

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15430

研究課題名（和文）原核細胞オルガネラの内部環境制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism regulating microenvironment within prokaryotic organelle

研究代表者

江口 友佳子（Eguchi, Yukako）

金沢大学・ダイバーシティ推進機構・特任助教

研究者番号：60838506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：磁性細菌は膜小胞の中に磁鉄鉱結晶を生合成することで、地磁気を感じるための原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」を形成するが、その内部環境の制御機構は未解明である。本研究では、マグネトソーム内部のpH制御に関わると考えられる蛋白質に着目し、その欠失株におけるマグネトソーム内外のpH測定、鉄動態の観察に向けた基盤を構築した。本研究により、酸化還元電位やその他の生体分子の動態等を解析する手法の開発に発展させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガネラの内部環境の制御に関しては、真核細胞ではよく研究されているが、原核細胞オルガネラの内外の環境制御の研究については今後の展開が待たれる。本研究において、原核細胞オルガネラにおけるpH測定や鉄動態の観察に向けた基盤を構築した。この基盤により、その他の環境因子のイメージング技術の確立や、磁性細菌以外の細菌の持つオルガネラにおける環境制御のメカニズムの解析にも応用の可能性が広がる。

研究成果の概要（英文）：Magnetotactic bacteria form prokaryotic organelles called “magnetosomes”, which function as magnetic compasses. The formation of magnetosomes is accomplished by the synthesis of magnetite nanocrystals within magnetosome vesicles. However, the mechanism of regulating the microenvironment within magnetosome vesicles during synthesis of magnetite crystals remains elusive. In this study, the basis for pH measurement and observation of ferric ion dynamics under the lack of proteins considered to be involved in pH regulation was constructed. This research will lead to the establishment of methods for analyzing redox potential and other biomolecular dynamics.

研究分野：微生物学

キーワード：原核細胞オルガネラ オルガネラ内部環境 磁性細菌 バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

生物は、生体膜によって内側と外側の環境を隔て、内部の環境を適切に制御することで生命活動を維持する。真核生物は、細胞内を膜によって区画化し、特化した機能をもつオルガネラを形成する。その内部は、特化した機能に最適な環境に整備されている。H⁺の濃度 (pH) は化学反応や蛋白質の活性を左右する重要な環境要因であり、真核生物のオルガネラ内部の pH の制御はその機能に必要な不可欠である。

磁性細菌は、細胞質膜に由来する膜小胞の中で磁鉄鉱結晶 (Fe₃O₄) を生合成することで形成される「マグネトソーム」をもつ (図1)。マグネトソームは、地磁気を感知する磁気コンパスとして機能し、磁性細菌が生育に適した微好気的な環境へ効率的に移動するために利用される。マグネトソームが磁気コンパスとして機能するには、サイズ (約 50 nm) や形状が均一な単磁区構造の磁鉄鉱結晶を生合成し、微弱な地磁気に沿って細胞を配向させるために必要十分な磁力を生み出さなくてはならない。このような特性をもつ磁鉄鉱結晶を生合成するためには、磁鉄鉱の生合成の場であるマグネトソームの内部環境 (pH、酸化還元電位、鉄の濃度など) を精密に制御する必要があると考えられるが、どのような分子機構で制御されているのかは未解明である。

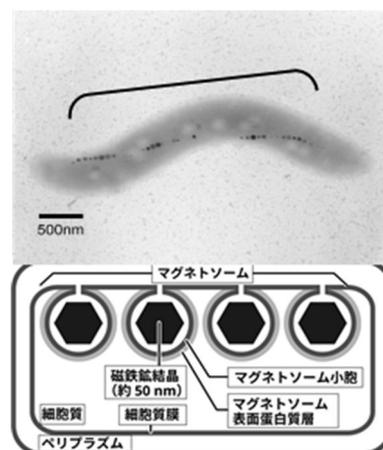


図1 (上) 磁性細菌の透過型電子顕微鏡写真。磁気コンパスとして機能するマグネトソームが細胞長軸に沿って直鎖状に並び。(下) マグネトソームの構造。細胞質膜が陥入してできた小胞内で磁鉄鉱結晶が合成される。

