

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22107009

研究課題名（和文）人工機能化タンパク質を用いた融合マテリアルの構造制御

研究課題名（英文）Control of Structure of Fusion Materials using Artificial Proteins with Functionality

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） 44,400,000円

研究成果の概要（和文）：バイオミネラルの持つ優れた物性は、組成、大きさ、形態、結晶構造等によって支配されており、この形成過程においてはタンパク質が重要な役割を果たしている。本研究では、生体に見られるような精緻な構造を持つ融合マテリアルの構造制御に向けて、磁性細菌の合成する酸化鉄磁気微粒子の形成に関わるタンパク質の機能の理解とその制御分子としての利用を検証した。機能解析の結果、これらのタンパク質は異なる方向に結晶成長を促進することで磁気微粒子の形態制御に関わることを示した。また、タンパク質の発現量を調節することで、細胞内で磁気微粒子の形態を制御可能であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Biominerals show elaborate architecture and specific property which depends on their composition, size, shape, and crystal structure. Molecular studies on biomineralization have shown that the process involves a number of proteins. For structure control of novel fusion materials, we analyze the function of four Mms proteins that are involved in the formation of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. All Mms proteins were shown to play key roles in crystal growth and in defining the surface structures of magnetite crystal. By using the protein, morphology of magnetite crystals was successfully controlled according to protein expression levels in bacterial cell.

研究分野：生物工学

キーワード：ハイブリッド材料 機能性高分子 融合マテリアル 生体材料 バイオテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、ゲノム(DNA)に刻まれた設計図に基づいて、特定のタンパク質を適切な箇所に適量発現することで、生体反応の精密な制御を実現している。真珠貝や珪藻に代表されるバイオミネラリゼーションにおいても、異なる機能を持つ複数のタンパク質が時系列的に発現し、バイオミネラル近傍に局在化することで、精緻な無機結晶の形成プロセスが構築されていると考えられている。これまでの研究から、バイオミネラリゼーション機構に関わるタンパク質が多数分離され、そのアミノ酸配列にはいくつかの共通点が認められている。これらのタンパク質は、構造の特徴や機能により複数のドメインから構成される。多くの場合、疎水性ドメインはタンパク質の細胞内局在や自己集合に関与し、親水性ドメインはバイオミネラルと直接相互作用を持つことが考えられている。特に親水性領域にはカルボキシル基や水酸基を持つアミノ酸が高い頻度で存在し、バイオミネラルの組成や構造を決定する制御分子として機能する。したがって、このような機能ドメインを適切に選択し、材料創製の制御分子として利用することで、生体に見られるような精緻な構造を持つ新規の融合材料の構築が可能になると考えられる。さらに機能ドメインの分子構造をポリマー等の材料に置き換えることにより、実用的な材料合成系として応用が可能になると期待される。

磁性細菌は、サブミクロンサイズの単結晶のマグネタイト( $Fe_3O_4$ )から成るバイオミネラル(磁気微粒子)を合成する微生物である。磁気微粒子は、脂質膜で覆われた細胞内小器官内に鉄イオンが蓄積されることによって合成され、粒子のサイズや形態は個々の細菌種ごとに定まっている。中には化学合成法では合成の困難な形態を持つものも見られており、磁性細菌の有する形態制御機構は応用利用の側面からも興味を持たれている。これまでの研究から、Mms5, Mms6, Mms7, Mms13の4つのタンパク質は磁気微粒子の表面に局在し、磁気微粒子合成に関与することが示唆されている<sup>1</sup>。このうちMms6タンパク質をコードする遺伝子を欠失させた *mms6* 遺伝子欠損株は、野生株の球状粒子(切頂八面体)とは異なる柱状の粒子を合成することが確認され、酸化鉄磁気微粒子の形態制御に直接関与することが示された<sup>2</sup>。したがって、Mms6タンパク質と類似したアミノ酸配列から成るドメインを持つその他のMmsタンパク質(Mms5, Mms7, Mms13)も同様に形態制御に関連する機能を持つことが予測されている。これらのタンパク質の機能の詳細を理解することで、酸化鉄磁気微粒子の形態制御に関わる機能ドメインを明らかにし、新しい材料合成系が提案出来ると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、融合材料の構造制御に

