

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03791

研究課題名(和文) ナノ磁気オルガネラの高時空間分解能ライブ解析による形成機構の解明

研究課題名(英文) Studies on formation mechanism of nano-organelle in growing cells by live-cell time-lapse fluorescence imaging analyses.

研究代表者

福森 義宏 (Fukumori, Yoshihiro)

金沢大学・その他部局等・その他

研究者番号：60135655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁気センサーとして働く細菌の細胞内小器官「マグネトソーム」の形成過程を解析した。マグネトソーム小胞の形成初期に関わる4つの蛋白質に着目し、その細胞内局在と蛋白質相互作用を網羅的に調べた。その結果、これらのマグネトソーム形成に関わる蛋白質群は、マグネトソームに局在し互いに相互作用すること、また、マグネトソーム小胞内への鉄輸送や酸化還元反応に関与する蛋白質群とも複合体を形成することが示唆された。さらに、マグネトソーム合成を制御できる磁性細菌株を用いた生細胞蛍光イメージングにより、マグネトソームの動的な形成過程の観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、「マグネトソーム」形成に必須の蛋白質の実態に世界で初めて迫った。これまでのところ、マグネトソームをはじめとする細菌の細胞内小器官の形成メカニズムは、ほとんど明らかにされていない。細菌の細胞内小器官は、CO₂固定、窒素循環、水素生産、エネルギー生産などの生命活動と地球環境にとって重要な化学反応の場であり、その形成に必須の蛋白質に関する知見は、これらの反応の効率化や、新しい機能を有した細胞内小器官の創成を目指した研究の基礎として重要である。

研究成果の概要(英文)：The bacterial organelle "magnetosome" allows a bacterial cell to be sensing the magnetic field. In this study, we focused on the four magnetosomal proteins involved in the magnetosome vesicle formation process. We analyzed subcellular localizations of these vesicle forming proteins and identified protein partners interacting with these proteins in magnetosomes. The results suggested that the vesicle forming proteins localize in magnetosomes and interact with each other to form protein complexes. Moreover, these proteins interact with the magnetosomal proteins associated with iron uptake and redox reactions. Furthermore, we succeeded in observing the dynamic magnetosome assembly process by live-cell fluorescence imaging using the strain capable of genetically controlling magnetosome synthesis.

研究分野：生化学

キーワード：磁性細菌 オルガネラ 原核細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、多くの生物が地磁気を感じ、生存戦略に利用することが知られているが、生物磁気感知の分子機構はほとんど明らかにされていない。磁性細菌は、生物の磁気感知機構を研究するための優れた材料である。磁性細菌は、磁鉄鉱結晶(磁石)・蛋白質・リン脂質膜で構成されるマグネトソームとよばれる細胞内構造を形成する(図1)。マグネトソームは、磁性細菌が地磁気の方に沿って遊泳するための磁気センサーとして働く。磁性細菌は、湖沼や海洋などの水環境中において、鉛直方向に傾いた地磁気に沿って遊泳することで、遊泳方向を上下方向に限定し、生育に適した微好気環境を効率的に見出す[1]。興味深いことに、細菌(原核細胞)の細胞内構造でありながら、マグネトソームは、真核細胞のオルガネラの特性を有する。オルガネラ(細胞小器官)とは「膜で仕切られ、特化した形態と機能をもつ細胞内構造物」であり、真核細胞の特徴と考えられてきた。マグネトソームは、リン脂質膜小胞により細胞質から区分され、棒磁石のような特化した形態と磁気センサーとしての機能をもつ。また、細胞分裂時には娘細胞に均等分配され受け継がれる。以上のように、真核細胞のオルガネラと比較しても遜色ない組織化された構造と機能をもつ。しかしながら、細菌の細胞内でどのようにしてこのような複雑な原核細胞オルガネラが形成されるのか、そのメカニズムは全く分かっていない。本研究では、細菌に磁気感知という特性をもたらしているナノサイズの磁気オルガネラ「マグネトソーム」の形成過程に注目する。



図1 磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の透過型電子顕微鏡写真。細胞中央に長軸に沿って直鎖上に並ぶ黒い粒子がマグネトソーム。

