

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23226016

研究課題名(和文)磁気微粒子合成オルガネラの再構築による有用物質生産磁性細菌の創製

研究課題名(英文)Development of Magnetotactic Bacteria Producing Useful Substances, through the Reconstruction of Organelles Synthesizing Magnetic Particles

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)・学長

研究者番号：10134834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 160,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、磁気回収が可能な新規有用物質生産微生物を創製することを大目的としている。磁性細菌の磁気微粒子合成オルガネラであるマグネトソームを再構築するための要素技術開発を行った。具体的には、下記の成果を得た。(1)磁気微粒子のサイズ・形態制御に関わるタンパク質の機能を明らかにした。(2)マグネトソームタンパク質の細胞内局在を明らかにした。(3)細菌に導入する遺伝子の組み合わせによって、磁気微粒子の形態・サイズ・数を制御する基盤技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to construct novel microorganisms which can be magnetically collected and produce useful substances. For this purpose, we established core technologies to modify magnetite synthesis organelle, specifically called as magnetosomes. Following results were obtained from this study. (1) Size and shape control mechanism of magnetite crystals involving several proteins were clarified. (2) Subcellular localizations of proteins involved in magnetosome formation were characterized. (3) Fundamental technologies for the control of size and shape of magnetite crystals were established by gene recombination and gene expression control in the magnetotactic bacterial cell.

研究分野：工学、プロセス工学

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

1. 研究開始当初の背景

磁性細菌と呼ばれるバクテリアは、温和な条件下でマグネタイト(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。この細菌は、環境水中に存在する鉄イオンを取り込み、細胞内で結晶化することで磁気微粒子を合成する。磁気微粒子の合成によって、細菌は磁力線に沿って泳動する性質を持ち、磁気回収することが可能である。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(長形八面体、十四面体など)や弾丸状などの多様な形態の磁気微粒子を合成することから、その合成機構が工学的にも興味を持たれている。これまで研究代表者らは、複数の磁性細菌株の分離に成功し、磁性細菌の遺伝子組換え法や大量培養法を確立した。2005年には α プロテオバクテリアに属する *Magnetospirillum magneticum* AMB-1株(以下、AMB-1株)の全ゲノムを明らかにし、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)の中で合成されることを提唱してきた。特に、これまで全く不明とされてきた磁気微粒子の結晶形成過程に関わる Mms6 タンパク質を発見した。近年、従来解析されてきた磁性細菌とは進化的な系統が全く異なる δ プロテオバクテリアの *Desulfovibrio magneticus* RS-1株(以下、RS-1株)の全ゲノム解析にも成功し、AMB-1株との比較ゲノム解析から、磁性細菌に共通の遺伝子領域を同定した。この遺伝子領域がコードするタンパク質は特にマグネトソームタンパク質と呼ばれ、マグネトソームの近傍に発現し磁気微粒子の合成に重要な役割を果たすことがわかっている(図1)。さらに、同遺伝子領域が環状構造を取ってゲノムから欠損することを実験的に証明し、ゲノミックア



図1 磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1株のMAI遺伝子領域

일랜드様の可動性の遺伝子(Magnetosome Island: MAI)として進化の過程で細菌間に広がったことを示した。一方で、米国や独国の研究グループによっても、大規模な遺伝子変異株の解析や新種の磁性細菌のゲノム解析が行われ、マグネトソーム形成に必要な遺伝子の同定が進められている。このようにマグネトソーム合成機構の概要やこれに関与する分子の機能が明らかにされつつある中、世界的な合成生物学の研究の機運に乗じて、磁気微粒子合成能を多様な生物種に付与する試みがなされることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、世界の研究グループに先駆け

て、磁性細菌のゲノムを利用することで、磁気微粒子合成オルガネラであるマグネトソームを多様な細菌内で再構築することを目的とした。そのため、生体の中で行われる複雑な無機合成プロセスの詳細な理解と、これを担う遺伝子の再編成や発現を制御する基盤技術の構築を行った。具体的には、以下の項目について検討を行った。

- (1) 磁気微粒子の結晶形成に関わるタンパク質の機能を明らかにする。
- (2) マグネトソームタンパク質の細胞内局在を明らかにする。
- (3) 細菌に導入する遺伝子の組み合わせによって、磁気微粒子の形態・サイズを自在に制御する基盤技術を構築する。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者らが分離した球状(切頂八面体)の磁気微粒子を合成する AMB-1株、及び弾丸状の磁気微粒子を合成する RS-1株の2種の磁性細菌株を研究材料として用いた(図2)。細菌へのマグネトソーム遺伝子の導

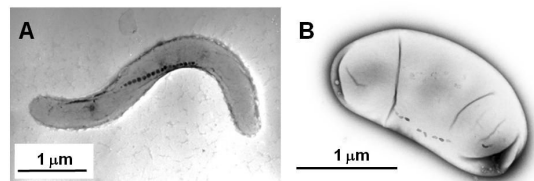


図2 AMB-1株(A)と RS-1株(B)の電子顕微鏡写真

入には、広域宿主ベクターである pRK415 を用いた。長鎖遺伝子領域の調製には、Gibson assembly法を用いた。遺伝子発現の解析には、Reverse transcription PCR 及び droplet digital PCR (QX200 ddPCR システム, BioRad)を用いた。細菌内におけるタンパク質の局在解析には、位相差/蛍光顕微鏡(BX51, オリンパス)及び共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, オリンパス)を用い、細胞内に形成したマグネトソーム及び磁気微粒子の観察は、透過型電子顕微鏡(JEM-1400, JEOL)を用いた。

