至っていない。一方、実際の生物におけるバイオミネラリゼーションは、細胞内の仕切られた微小空間(コンパートメント)内で行われる。生物はバイオミネラリゼーションに関わるタンパク質をコンパートメントに順序立てて配置し、連続的で精巧な化学反応プロセスを構築している。したがって、コンパートメントに局在するタンパク質の発現を改変・制御することによって、バイオミネラリゼーション機構を利用した新しい無機材料の創製プロセスの構築が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子組換え技術の確立されている磁性細菌を例に、酸化鉄磁気微粒子合成に関わるコンパートメントの制御・改変による新しい合成系の構築を目的とした。磁性細菌は、磁気微粒子を合成のためのコンパートメントを細胞内に形成する(図1)。本研究では、研究代表者らによって、全ゲノムの解読、形質転換や相同性組換え等の遺伝子組換え技術が確立されている磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株を用いた。本株においては、磁気微粒子合成機構に関わるタンパク質の多くが同定されており、合成機構の概要が明らかにされている。これまでの研究において、磁気微粒子合成に関わる遺伝子領域(約 100 kbp、99 遺伝子(図2))を欠損することにより、その機能が完全欠損した自然変異株を得ている。本研究では、磁気微粒子合成に必須の *mamAB* 遺伝子クラスター(18 遺伝子)と、結晶形成に関わる *mms* 遺伝子クラスター(7 遺伝子)の合計 25 遺伝子に着目して検討を行った。

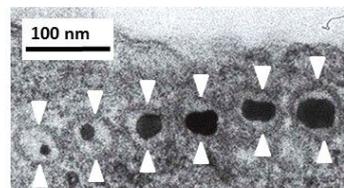


図1 磁性細菌の有する磁気微粒子合成に関わるコンパートメント



図2 磁気微粒子合成に関わる遺伝子をコードする約100 kbpのゲノム領域

3. 研究の方法

M. magneticum AMB-1 株のゲノムから磁気微粒子合成関連遺伝子クラスター領域を PCR 増幅後、ギブソンアッセムブリー法を用いて長鎖 DNA を調製し、プラスミドにクローニングした。また、誘導剤の添加により制御可能なオペレーター配列を、遺伝子のプロモーター部位に連結した。作製したプラスミドは、大腸菌 S17-1 株を介した接合伝達により、磁気微粒子合成能欠損株、及び野生株に導入した。セレクションを行うことで、プラスミドのゲノム挿入を誘導し、HiSeq2500 を用いてゲノム解析を行った。得られた遺伝子組換え株は、透過型電子顕微鏡(TEM)により観察し、細菌内に合成された粒子数及び粒径を計測した。また、遺伝子組換え株の磁気微粒子表面タンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行った。培地中鉄イオン濃度を ICP 発光分光光度計により測定することで、細胞の鉄イオン取り込み能の評価を行った。磁気微粒子の磁気特性は、振動試料型磁力計(VSM)を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換えによるコンパートメント再構築と磁気微粒子合成の制御

磁気微粒子合成に関わる遺伝子群を欠損した突然変異株 (MAI 株)に、コンパートメント形成に関わる 18 遺伝子を含むプラスミド(pRK-A)を導入することで、磁気微粒子合成能が回復することを確認した。磁気微粒子の数は 19.5 粒子/細胞であり、野生株と同等の数の合成が確認された。一方、粒子サイズは 13.7 nm であり、野生株と比較して小さいことが確認された。18 遺伝子に加え、酸化鉄の結晶成長に関わる 7 遺伝子を加えた 25 遺伝子を含むプラスミド (pRK-G6A)を再導入すると、pRK-A を導入した場合に比べ、粒子数が増えサイズも大きくなることを確認した(表1)。遺伝子導入による結晶成長関連タンパク質の発現により、結晶成長が促進されたことが考えられた。また、細胞の超薄切片像からコンパートメント形成を確認し、磁気微粒子に局在するタンパク質の解析からその発現を確認した(図3)。これらの結果から、コンパートメントに発現するタンパク質遺伝子セットの選択によって、磁気微粒子合成の制御が可能なが示された。