これまでの研究で、研究代表者らは、マグネトソームに特異的な蛋白質が局在することを明らかにした[2]。また、世界で初めて高速原子間力顕微鏡を用いてマグネトソームを生理的条件下で観察することに成功し、リン脂質膜小胞の外側に蛋白質層があることを明らかにし、構成蛋白質とその機能の一端を報告した[3]。これらマグネトソーム局在蛋白質(約30種類)は、磁性細菌に特有の機能未知の蛋白質群であり、マグネトソームの形成と機能を担っている。これらの蛋白質はゲノム上のマグネトソームアイランドとよばれる領域にまとめてコードされる(図2)。研究代表者らは、これまでにマトリクスを被う MamA [3]、アクチン様細胞骨格蛋白質 MamK [4, 5]、ヘム蛋白質 MamP [6]などのマグネトソーム局在蛋白質の機能を解析した。一方、米国とドイツの研究グループは、それぞれ独立にマグネトソームアイランドの遺伝子群を網羅的に欠損させ、その表現型からマグネトソーム合成のモデルを提案した[7, 8]。図2は、提案されたモデルを最新の知見をもとに修正したものである。このモデルでは、まず膜小胞が MamI, L, Q, B の働きにより形成される。次に蛋白質輸送などに関与すると考えられる MamA, E が働く。細胞骨格 MamK と MamJ, Y により、マグネトソームは細胞中央に直鎖状に配置される。さらに鉄輸送蛋白質(MamB, H, M, Z)により鉄イオンがマグネトソーム小胞内へ輸送される。また、ヘム蛋白質(MamE, P, T, X, O)が磁鉄鉱結晶成長のための鉄酸化還元反応を担い、マグネトソーム内の環境を磁鉄鉱形成のために調節する。最後に、磁鉄鉱結晶の大きさや形を調節する一群の蛋白質により結晶が成熟する。しかしながら、このモデルは、欠損株細胞の電子顕微鏡観察に基づく予想であり、実際の生きた細胞内でモデルのような蛋白質複合体が本当に形成され、働いているのかは不明である。

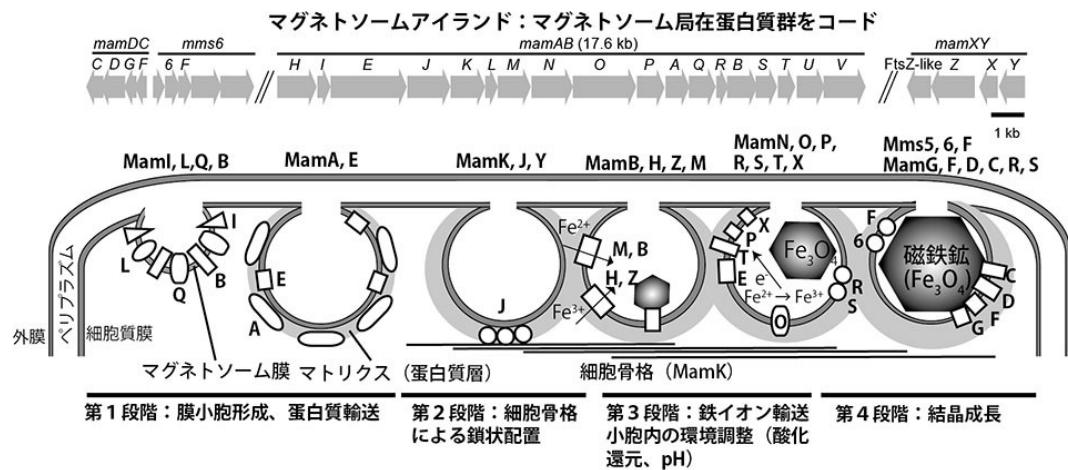


図2(上) マグネトソームアイランドの模式図。マグネトソーム形成に関わる磁性細菌に特異的な蛋白質群がコードされる。(下) マグネトソームアイランドにコードされる個々の遺伝子を網羅的に欠損させた細胞の電子顕微鏡観察から提案されたマグネトソーム形成過程のモデル。

2. 研究の目的

本研究では、細菌に磁気感知という特性をもたらしているナノサイズの原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の形成過程の解明に取り組む。特に、マグネトソーム形成の初期段階に必須の蛋白質であることが遺伝子欠損株を用いた研究により示された MamI, MamQ, MamL 及び MamB 蛋白質に着目した。これまでに、これらの蛋白質についての生化学的な研究は行われておらず、マグネトソーム小胞形成に、どのように寄与するのか具体的なメカニズムは不明である。本研究では、これらの蛋白質の実態を解析することを目的に、蛋白質の局在、発現、蛋白質相互作用を解析した。さらに、マグネトソームの形成過程を分子生物学的にコントロールできる実験系を用いて、マグネトソームの形成過程を生細胞蛍光イメージングにより解析した。

