

令和元年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02421

研究課題名(和文) 遺伝子の再編成によるバイオマグネットと有用物質の同時生産細菌の構築

研究課題名(英文) Construction of bacterial cell producing biomagnet and useful substances by genome rearrangement

研究代表者

松永 是 (Matsunaga, Tadashi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：10134834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：磁性細菌は、細胞内に鉄イオンを取り込み結晶化することで、酸化鉄から成る磁気微粒子を合成する。本研究では、磁性細菌の磁気微粒子合成関連遺伝子群を利用し、世界に先駆けて磁気微粒子と物質生産能を持つ細菌の構築を行った。磁性細菌の磁気微粒子合成に関わる必要最低限の遺伝子群を抽出し、これを再編成し、ホスト細菌株に導入することで、磁気微粒子合成能と物質生産能の制御された新規細菌株の創製を行った。具体的には、下記の成果を得た。(1)磁気微粒子合成関連遺伝子群を最小化した磁性細菌株を構築した。(2)磁気微粒子合成に最適なホスト株の選出を行った。(3)ホスト株での磁気微粒子と有用物質の同時生産を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微生物を用いて磁気微粒子の合成と有用物質生産が同時生産可能であることを示した。また、磁気微粒子合成に関わる遺伝子群を再編成することで、形態や組成の制御された磁気微粒子の合成や異種細菌における磁気微粒子合成の可能性を示した。本研究成果は、微生物を用いた効率的物質生産と磁気的な微生物回収技術としての利用が考えられ、産業利用微生物の応用範囲の拡大に繋がる成果である。また、本研究では、当初予想できなかった新しい遺伝子組換えの現象を見出した。分子生物学、ゲノム科学、合成生物学などの関連学術分野に波及効果のある研究成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Magnetotactic bacteria synthesize iron oxide magnetic nanoparticles by accumulating iron ion and crystalize them in the cell. This study aimed to construct novel microorganisms producing both magnetic particles and useful substances. In order to achieve this subject, we utilized and modified the gene set for magnetic particle synthesis from magnetotactic bacteria, and introduced the genes into selected host bacterial strains. Following results were obtained from this study. (1) Construction of magnetotactic bacterial strain containing minimum gene set for magnetic particle synthesis. (2) Selection of optimal host cell for magnetic particle formation. (3) Production of magnetic particles and useful substances in the host bacterial cell.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：応用微生物 ゲノム 組織・細胞 生体機能利用 バイオテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

磁性細菌は、温和な条件下で純粋なマグネタイト(Fe_3O_4)から成る粒径が数十~百ナノメートルの磁気微粒子を合成する。磁性細菌は、水の中に棲む細菌であり、細胞内に合成する磁気微粒子により地球の磁場に配向し、生育に最適な酸素濃度環境に移動していると考えられている(*Science*, 190, 377-9 (1975))。これまでに様々な種類の磁性細菌が見つかり、進化的には光合成細菌や硫酸還元菌などの嫌気性細菌の近縁に分類される多系統な細菌群であることがわかっている。また、人工的には合成の困難な多面体や弾丸状、勾玉状などの多様な形態の磁気微粒子を合成することから、工学的応用に向けてその合成機構に興味を持たれている(図1)。