向けて、磁性細菌の合成する酸化鉄磁気微粒子の形態制御に関わるMmsタンパク質の機能を *in vivo* 及び *in vitro* の双方から解析し、結晶形態の制御分子としての利用を検証することを目的とした(図1)。具体的には、Mmsタンパク質の鉄イオン存在下における構造変化の解析、及び磁気微粒子の合成を行うことで、*in vitro* における機能を評価した。また、Mmsタンパク質をコードする遺伝子を欠損する多様な変異株を作製し、タンパク質の機能解析や機能ドメインの同定を行った。さらに、Mmsタンパク質の発現量を調節することにより、細胞内における磁気微粒子の段階的な形態制御を行った。



図1. 本研究の目的。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro* におけるMms6タンパク質を用いた酸化鉄磁気微粒子の合成

組み換え大腸菌を用いて磁性細菌粒子の形態制御タンパク質Mms6タンパク質の精製を行った。精製したタンパク質に対し、鉄イオンを添加して円二色性分散計によるスペクトルの測定を行った。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーによりタンパク質の分子集合状態を解析し、部分酸化法を用いて精製したMms6タンパク質存在下における磁気微粒子の合成を行った。

(2) 遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子形態の比較解析に基づくMmsタンパク質の機能解析

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1株の磁気微粒子の表面に局在する4つのタンパク質(Mms5, Mms6, Mms7, Mms13タンパク質)をコードする遺伝子を相同性組み換え法により欠損し、*mms6* 遺伝子欠損株、*mms5* 遺伝子欠損株、*mms7* 遺伝子欠損株、*mms13* 遺伝子欠損株を作製した。それぞれが合成する粒子を透過型電子顕微鏡により観察し、粒子の表面を形成する結晶面を比較した。

(3) Mms6タンパク質の形態制御に関わる機能ドメインの同定

4つのMmsタンパク質は、N末端のグリシン/ロイシンの繰り返し配列(GL繰り返し領域)を持つ疎水性のドメインと、C末端の酸性アミノ酸に富んだドメインを持つ。そこで、相同性組換えによりMms6タンパク質の酸性アミノ酸領域、及びGL繰り返し領域を欠損した株を構築した。透過型電子顕微鏡により

各株が合成する磁気微粒子の観察を行い、短径及び長径を測定し、シェイプファクター(短径/長径)を算出することで磁気微粒子の形態を評価した。

#### (4) Mms7 タンパク質の発現調節による磁気微粒子の形態制御

*mms7* 遺伝子の発現誘導を可能とする *mms7* 遺伝子発現誘導ベクターを構築し、ダンベル状の磁気微粒子を合成する変異株を導入した。同 *mms7* 遺伝子発現誘導株を誘導剤である Anhydrotetracycline (ATc) の存在下で培養することで遺伝子の発現誘導を行い、透過型電子顕微鏡を用いて合成される磁気微粒子を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) *in vitro* における Mms タンパク質を用いた酸化鉄磁気微粒子の合成

精製した Mms6 タンパク質に対し、鉄イオンを添加して円二色性分散計によるスペクトルの測定を行った。その結果、鉄イオン濃度の増加に伴い、形態制御タンパク質の  $\alpha$ -helix 含量が減少し、 $\beta$ -sheet 含量が増加することが確認された。この構造変化は、タンパク質 C 末端の酸性アミノ酸領域への鉄イオンの結合によるものと考えられた。また、形態制御タンパク質は鉄イオンの結合に伴う構造変化によって粒子表面に相互作用し、その形態制御に寄与していることが考えられた。

ゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質の分子集合状態を評価した結果、Mms6 は 0.1% DDM の存在下で精製することで約 200 量体の巨大な集合体を形成し、0.1% LDAO の存在下では 3~4 量体の集合体を形成することが確認された。上記の 2 種類のタンパク質を用いて、部分酸化法による磁気微粒子合成を行った。合成した粒子の透過型電子顕微鏡観察により、3~4 量体の Mms6 タンパク質の存在下では粒子形態を制御せず、193 量体では形態制御に関与することが確認された。このことから、Mms6 タンパク質は自己集合することで磁気微粒子の形態制御を可能にすることが考えられた。

#### (2) 遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子の比較解析に基づく Mms タンパク質の機能解析

相同性組み換え法により作製した遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子を透過型電子顕微鏡により観察した。透過型電子顕微鏡観察の結果、全ての *mms* 遺伝子欠損株において、野生株と比較してサイズの小さな磁気微粒子が確認されたことから、全ての Mms タンパク質は結晶成長の促進に関与することが示された。また、*mms5* 遺伝子欠損株及び *mms13* 遺伝子欠損株は野生株と同様の切頂八面体の粒子を合成し、*mms7* 遺伝子欠損株は *mms6* 遺伝子欠損株と同様にアスペクト比の高い柱状の粒子を合成した。よって、Mms5 タンパク質及び Mms13 タンパク質は方向に