2. 研究の目的

マグネトソーム内部の pH 制御機構の仮説として、①輸送体蛋白質による H⁺の輸送、②マグネトソーム表面蛋白質による H⁺の誘引が考えられる (図2)。そこで本研究では、輸送体蛋白質の MamB、MamM、MamN および、マグネトソーム表面蛋白質の MamA に着目した。これら4つの蛋白質は、マグネトソームの形成に必須の蛋白質群 (18 種) の内に含まれている。MamB、MamM は、2 価金属イオン輸送体のホモログであり、H⁺の交換輸送のエネルギーにより Fe²⁺をマグネトソーム内部に輸送することが期待される。また、MamN は、Na⁺/H⁺交換輸送体のホモログであり、マグネトソームの pH に直接的に影響している可能性がある。さらに、MamA は蛋白質間相互作用に関わることが予想される TPR (tetratricopeptide repeat)モチーフから成る蛋白質で、マグネトソームの外側表面を覆う蛋白質層を構成している。これらの蛋白質の欠失により、磁鉄鉱の生合成が阻害されることが明らかになっている。しかし、これらの蛋白質の機能解析は主に電子顕微鏡を用いた表現型の観察に基づいており、マグネトソームの pH の制御という観点からこれらの蛋白質の機能を解析した例はない。そこで本研究では、マグネトソーム局在輸送体および表面蛋白質の機能解析を通じて、磁性細菌のマグネトソーム内部の pH がどのように制御され、pH の制御が磁鉄鉱の生合成にどのように寄与するかを解明する。

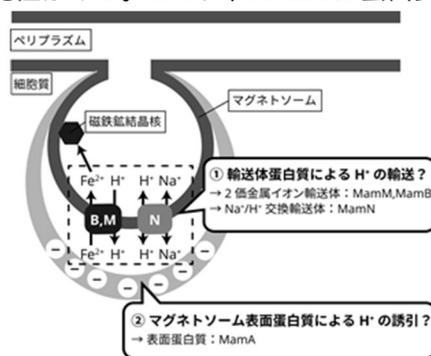


図2 マグネトソーム内部pHの制御機構の作業仮説

3. 研究の方法

(1) マグネトソーム内 pH 制御の候補蛋白質欠失株の作成

マグネトソーム内 pH 制御の候補蛋白質の機能を解析するため、MamN の欠失株を作成した。磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 のゲノム中の *mamN* 遺伝子の上流と下流を繋げた配列を高宿主域ベクター pK18mobsacB に組み込み、*Escherichia coli* WM3064 へ導入した。*E. coli* WM3064 に導入されたプラスミドを *M. magneticum* AMB-1 へ接合により導入した。スクロースの2段階スクリーニングにより、2回相同組換えを起こした株を選抜することで、MamN 欠失株を得た。得られた MamN 欠失株の表現型は、電子顕微鏡観察により確認した。

(2) 生細胞 pH 蛍光イメージング法による候補蛋白質の機能解析

MamN がマグネトソーム内の pH を制御しているか検証するため、①で作製した欠失株において、蛍光イメージングによる pH 測定法によりマグネトソーム内の pH の測定を試みた。マグネトソーム局在蛋白質である Mms6 と pH 感受性蛍光蛋白質 E²GFP の融合蛋白質を発現させることで、E²GFP をマグネトソームの内側に局在させた。顕微分光器を装備した全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) により Mms6-E²GFP を発現させた候補蛋白質欠失株の蛍光スペクトルを測定することで、マグネトソーム内部の pH を測定した。また、生育段階によるマグネトソームの pH 変化を調べ

るため、磁性細菌を培養しながら経時的に pH を測定する方法の検討を行った。顕微分光装置を用いた方法では観察時間を通して安定した測定結果を得ることができなかつたため、透過波長域の異なる蛍光フィルターを用いる方法を考案した。2 種類の蛍光フィルターを用いて、蛍光強度比のイメージの取得を試みた。

(3) 輸送体蛋白質の活性評価のための蛋白質発現系の構築

MamN が H^+ と陽イオンを交換輸送する活性があるかどうかを *In vitro* で検証するため、大腸菌における MamN 発現系の構築を試みた。T7 プロモーター下で目的蛋白質の発現を誘導可能な pET29b ベクターに *mamN* 遺伝子を導入し、C 末端に His タグが付加されるよう発現ベクターを作成した。作製した発現ベクターを *E. coli* BL21(DE3)、C41 (DE3)、C43(DE3) に導入し、発現誘導後、継時的に細胞をサンプリングし、MamN 蛋白質の発現条件を検討した。MamN 蛋白質の産生は、細胞から抽出した蛋白質を SDS-PAGE 後、His-tag 染色することで確認した。