3. 研究の方法

(1) マグネトソーム小胞形成蛋白質の生細胞イメージング

マグネトソーム小胞形成蛋白質の生細胞蛍光観察のため、GFP または Halotag と MamI, MamQ, MamL 及び MamB 蛋白質の融合蛋白質を、それぞれ応宿主域ベクター pBBR111 を用いて磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (以降 AMB-1 と記載) に発現させた。蛍光蛋白質の細胞内局在は、全反射蛍光顕微鏡を用いた遮光照明法により観察した。抗 MamI 抗体及び抗 MamQ 抗体作製のため、MamI 及び MamQ 蛋白質を発現する組換え大腸菌を作出し、大腸菌から蛋白質精製標品を得た。精製した蛋白質を抗原としてポリクローナル抗体を作製した。得られた抗体と AMB-1 の細胞分画を用いたウエスタンブロッティングにより蛋白質の発現と細胞内局在を確認した。

(2) マグネトソーム小胞内の pH イメージング

GFP 由来の pH 感受性蛍光蛋白質を AMB-1 細胞内に発現させ、顕微分光装置を用いて細胞の GFP 蛍光スペクトルを測定することで、生きた細菌のマグネトソーム内外の pH を調べた。マグネトソーム内の pH 測定には、膜貫通領域を1つもつマグネトソーム局在蛋白質 Mms6 と E₂GFP の融合蛋白質を、マグネトソーム外の pH 測定には膜貫通領域を2つもつマグネトソーム局在蛋白質 MamC と E₂GFP 融合蛋白質を用いた。

(3) Halotag アフィニティクロマトグラフィを用いた蛋白質相互作用解析

AMB-1 細胞に、プラスミド上から MamI-Halotag または MamQ-Halotag 融合蛋白質を発現させた。これらの細胞から得たマグネトソーム及び膜画分を界面活性剤で可溶化し、Halotag と特異的に結合するアフィニティカラムにかけた。カラムに吸着した蛋白質を 7M 尿素溶液で溶出し、質量分析器 Thermo Orbitrap QE plus を用いて LC-MS 解析を行い、溶出サンプル中の蛋白質組成を網羅的に同定した。

(4) MamQ 誘導株を用いたマグネトソーム形成過程の生細胞イメージング

マグネトソーム形成に必須の蛋白質である MamQ の発現を、薬剤で誘導することでマグネトソーム形成を制御できる磁性細菌株 [9]を用いた生細胞蛍光イメージングにより、マグネトソーム鎖の形成過程を動画観察した。Q_{Ind}株細胞を、微好気的環境下で観察チャンバー内に生きたまま固定し、全反射蛍光顕微鏡を用いた遮光照明法により GFP 標識したマグネトソームの細胞内動態を観察した。

4. 研究成果

(1) マグネトソーム小胞形成蛋白質の可視化と細胞内局在

マグネトソーム形成の初期段階に関わる MamI, MamQ, MamL 及び MamB 蛋白質の細胞内局在を生細胞蛍光イメージングにより調べた。本研究では、蛍光タグ蛋白質として GFP と Halotag を用いた。その結果、C 末端側に GFP を融合させた MamI, Q, L, B、加えて C 末端側に Halotag を融合させた MamI, Q, L の AMB-1 細胞における発現に成功した。いずれの蛍光シグナルも細胞の長軸に沿って直鎖状に局在していた (図3)。これらの結果から、4つのマグネトソーム小胞形成蛋白質はマグネトソーム鎖に局在すること、Halotag が AMB-1 細胞において GFP と同様にマグネトソーム蛋白質の標識蛋白質として利用可能であることが示された。Halotag は多色蛍光による生細胞内イメージングや、細胞内での蛋白質相互作用解析に利用できる多機能性のタグ蛋白質であり、マグネトソーム形成機構の解析に有効である。これ