依存しない結晶成長を促進するのに対し、Mms6 タンパク質及び Mms7 タンパク質は特定方向への結晶成長を促進すると考えられた。更に、高分解能透過型電子顕微鏡を用いて、各遺伝子欠損株が合成する粒子の外形を形成している結晶面を解析した(図 2)。その結果、*mms6* 遺伝子欠損株が合成する全ての粒

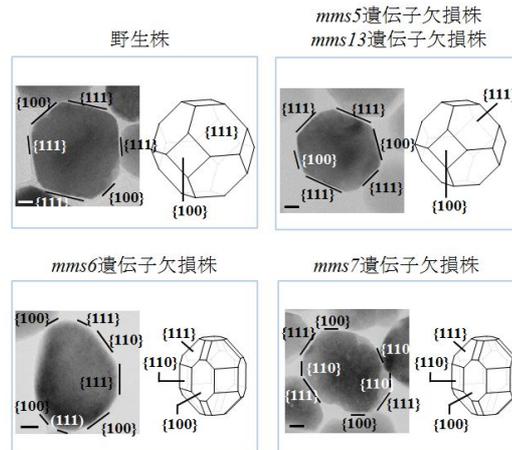


図 2. 遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子の透過型電子顕微鏡写真とモデル図。

子において {110} 面が現れていることがわかった。また、{111} 面や {100} 面も多く見られたが、{111} 面が大きく発達している野生株と比較して、{111} 面が小さいことが確認された。更に頻度は低いですが、野生株では見られない {210} 面、{211} 面、{311} 面などが現れている粒子も確認された。一方、*mms7* 遺伝子欠損株が合成する粒子の外形を形成している面を特定した結果、{110} 面が高頻度で現れているのに対し、{111} 面や {100} 面は確認されなかった。*mms6* 遺伝子欠損株及び *mms7* 遺伝子欠損株は、粒子の特定方向への成長に関与することが考えられたが、生成する粒子に現れている結晶面には違いが見られ、Mms6 と Mms7 が成長を促進する結晶面は異なることが考えられた。以上の結果から、磁性細菌の細胞内では、これらのタンパク質が酸化鉄結晶の成長過程において協調的に働きながら、酸化鉄磁気微粒子を切頂八面体の形態に制御することが明らかにされた。

#### (3) Mms6 タンパク質の形態制御に関わる機能ドメインの同定

疎水性ドメインや親水性ドメインを欠損した 7 株の相同性組み換え株を作製し、透過型電子顕微鏡観察を行った結果、全ての株において野生株の磁気微粒子(図 3B)とは異なる細長い柱状の粒子が観察された。これを定量的に評価するため、粒子の長径と短径を測定し、シェイプファクターを算出した。その結果、組み換え株が合成する粒子の長径には変化がなく、短径が小さくなることを確認された。これに伴い、組換え株ではシェイプファクターの値が野生株の 0.91 よりも低く、親水性の酸性アミノ酸領域欠損株(図 3C, 3D)で

は 0.73–0.76 であり、疎水性領域欠損株(図 3F, 3G)では 0.63–0.70 であった。また、疎水性領域及び酸性アミノ酸領域を欠損した株(図 3H, 3I)においても、粒子のシェイプファクターは 0.65–0.67 であり、柱状の粒子を合成していることが示された。疎水性ドメインはタンパク

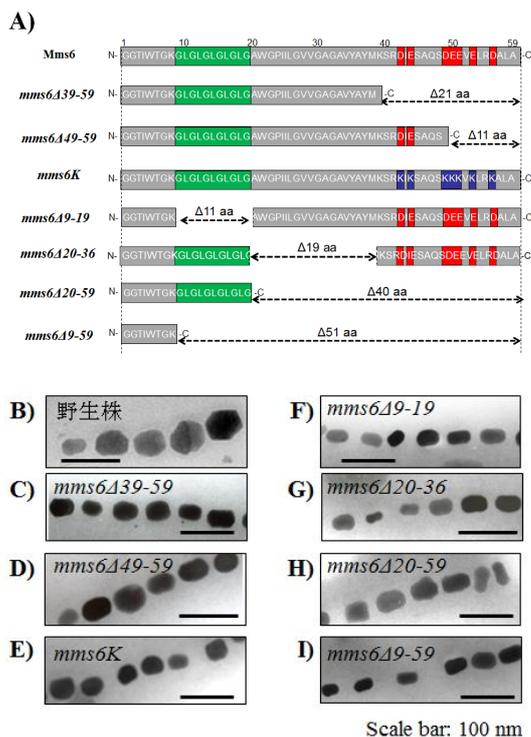


図 3. 部分欠損 Mms6 タンパク質の模式図 (A)及び Mms6 タンパク質の機能ドメインを欠損した株が合成する磁気微粒子の透過型電子顕微鏡画像(B-I).