表 1 遺伝子組換え磁性細菌株の合成する磁気微粒子の数とサイズの比較

株名	粒子数 (particles/cell)	粒子サイズ (nm)
野生株	21.9 ± 3.5	38.2 ± 14.6
組換え株 ΔMAI-pRK-A	19.5 ± 13.8	13.7 ± 5.9
組換え株 ΔMAI-pRK-G6A	29.9 ± 15.4	15.7 ± 2.9

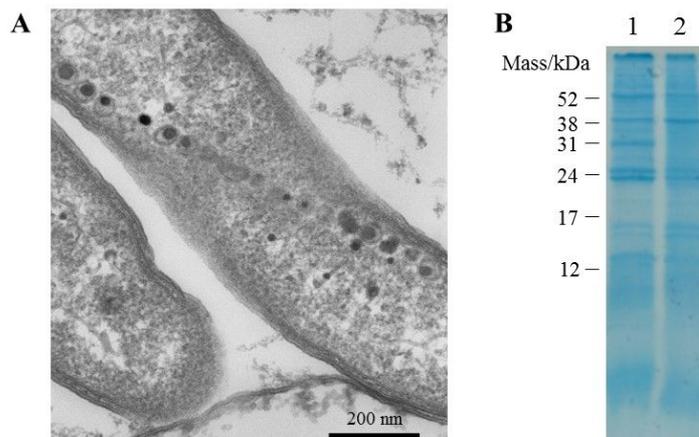


図 3 遺伝子組換え磁性細菌株のTEM超薄切片画像(A)と磁気微粒子表面に発現するタンパク質のSDS-PAGE (B)。Lane 1: 野生株、Lane 2: 組換え株。

(2) 遺伝子発現制御による磁気微粒子形態・サイズと数の制御

磁性細菌の細胞の外から誘導剤を添加することにより、細胞の中で起こる磁気微粒子形成に関わる遺伝子の発現制御を行う系の構築を行った。誘導剤の添加により制御可能なオペレーター配列を、磁気微粒子合成に関わる遺伝子のプロモーター部位に連結し、遺伝子発現が制御可能な遺伝子組換え株を作製した。また、粒子数制御や形態制御に関与する遺伝子群をマルチコピー化した組換え株を作出し、細胞内に形成するコンパートメントの活性化によって、1細胞当りの磁気微粒子合成数が増加することを示した(図4)。本遺伝子組換え株の高密度培養によって、培養液あたりの磁気微粒子の高生産化が可能であることもわかった。そこで、同組換え株における鉄イオン取り込み量と磁気微粒子生産量の評価を行った。細胞内に取り込む鉄イオン量と磁気微粒子量を定量評価し、取り込まれた鉄イオンの磁気微粒子への変換率を概算した。その結果、同組換え株では、鉄イオンの磁気微粒子への変換率の向上によって、磁気微粒子生産量が向上していることを明らかにした。また、酸化鉄磁気微粒子の化学合成系において、小さな微粒子の集合によって結晶化プロセスが制御されることを明らかにし、熱力学的なモデルを立てた。このモデルを用いて、系内の初期鉄イオン濃度から、形成する酸化鉄ナノ粒子のサイズ予測が可能であることがわかった。さらに磁気微粒子のサイズと同時に、その磁気特性制御が可能であることを示した。