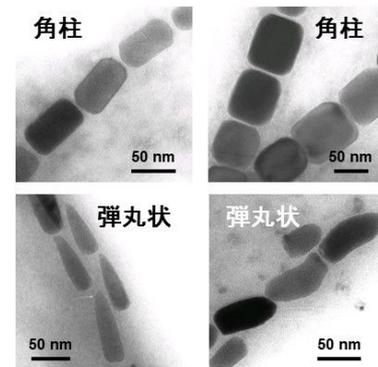


図1 磁性細菌の合成する多様な形態の磁気微粒子

研究代表者は、1980年代から磁性細菌の研究に携わり、新規の磁性細菌を分離するなど(*Nature*, 365, 47-9 (1993))、同分野を世界的にリードしてきた。磁気微粒子合成機構の解明に向けて、2005年には世界で初めて磁性細菌の全ゲノム解析に成功し(*DNA Res*, 12, 157-66 (2005))、これに基づいてプロテオーム解析やトランスクリプトーム解析を進めた。この解析において磁気微粒子合成に関わると考えられる約90個の遺伝子及びタンパク質を同定し、磁気微粒子は細胞膜の陥入によって形成する細胞内小器官(マグネトソーム)の中で合成される粒子合成機構の概要を提唱した(図2)。特に、小胞のサイズを制御する MamY (*Mol Microbiol*, 76, 480-8 (2010))、鉄イオンを輸送する MagA (*J Biol Chem*, 270, 28392-6 (1995))、磁気微粒子の結晶形態を制御する Mms (*J Biol Chem*, 278, 8745-50 (2003), *Mol Microbiol*, 93, 554-67 (2014))などの重要な新規タンパク質の存在を多数示した。さらに、磁性細菌の合成する磁気微粒子の特徴を利用した応用研究にも取り組み、表面を改質した粒子を開発し、物質回収、バイオアッセイ等における有用性を示してきた(*Biomaterials*, 31, 4952-7 (2010), *Appl Environ Microbiol*, 81, 1472-6 (2015))。一方で、世界中の研究者によって磁気微粒子合成機構の解明に向けた研究が展開されている。米の Komeili らは、粒子を被覆する MamA タンパク質(*PNAS*, 101, 3839-44 (2004))や粒子配列のガイドとなる MamK タンパク質(*Science*, 311, 242-5 (2006))の存在を明らかにした。近年、仏の Pignol らは、磁気微粒子合成に直接関わる鉄還元酵素 MamP の存在を示している(*Nature*, 502, 681-4 (2013))。磁気微粒子合成機構の解明に向けた研究に加え、人工磁性細菌の創製に向けた取り組みもなされている。独の Schüler らは、*Magnetospirillum* 属の磁性細菌に近縁の *Rhodospirillum* 属の細菌に約30個の磁気微粒子合成関連遺伝子を導入することで、粒子合成能を付与できることを報告している(*Nat Nanotechnol*, 9, 193-7 (2014))。これまで蓄積されてきた磁気微粒子合成機構に基づき、合成機構に関わる遺伝子をゲノムレベルで再編成することで、合成生物学的なアプローチによる磁気微粒子合成能の改変や新規磁性細菌の創製が試みられようとしている。

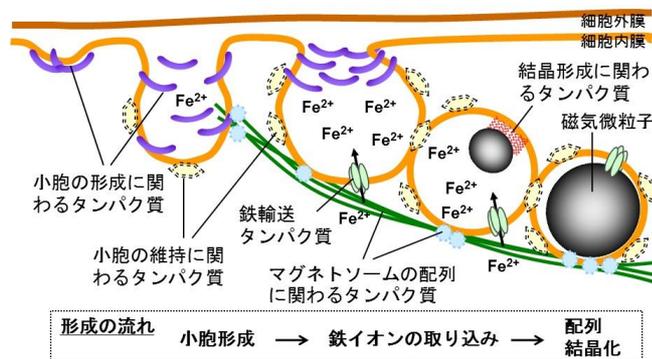


図2 磁性細菌における磁気微粒子合成機構

2. 研究の目的

本研究では、世界に先駆けて磁気微粒子と物質生産能を持つ細菌の構築を行った。磁性細菌の磁気微粒子合成に関わる必要最低限の遺伝子群を抽出し、これを再編成し、ホスト細菌株に導入することで、磁気微粒子合成能と物質生産能の制御された新規細菌株の創製を行った。具体的には、以下の課題について検討を行った。

- (1) 磁気微粒子合成関連遺伝子群を最小化した磁性細菌株の構築
- (2) 磁気微粒子合成に最適なホスト株の選出
- (3) ホスト株での磁気微粒子と有用物質の同時生産

3. 研究の方法

Magnetospirillum magneticum AMB-1 株のゲノムから磁気微粒子合成関連遺伝子群(図3)を抽出し、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。遺伝子導入のホスト株としては、磁性細菌 AMB-1 株と磁気微粒子合成能欠損株、及び大腸

菌を用いた。AMB-1 株へのプラスミドの導入は、大腸菌 S17-1 株を介した接合伝達法を用いた。遺伝子組換え株のゲノム解析は、HiSeq2500 を用いて行った。得られたコンティグは AMB-1 株と pRK415 の配列に基づいてマッピングを行い、MAI 遺伝子を含む領域を探索した。得られた遺伝子組換え株は、透過型電子顕微鏡により観察し、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。鉄イオン取り込み能の評価は、ICP 発光分光光度計を用いた。