(4) 細胞内鉄動態の観察方法の検討

候補蛋白質のマグネトソーム内への鉄の輸送への影響を調べるため、(1) で作製した欠失株において磁性細菌の細胞内鉄動態を観察する方法の確立を試みた。磁性細菌での観察方法の樹立に先立ち、原生生物のモデル生物の一種である *Tetrahymena pyriformis* に磁性細菌を捕食させ、鉄の局在を観察できるか検討した。 Fe^{2+} に特異的に結合する蛍光試薬 (FerroOrange) を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡により鉄の局在を観察した。

4. 研究成果

(1) マグネトソーム内 pH 制御の候補蛋白質欠失株の作製

スクリーニングの結果、培養した 96 株中、3 株において *mamN* 遺伝子の欠損を確認した。作製した MamN 欠失株を透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞内に磁鉄鉱結晶が形成されていないことが確認され、MamN 欠失株の作成に成功した。

(2) 生細胞 pH 蛍光イメージング法による候補蛋白質の機能解析

(1) にて作成した MamN 欠失株、既に保有していた MamA 欠失株において、Mms6-E²GFP 発現株を作製し、蛍光観察により発現を確認した。蛍光観察の結果、細胞中央に直線状の蛍光シグナルが観察され、作成した株において E²GFP がマグネトソームに局在していることが示された。作成した Mms6-E²GFP 発現株において、蛍光スペクトルを測定したところ、測定した条件においては野生株との差が認められなかった。また、2 種類の蛍光フィルターを経時的に pH を測定する方法に使用する蛍光フィルターの検討を行ったが、蛍光シグナルのノイズが大きく、蛍光強度比と pH の有効な標準曲線を得ることができなかつた。特異的な蛍光フィルターを用いることで、測定方法の改善を行う。

(3) 輸送体蛋白質の活性評価のための蛋白質発現系の構築

発現ベクターを導入した各大腸菌の細胞から抽出した蛋白質を SDS-PAGE 後、His-Tag 染色を行ったところ、誘導後特異的に増加する蛋白質の存在は認められず、MamN 蛋白質の産生を確認できなかった。コールドショック発現系や無細胞合成系を用いるなど、難発現蛋白質に適した方法で発現条件を検討する。

(4) 細胞内鉄動態の観察方法の検討

磁性細菌を捕食させた *T. pyriformis* 細胞において FerroOrange の蛍光シグナルを観察したところ、鉄は食胞に局在していることが示された。また、磁性細菌を捕食していない細胞と蛍光強度を比較して、磁性細菌を捕食した細胞は約 5 倍の鉄を蓄積していることが示唆された。この観察方法を磁性細菌に適用することで、磁鉄鉱合成時の細胞内鉄動態の観察方法の確立に発展させる。

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 1件）

1. 著者名 Taoka Azuma, Eguchi Yukako, Shimoshige Rino, Fukumori Yoshihiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Recent advances in studies on magnetosome associated proteins composing the bacterial geomagnetic sensor organelle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 228 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13062	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 Eguchi Yukako, Taoka Azuma	4. 巻 2646
2. 論文標題 Live-Cell Fluorescence Imaging of Magnetosome Organelle for Magnetotaxis Motility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3060-0_12	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 Seki Yusuke, Eguchi Yukako, Taoka Azuma	4. 巻 15
2. 論文標題 Influence of protozoan grazing on magnetotactic bacteria on intracellular and extracellular iron content	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1758-2229.13140	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊池 咲紀, 江口 友佳子, 田岡 東
2. 発表標題 NanoBRET法を用いたマグネトソームタンパク質間相互作用の検出法の開発
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 瑞希, 江口 友佳子, 田岡 東
2. 発表標題 細菌オルガネラ「マグネトソーム」の形成初期に起こるタンパク質間相互作用の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukako Eguchi, Yusuke Seki, Yoshinobu Ikeda, Yoshihiro Fukumori, Azuma Taoka
2. 発表標題 Identification of protozoan predators that feed on magnetotactic bacteria from freshwater environment.
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下茂 梨乃, 江口 友佳子, 田岡 東
2. 発表標題 Qind株を用いた細胞内で新規合成されたマグネトソーム配置機構解析
3. 学会等名 第18回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口 友佳子, 高岡 祐太, 川村 想, 福森 義宏, 田岡 東
2. 発表標題 Imaging of amphitrichous flagellar rotations in Magnetospirillum magneticum AMB-1
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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