質の局在及び自己集合に参与することが考えられ、タンパク質が粒子表面から欠失することにより、粒子の特定方向への成長に影響を与えたことが考えられた。また、酸性アミノ酸を含む親水性ドメインは鉄イオンや酸化鉄結晶との相互作用に関わることが考えられた。

#### (4) Mms7 タンパク質の発現調節による磁気微粒子の形態制御

ATc 非添加条件下で培養した *mms7* 遺伝子発現誘導株では、*mms7* 遺伝子欠損株の粒子と同様の形態をもつダンベル状粒子が生成された(図 4A)。また、両株における 1 菌体あたりの粒子数、長径及び短径、粒径には変化がないことが確認された。この結果は、本システムが生成される磁気微粒子の粒子数や形態に影響を与えないことを示した。一方、ATc 添加条件下で培養し、同遺伝子を発現させた *mms7* 遺伝子発現誘導株では、柱状の粒子を生成した(図 4B-E)。また、ATc 添加量に依存して形態が変化し、ATc 添加量が最大の 500 ng/ml の条件では野生株の球状粒子に近い形態を示した。ATc 添加濃度が異なる条件

下で培養した各 *mms7* 遺伝子発現誘導株の合成する粒子サイズを測定した結果、長径には変化がなく、短径のみが *mms7* 遺伝子欠損株の粒子と比較して大きいことが確認された。短径の制御幅は、約 15–25 nm であった。また、この時、*mms7* 遺伝子の mRNA の細胞内発現量の増加と、Mms7 タンパク質の磁気微粒子表面での発現量の増加を確認している。よって、ATc 添加量の増加により *mms7* 遺伝子の発現量が増加したことで、粒子の短径が伸長し、粒子形態が球状に変化したと考えられた。以上の結果から、*mms7* 遺伝子の発現量を調節するシステムの構築に成功し、本システムが磁性細菌の生成する磁気微粒子の形態制御を可能とする手法として有効であることが示された。

サブミクロンサイズの磁気微粒子の磁気特性は、形態・サイズに大きく依存する。本システムを用いることで、物質回収、医療応用等の用途に合わせた磁気微粒子材料の提供が可能になると考えられる。また、これまでの共同研究において、磁性細菌由来の磁気微粒子が、ビニルエーテル類のリビングカチオン重合の触媒として利用できることが示されている。このように形態、サイズ、表面構造の制御された磁気微粒子は、このような応用においても有用な材料になると考えられる。

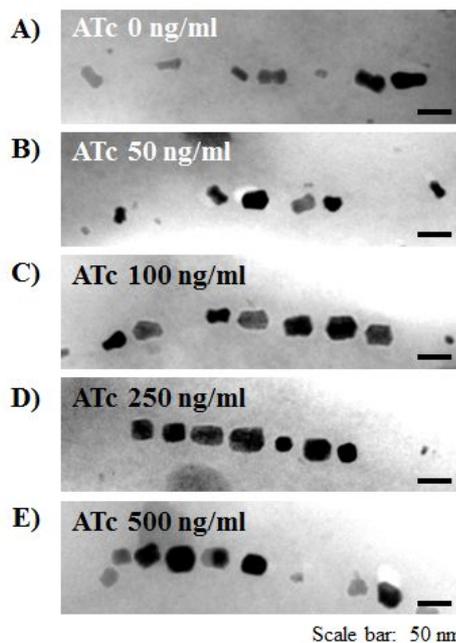


図 4. ATc 添加量により異なる形態を示した *mms7* 遺伝子発現誘導株の磁気微粒子の透過型電子顕微鏡画像。

#### < 引用文献 >

Atsushi Arakaki, John. Webb, Tadashi Matsunaga, *J. Biol. Chem.*, **278**, 8745–8750 (2003).

Yosuke Amemiya, Atsushi Arakaki, Sarah S. Staniland, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, *Biomaterials*, **28**, 5381-5389 (2007).