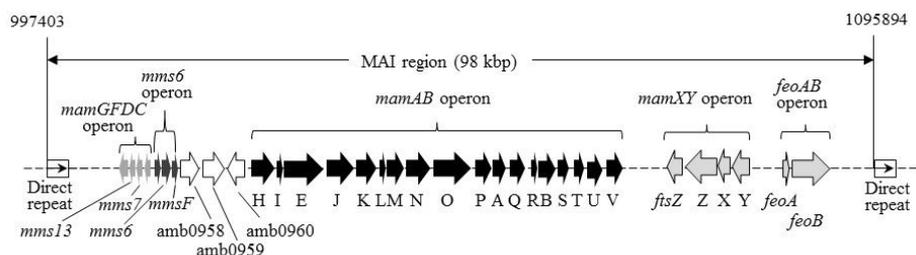


図3 Magnetospirillum magneticum AMB-1株の磁気微粒子合成関連遺伝子のゲノム配置

4. 研究成果

(1) 磁気微粒子合成関連遺伝子群を最小化した磁性細菌株の構築

長鎖 DNA のゲノムへの挿入法の確立

AMB-1 株が複製可能なプラスミドに磁気微粒子合成関連遺伝子をクローニングし、磁気微粒子合成能欠損株に導入した。独立した 3 回の実験で得られた 3 株の遺伝子相補株は全て磁気微粒子合成能を持っているものの、プラスミド抽出の結果、いずれの遺伝子相補株においてもプラスミドの存在は確認されなかった。そこで、3 株のゲノム配列を解析したところ、全てにおいてプラスミドの全配列がゲノム中に挿入していることが確認された(図4)。プラスミドのゲノム挿入位置(図中、Chromosome の配列 GAAG と、プラスミドの 14 bp の配列が入れ替え)は 3 株において一致しており、挿入箇所の両端には 8 bp の逆方向反復配列(図中、IR)の存在が確認された。一方、挿入におけるプラスミドの切断箇所及び向きは 3 株において異なっており、全ての遺伝子相補株において挿入配列(図中、網掛け黒)の両端に 5 bp の同方向反復配列が形成していた。また、AMB-1 株ゲノムにおける挿入箇所の前後領域には、複数のトランスポゼースの存在が確認された。これらのことから、プラスミドは、AMB-1 株の内在性トランスポゼースによってゲノムに挿入されたことが考えられた。

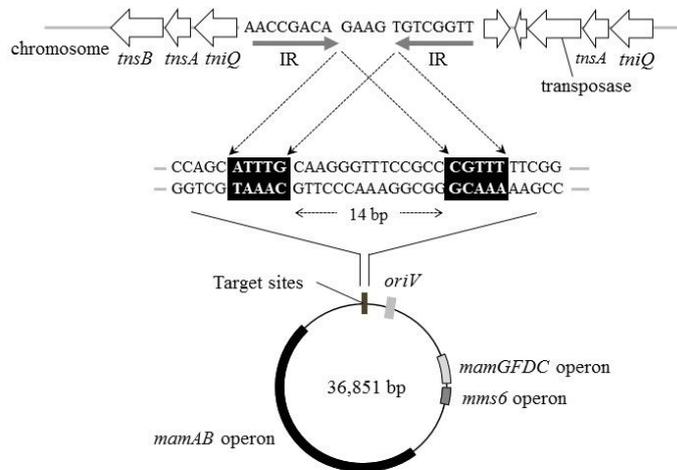


図4 磁気微粒子合成関連遺伝子を含むプラスミドのゲノム挿入箇所の模式図

磁気微粒子合成関連遺伝子群の最小化

上記の長鎖 DNA のゲノム導入法を用いて、磁気微粒子合成能を欠損した突然変異株に磁気微粒子合成関連遺伝子群を再導入し、磁気微粒子合成能の回復を見ることで、その合成に必須の遺伝子領域の特定を行った。その結果、mamAB 遺伝子オペロン(18 遺伝子)の導入によっては、約 10 nm の小さな磁気微粒子の合成が確認された。mamAB 遺伝子オペロンに加え、mamGFDC (4 遺伝子)と mms6 遺伝子オペロン(3 遺伝子)を導入すると、粒子サイズが約 20 nm に増加することが確認された(図5)。一方で、mamXY 遺伝子オペロン(3 遺伝子) amb0958-0960 遺伝子領域(3 遺伝子)の導入は、磁気微粒子サイズ等に顕著な影響がないことが確認された。また、SDS-PAGE の結果、導入した遺伝子由来のタンパク質がマグネトソーム上に発現していることが確認された。超薄切片の TEM 観察によって、小胞状の細胞内構造物の存在が確認された。本結果から、mamAB 遺伝子オペロンが磁気微粒子合成の必須遺伝子であることが同定され、小胞形成、核形成に関与すると考えられた。また、mamGFDC と mms 遺伝子オペロンは結晶成長に関与し、粒子サイズに影響することが考えられた。よって、磁気微粒子合成のための最小遺伝子群として、mamAB 遺伝子オペロンが同定された。