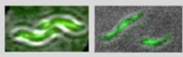
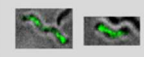
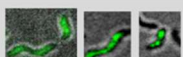
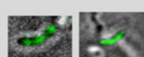
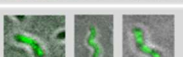
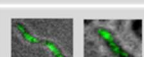
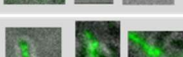
	GFP	Halotag	Fluorescence image	Localization
MamI			Linear	Magnetosome
MamQ			Linear	Magnetosome
MamL			Linear	Magnetosome
MamB		×	Linear	Magnetosome

図3 蛍光タグ蛋白質を用いたマグネトソーム小胞形成蛋白質の細胞内局在

まで AMB-1 細胞内での Halotag 発現は達成されていなかったが、本研究で halotag 遺伝子のコードンの最適化を行うことで AMB-1 での Halotag 発現に成功した。さらに、本研究で作製した抗 MamI 抗体及び抗 MamQ 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、MamI および MamQ が精製したマグネトソームに局在していることを確認した。

(2) マグネトソーム小胞内の pH イメージング

GFP 由来の pH 感受性蛍光蛋白質を AMB-1 細胞内に発現させ、顕微分光装置を用いて細胞のもつ蛍光スペクトルを測定することで、生きた AMB-1 細胞内の pH を調べた。マグネトソーム局在蛋白質と pH 感受性蛍光蛋白質の融合蛋白質を用いて、マグネトソーム小胞内部の pH の測定に成功した。マグネトソーム小胞内部の pH は、磁鉄鉱合成の行われる対数増殖期特異的に増加することが明らかになった。この結果は、磁鉄鉱合成とマグネトソーム内 pH 変化との関連を示唆する。本研究は、マグネトソーム内の pH を測定する方法を世界で初めて開発したもので、研究成果を論文発表した[10]。

(3) マグネトソーム小胞形成蛋白質の蛋白質相互作用

Halotag アフィニティークロマトグラフィーと MS-LS 解析により AMB-1 細胞内で MamI または MamQ と複合体を形成する蛋白質を網羅的に同定した。その結果、MamI と MamQ は、マグネトソーム形成の初期段階である膜小胞形成に関わる蛋白質 (MamI, Q, B)、マグネトソームへの蛋白質輸送などに関与すると考えられる蛋白質 (MamA, E)、鉄輸送や小胞内の環境調節に関わる蛋白質 (MamB, M, O, H, Z, T) と相互作用または複合体を形成することが示唆された。興味深いことに、これらは、いずれもマグネトソーム形成過程の前半部に関わると考えられている蛋白質であった。一方、マグネトソーム形成過程の後期で働く磁鉄鉱結晶合成に関わる蛋白質は、ほとんど検出されなかった。このことは、MamI と MamQ がマグネトソーム形成の初期段階で働くことを示すとともに、マグネトソームの形成過程には複数の蛋白質複合体が関わり、形成段階によって異なる蛋白質複合体が機能することを示唆する (論文投稿準備中)。

(4) マグネトソーム形成過程の生細胞イメージング

マグネトソーム合成を制御できる MamQ 誘導株を用いて、生細胞蛍光イメージングによりマグネトソーム形成過程を動画観察した。マグネトソーム合成の誘導開始後 2 時間までは、形成されたマグネトソームは細胞膜上をランダムに拡散した。しかし、4 時間後には細胞中央に直線状に固定された。本研究により、マグネトソーム鎖の形成過程の動的観察に初めて成功した。さらに、マグネトソーム配置に関わる MamK 細胞骨格を欠損させた MamQ 誘導株で同様の観察を行ったところ、初期のマグネトソーム配置は MamK 細胞骨格に非依存的で、未知の因子がマグネトソームの配置に関わることが明らかになった。