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 12 件 )

Atsushi Arakaki, Katsuhiko Shimizu, Mayumi Oda, Takeshi Sakamoto, Tatsuya Nishimura, and Takashi Kato, Biomaterialization-Inspired Synthesis of Functional Organic/Inorganic Hybrid Materials: Organic Molecular Control of Self-Organization of Hybrids, *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 974-989 (2015). (査読有)  
DOI: 10.1039/c4ob01796j

Atsushi Arakaki, Ayana Yamagishi, Ayumi Fukuyo, Masayoshi Tanaka, and Tadashi Matsunaga, Coordinated Functions of Mms Proteins Define the Surface Structure of Cubo-octahedral Magnetite Crystals in Magnetotactic Bacteria, *Mol. Microbiol.*, **93**, 554-567 (2014). (査読有)  
DOI: 10.1111/mmi.12683

Atsushi Arakaki, Ayana Yamagishi, and Tadashi Matsunaga, Protein-Mediated Morphological Regulation of Magnetite Crystal in Magnetotactic Bacteria, *J. Jpn. Soc. Powder Powder Metallurgy*, **61**, S99-S103 (2013) (査読有)  
DOI: 10.2497/jjspm.61.S99

Atsushi Arakaki, Daisuke Iwama, Yue Liang, Nagisa Murakami, Masaharu Ishikura, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Glycosylceramides from Marine Green Microalga *Tetraselmis* sp., *Phytochemistry*, **85**, 107-114 (2013) (査読有)  
DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.09.006

Arihiro Kanazawa, Shokyoku Kanaoka, Naoki Yagita, Yuya Oaki, Hiroaki Imai, Mayumi Oda, Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga and Sadahito Aoshima, Biologically Synthesized or Bioinspired Process-Derived Iron Oxides as Catalysts for Living Cationic Polymerization of a Vinyl Ether, *Chem. Commun.*, **48**, 10904-10906 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1039/C2CC36218J

Atsushi Arakaki, Keiyu Shibata, Takeyuki Mogi, Masahito Hosokawa, Keiichi Hatakeyama, Hideyuki Gomyo, Tomoyuki Taguchi, Hitoshi Wake, Takeo Tanaami, Tadashi Matsunaga, and Tsuyoshi Tanaka, Efficient DNA Release from PAMAM Dendrimer-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for DNA Recovery, *Polymer J.*,

**44**, 672-677 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1038/pj.2012.32

Tsuyoshi Tanaka, Keiyu Shibata, Masahito Hosokawa, Keiichi Hatakeyama, Hideyuki Gomyo, Atsushi Arakaki, Takeyuki Mogi, Tomoyuki Taguchi, Hitoshi Wake, Takeo Tanaami, and Tadashi Matsunaga, Characterization of Magnetic Nanoparticles Modified with Thiol Core, Functionalized PAMAM Dendron for DNA Recovery, *J. Colloid Int. Sci.*, **377**, 469-475 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.jcis.2012.03.039.

Masayoshi Tanaka, Eri Mazuyama, Atsushi Arakaki, T. Matsunaga, MMS6 Protein Regulates Crystal Morphology during Nano-Sized Magnetite Biomaterialization In Vivo, *J. Biol. Chem.*, **286**, 6386-6392 (2011). (査読有)  
DOI: 10.1074/jbc.M110.183434

### [ 学会発表 ] ( 計 18 件 )

Atsushi Arakaki, and Tadashi Matsunaga “Understanding of Biomaterialization Mechanism in Magnetotactic Bacteria toward Designed Synthesis of Iron Oxide Nano-Particle”, The 11th International Conference on Ferrites (ICF11), Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, April 16, 2013.

### [ 図書 ] ( 計 3 件 )

Atsushi Arakaki, Michiko Nemoto, and Tadashi Matsunaga, “Molecular Bioengineering of Magnetosomes for Biotechnological Applications”, Coordination Chemistry in Protein-Cages: Principles, Design, and Applications, First Edition., Eds. Takafumi Ueno and Yoshihito Watanabe, 387 (pp. 241-272), John Wiley & Sons, Inc., (2013).

新垣 篤史, 山岸 彩奈, 松永 是, “地球を救うメタルバイオテクノロジー - 微生物と金属資源のはなし -”, 242 (pp. 162-170), 成山堂書店 (2014).

[ その他 ]  
ホームページ等  
<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

新垣 篤史 ( ARAKAKI, Atsushi )  
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：10367154