(2) 磁気微粒子合成に最適なホスト株の選出

大腸菌における磁気微粒子合成

(1)で得た磁気微粒子合成関連遺伝子を持つプラスミドを大腸菌に導入し、磁気微粒子合成能の付与を検討した。形質転換体の遺伝子発現解析から、導入した磁気微粒子合成関連遺伝子の発現が確認された。そこで、同大腸菌形質転換体内でGFP融合した磁気微粒子合成関連タンパク質を同時発現させ、細胞内局在を観察した。形質転換体では、細胞内で特徴的な直鎖状の局在を示し、AMB-1株における磁気微粒子合成関連タンパク質の局在パターンと一致した。このことから、大腸菌内において磁気微粒子形成のための細胞内構造を形成していることが示唆された。一方、TEM観察の結果、細胞内での磁気微粒子合成は確認されなかった。そこで、同形質転換体の鉄取り込み能を評価した結果、磁気微粒子合成に十分な量の鉄を蓄積していないことが確認された。磁気微粒子合成に向けては、外来の鉄イオントランスポーターの発現による鉄イオン取り込み能の強化が必要と考えられた。

磁気微粒子高生産株の構築

(1)の結果に基づいて、磁気微粒子合成関連遺伝子のオペロンの改変による磁気微粒子合成高生産株の構築を行った。具体的には、*mamAB*、*mamGFDC*、*mms6*の3つの遺伝子オペロンを2セット導入した遺伝子組換え株を作製した。TEM観察の結果、同遺伝子組換え株は、野生株に対して約2倍の数の磁気微粒子を合成した。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。したがって、本遺伝子組換え株の高密度培養によって、さらなる磁気微粒子の高生産化が可能であることを示した。

(3) ホスト株での磁気微粒子と有用物質の同時生産

磁気微粒子の組成改変

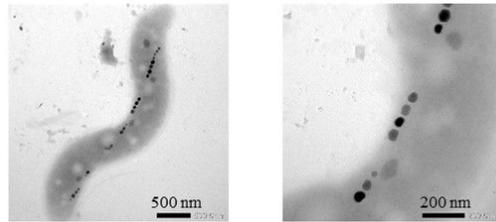
磁気微粒子の磁気特性向上を目的として、磁気微粒子への鉄以外の金属イオンの導入による組成改変を行った。 α プロテオバクテリアの一種から獲得した金属イオンのトランスポーター遺伝子をプラスミドとしてAMB-1株に導入した。また、金属イオントランスポーターの発現確認のため、同タンパク質と緑色蛍光タンパク質を融合発現する株を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、タンパク質の細胞膜上への発現が確認された。金属イオンの細胞内への取り込み能評価を行ったところ、同プラスミドを導入した形質転換体は、野生株に対して約2倍の高い金属イオン取り込み能を持つことが確認された。磁気微粒子への金属イオンの導入による磁気特性の向上が期待される。

磁気微粒子とバイオポリマーの同時生産

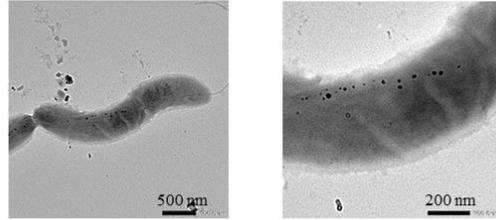
磁性細菌は細胞内に磁気微粒子を合成するため、磁力によって回収が可能である。そのため、磁性細菌は磁気回収が可能な物質生産ホストとしての応用が期待できる。AMB-1株におけるバイオポリマーの生産ホストとしての利用性と細胞の磁気回収の評価を行った。培地に含まれる炭素源の検討を行い、バイオポリマー含量が最も高くなる条件を見出した。経時的なバイオポリマー含量を評価した結果、対数増殖期初期から中期にかけて含量が上昇することが示された。また、この生産条件において、細菌の磁気回収が可能であった。今後、培養条件の検討、代謝改変による生産性向上の可能性が考えられる。