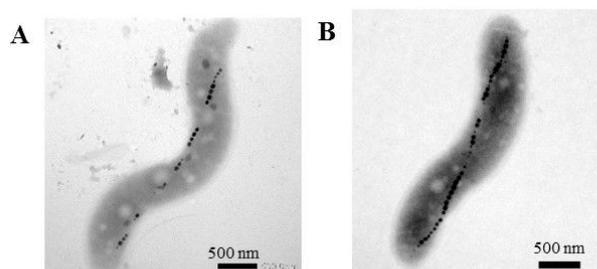


図 4 磁性細菌株のTEM画像。野生株 (A)、組換え株 (B)。

(3) 鉄以外の金属イオンの磁気微粒子への導入

磁性細菌に、異種細菌由来の金属イオントランスポーター遺伝子を導入した。トランスポーターの発現は、GFP融合タンパク質の局在解析により行った。その結果、細胞内への金属イオンの取り込み量が増加することを確認し、さらにコンパートメント内に鉄以外の金属イオンの導入が可能であることを明らかにした。コンパートメントに取り込まれた金属イオンは、酸化鉄結晶にも含有されることがわかった。さらに金属イオン導入に伴い、コンパートメント内で合成される磁気微粒子の磁気特性が向上することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Arakaki, Mayu Goto, Mina Maruyama, Takuto Yoda, Masayoshi Tanaka, Ayana Yamagishi, Yasuo Yoshikuni, Tadashi Matsunaga	4. 巻 15
2. 論文標題 Restoration and Modification of Magnetosome Biosynthesis by Internal Gene Acquisition in a Magnetotactic Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 e2000278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202000278	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 Anna Pohl, Steven A Herrera, David Restrepo, Ryo Negishi, Jae-Young Jung, Chris Salinas, Richard Wuhrer, Tomoko Yoshino, Joanna McKittrick, Atsushi Arakaki, Michiko Nemoto, Pablo Zavattieri, David Kisailus	4. 巻 111
2. 論文標題 Radular stylus of <i>Cryptochiton stelleri</i> : 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 該当する
1. 著者名 Mirabello, G, Ianiro, A, Bomans, PHH, Yoda, T, Arakaki, A, Friedrich, H, de With, G, Sommerdijk, NAJM	4. 巻 19
2. 論文標題 Crystallization by particle attachment is a colloidal assembly process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NATURE MATERIALS	6. 最初と最後の頁 391-396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41563-019-0511-4	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 Masayoshi Tanaka, Thanawat Suwatthanarak, Atsushi Arakaki, Benjamin R. G. Johnson, Stephen D. Evans, Mina Okochi, Sarah S. Staniland, Tadashi Matsunaga	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhanced Tubulation of Liposome Containing Cardiolipin by MamY Protein from Magnetotactic Bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 e1800087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800087	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12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 村田智志
2. 発表標題 キチン積層構造形成機構の解明に向けた甲虫上翅のプロテオーム解析
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井康祐
2. 発表標題 結晶形態制御タンパク質Mms6の金属酸化物ナノ粒子への吸着比較
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Arakaki, Mayu Goto, Mina Maruyama, Takuto Yoda, Tadashi Matsunaga
2. 発表標題 Regulation of Magnetite Biomineralization in Bacteria by Gene Rearrangement
3. 学会等名 International Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Arai, Satoshi Murata, Tadashi Matsunaga, Atsushi Arakaki
2. 発表標題 Comparative Adsorption Study of MMS Proteins from Magnetotactic Bacteria to Metal Oxide Nanoparticles
3. 学会等名 International Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新垣篤史
2. 発表標題 磁性細菌における磁気微粒子の合成機構とバイオ計測への応用
3. 学会等名 日本磁気科学会 2019年有機・バイオ分科会研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新垣篤史、丸山実菜、依田卓東、松永是
2. 発表標題 磁性細菌のマグネトソーム遺伝子領域の改変による磁気微粒子合成能の制御
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 新垣篤史、丸山実菜、依田卓東、松永是
2. 発表標題 遺伝子組換えによる磁性細菌の磁気微粒子合成能の改変
3. 学会等名 第14回バイオミネラリゼーションワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga
2. 発表標題 Reconstruction of magnetosome formation ability in non-magnetic mutant of <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuto Yoda, Masayoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Atsushi Arakaki
2. 発表標題 Iron uptake and magnetosome formation abilities in MAI deletion mutant and genetically modified strain carrying multiple sets of MAI genes
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 Kosuke Arai, Wataru Yoshimura, Satoshi Murata, Tadashi Matsunaga, Atsushi Arakaki
2. 発表標題 Adsorption Study of Mms6 and Mms7 to Iron Oxide Magnetic Nanoparticles
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 Atsushi Arakaki
2. 発表標題 Gene-based design and synthesis of biological magnetic nanoparticles
3. 学会等名 Materials Science and Engineering Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原奈々美、松永是、新垣篤史
2. 発表標題 弾丸状磁気微粒子合成機構の解析に向けた長鎖DNAの合成
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Atsushi Arakaki, Masayoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 29
3. 書名 Chapter 2: Molecular mechanism of magnetic crystal formation in magnetotactic bacteria: In Biological magnetic materials and applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学 生命分子工学・海洋生物学研究室 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
---------------------------	-----------------------	----

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