<参考文献>

- | | |
|---|---|
| [1] Nat Rev Microbiology 14:507-519 (2016). | [6] FEMS Microbiol Lett 358:21-29 (2014). |
| [2] J Bacteriol 188: 3805-3812 (2006). | [7] PNAS 12:5593-559 (2010). |
| [3] PNAS 107: 9382-9387 (2010). | [8] J Bacteriol 196: 2658-2669 (2014). |
| [4] J Bacteriol 189: 8737-8740 (2007). | [9] mBio 7: e01898-15 (2016). |
| [5] mBio 8:e00679-17 (2017). | [10] Biosci Biotechnol Biochem 82:1243-1251 (2019). |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Eguchi, Y., Fukumori, Y., Taoka, A.	4. 巻 82(7)
2. 論文標題 Measuring magnetosomal pH of the magnetotactic bacterium <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 using pH-sensitive fluorescent proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1243-1251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1451739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 田岡東, 福森義宏	4. 巻 96(5)
2. 論文標題 細菌の磁気感应運動のためのオルガネラ「マグネトソーム」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 248-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 A. Taoka, A. Kiyokawa., C. Uesugi., Y. Kikuchi, Z. Oestreicher, K. Morii, Y. Eguchi, Y. Fukumori	4. 巻 8
2. 論文標題 Tethered magnets are the key to magnetotaxis: direct observations of <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 show that MamK distributes magnetosome organelles equally to daughter cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00679-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00679-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Eguchi, Y. Fukumori, A. Taoka	4. 巻 in press
2. 論文標題 Measuring magnetosomal pH of the magnetotactic bacterium <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 using pH-sensitive fluorescent proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1451739	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 田岡 東、福森義宏	4. 巻 58
2. 論文標題 細菌のアクチン様細胞骨格による磁気オルガネラの配置とその役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 91-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.58.091	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 Miyata, M., Robinson, R.C., Uyeda, T.Q.P., Fukumori, Y. et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Tree of motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells.	6. 最初と最後の頁 6-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi, Y., Obana, N, Toyofuku, M., Koder, N., Soma, T., Ando, T., Fukumori, Y., Nomura, N., and Taoka, A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 7950-7959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NR10850E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 江口 友佳子、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 pH感受性蛍光蛋白質を用いた原核細胞およびオルガネラ内のpH蛍光イメージング解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Taoka, Y. Eguchi, Y. Kikuchi, Y. Fukumori
2. 発表標題 Measuring magnetosomal pH in living magnetotactic bacterial cell
3. 学会等名 the 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Fukumori, A. Taoka
2. 発表標題 Structure and function of molecular machinery for magnetotaxis
3. 学会等名 The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池 洋輔, 尾花 望, 豊福 雅典, 野村 暢彦, 古寺 哲幸, 安藤 敏夫, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 高速AFM解析により明らかになったグラム陰性菌及びグラム陽性菌の産生するメンブランベシクルの物性多様性
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yousuke Kikuchi, Nozomu Obana, Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura, Noriyuki Kodera, Toshio Ando, Yoshihiro Fukumori, Azuma Taoka
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopic observations explore molecule mechanism of bacterial cell-cell communication using membrane vesicles
3. 学会等名 Towards Microbial Control ver 3.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田岡 東、福森義宏
2. 発表標題 磁石を操る
3. 学会等名 第7回日本微生物学連盟フォーラム「微生物変わり者たちの素顔」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taoka Azuma, Yousuke Kikuchi, Nozomu Obana, Masanori Toyohuku, Nobuhiko Nomura, Noriyuki Kodera, Toshio Ando, Yoshihiro Fukumori
2. 発表標題 Imaging of membrane vesicles for bacterial communication
3. 学会等名 CHOZEN Project International Symposium on Atomic Force Microscopy at Solid-Liquid Interfaces, (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Azuma Taoka, Ayako Kiyokawa, Yousuke Kikuchi, Yoshihiro Fukumori
2. 発表標題 Actin-like MamK cytoskeleton tethers bacterial magnetosome organelle in a chain
3. 学会等名 International Symposium on "Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲川 麻織奈、菊池 洋輔、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 全反射蛍光顕微鏡を用いたアクチン様蛋白質MamKの重合特性解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江口 友佳子、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 磁性細菌の生細胞内pHの蛍光イメージング
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taoka, A., Kikuchi, Y., and Fukumori Y.
2. 発表標題 Imaging of Dynamic Polymerization of Actin-Like Protein MamK for Bacterial Organelle
3. 学会等名 ASM microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口 友佳子、田岡 東、福森 義宏
2. 発表標題 Analysis of pH regulation in magnetotactic bacteria using pH-sensitive fluorescent protein
3. 学会等名 第93回日本細菌学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 新菜、菊池 洋輔、福森 義宏、田岡 東
2. 発表標題 マグネトソームの細胞内配置を担うアクチン様蛋白質MamKの機能保存性
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Taoka, A. and Fukumori, Y.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 3-22
3. 書名 Biological Magnetic Materials and Applications	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----