以上、本研究によって、磁性細菌の遺伝子組換えによる磁気微粒子の高生産化と高付加価値化、有用物質との同時生産に向けた指針を示すことができた。今後、金属イオンの磁気微粒子への導入、結晶形態制御等によって、高付加価値な無機ナノ材料の提供に繋がることが期待される。

AMB-1野生株



AMB-1突然変異株 (*mamAB* オペロン)



AMB-1突然変異株 (*mamAB*, *mamGFDC*, *mms6* オペロン)

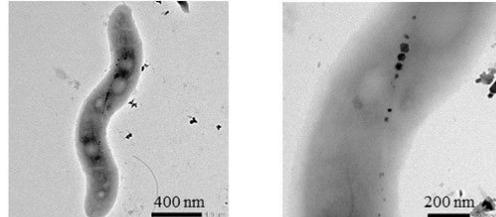


図5 遺伝子組換え磁性細菌のTEM写真

mamAB、*mamGFDC*、*mms6*の3つの遺伝子オペロンを2セット導入した遺伝子組換え株を作製した。TEM観察の結果、同遺伝子組換え株は、野生株に対して約2倍の数の磁気微粒子を合成した。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。したがって、本遺伝子組換え株の高密度培養によって、さらなる磁気微粒子の高生産化が可能であることを示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. M. Tanaka, T. Suwatthanarak, A. Arakaki, B.R.G. Johnson, S.D. Evans, M. Okochi, S.S. Staniland, T. Matsunaga, “Enhanced tubulation of liposome containing cardiolipin by MamY protein from magnetotactic bacteria” *Biotechnol. J.*, e1800087 (2018). (査読有)
2. T. Yoshino, T. Shimada, Y. Ito, T. Honda, Y. Maeda, T. Matsunaga, T. Tanaka, “Biosynthesis of thermoresponsive magnetic nanoparticles by magnetosome display system”, *Bioconjugate Chem.*, **29**, 1756-1762 (2018). (査読有)
3. A. Arakaki, S. Nakata, T. Tokuhisa, Y. Ogawa, K. Sato, T. Sonoi, S.P. Donachie, T. Matsunaga, “Quantitative and time-course analysis of 1H,1H,2H,2H,8H,8H-perfluorododecanol microbial degradation in activated sludge”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 8259-8266 (2017). (査読有)
4. T. Yoshino, N. Kakunaka, Y. Liang, Y. Ito, Y. Maeda, T. Nomaguchi, T. Matsunaga, T. Tanaka “Production of 3 fatty acids in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain NKBG 15041c via genetic engineering”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 6899-6905 (2017). (査読有)
5. A. Yamagishi, K. Narumiya, M. Tanaka, T. Matsunaga, A. Arakaki, “Core amino acid residues in the morphology-regulating protein, Mms6, for intracellular magnetite biomineralization”, *Sci. Rep.*, **6**, 35670 (2016). (査読有)
6. A. Arakaki, D. Kikuchi, M. Tanaka, A. Yamagishi, T. Yoda, T. Matsunaga, “Comparative subcellular localization analysis of magnetosome proteins reveals a unique localization behavior of Mms6 protein onto magnetite crystals”, *J. Bacteriol.*, **198**, 2794-2802 (2016). (査読有)
7. A. Yamagishi, M. Tanaka, J.M.M. Lenders, J. Thiesbrummel, N.A.J.M. Sommerdijk, T. Matsunaga, A. Arakaki, “Control of magnetite nanocrystal morphology in magnetotactic bacteria by regulation of *mms7* gene expression”, *Sci. Rep.*, **6**, 29785 (2016). (査読有)
8. M. Tanaka, W. Knowles, R. Brown, N. Hondow, A. Arakaki, S. Baldwin, S. Staniland, T. Matsunaga, “Biomagnetic recovery and bioaccumulation of selenium granules in magnetotactic bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 3886-3891 (2016). (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

平成30年度：7件(うち招待講演2件、国際学会発表6件)

平成29年度：6件(うち招待講演2件、国際学会発表3件)

平成28年度：4件(うち招待講演2件、国際学会発表3件)

〔図書〕(計1件)

1. Editors: T. Matsunaga, T. Tanaka, D. Kisailus, “Biological Magnetic Materials and Applications” Springer, 199 pages (2018).

〔その他〕

1. ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~biomol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：新垣 篤史

ローマ字氏名：Atsushi Arakaki

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：大学院工学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10367154

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 祐圭

ローマ字氏名：Masayoshi Tanaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。