4. 研究成果

- (1) 磁気微粒子の結晶形成に関わるタンパク質の機能解析

酸化鉄磁気微粒子の形成に関与する遺伝子を対象として、相同性組換えにより多様な遺伝子欠損株を作製し、それぞれの機能を解析した。*mms5* 遺伝子や *mms13* 遺伝子を欠損した変異株では、サイズの小さい球状(切頂八面体)の磁気微粒子を合成することがわかった。一方で、*mms6* 遺伝子欠損株と *mms7* 遺伝子欠損株においては、長径と短径の比が著しく異なる長形の磁気微粒子を合成した(図3)。また、これらの遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子の数は、1細胞あたり約20個であり、この数は野生株とほぼ同数であった。変異株は野生株と同等の鉄イオン取り込み能を有

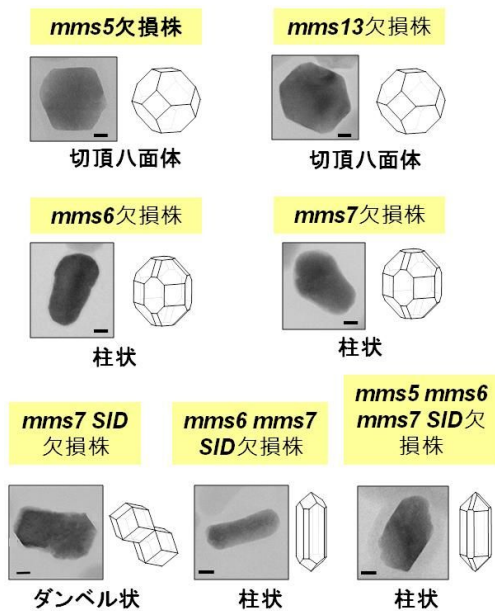


図3 遺伝子欠損株の合成する磁気微粒子の電子顕微鏡写真 Scale bar = 10 nm

し、マグネトソーム小胞も形成していることが確認された。したがって、*mms5* 遺伝子と *mms13* 遺伝子のコードするタンパク質は等方的に結晶成長を促進し、*mms6* と *mms7* 遺伝子がコードするタンパク質は異方的な結晶成長を促進するタンパク質であることが考えられた。これらの遺伝子欠損株が合成する磁気微粒子の平均粒径は、野生株と比較して小さいことから、*mms5*, *mms6*, *mms7*, *mms13* 遺伝子がコードするタンパク質は、磁気微粒子の結晶成長に関わることが明らかにされた。さらに、高分解能透過型電子顕微鏡による観察から、各遺伝子欠損株の合成する粒子の外形を形成している結晶面を特定し、それぞれの欠損株が合成する粒子表面が異なる結晶面から構成されることを明らかにした。AMB-1 株の磁気微粒子の形成においては、これらのタンパク質が協調的に機能することで、切頂八面体の形態を持つ酸化鉄結晶が合成されることを明らかにした。さらに、複数のマグネトソーム合成関連遺伝子を同時に欠損させることで、今まで報告例のない新規のダンベル状の形態や複雑な多面体の磁気微粒子を合成することにも成功した(図 3)。

(2) マグネトソームタンパク質の網羅的な細胞内局在解析

AMB-1 株のマグネトソームタンパク質を緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合することで、各タンパク質の細胞内局在解析を行った。構築を試みた 28 個の GFP 融合マグネトソームタンパク質発現ベクターのうち、21 個のベクターの構築が確認された。得られたベクターを AMB-1 株に導入し蛍光顕微鏡観察を行ったところ、10 株の形質転換体において GFP 融合タンパク質の発現が確認されたことから、これらの細胞内局在パターンを分類を行った。Mms13、Mms6、MmsF、MamH、MamJ、

直鎖状の局在

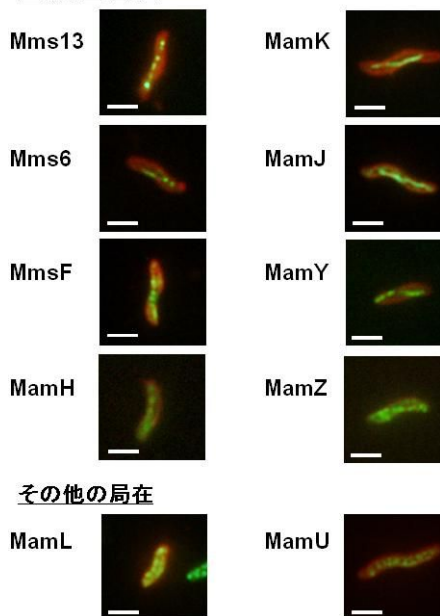


図4 GFP融合タンパク質を発現した磁性細菌の蛍光顕微鏡写真 Scale bar = 1 μm

MamK、MamZ、MamY の 8 つのタンパク質は細胞内で直鎖状に局在することが分かった(図 4)。一方、MamL は細胞膜に局在し、一部の菌体のみで直鎖状局在が確認され、MamU は直鎖状局在を示さなかった。次に、直鎖状局在を示した 8 株の蛍光画像に基づいて、細胞長に対するタンパク質の局在領域長の割合(以下、直鎖状局在長)を算出した。平均値を比較したところ MamH、MamZ、MamY に対して、MamJ、MamK、Mms13、Mms6、MmsF の直鎖状局在長が短いことが分かった。次に、タンパク質の局在と機能を比較した。短い直鎖状局在長を示した MamJ、MamK はマグネトソームの配置、Mms13、Mms6、MmsF は結晶成長に関わるタンパク質であった。一方、比較的長い直鎖状局在長を示した MamH、MamZ、MamY、2 つの局在パターンを示す MamL、直鎖状局在を示さない MamU は鉄イオンの酸化還元や小胞形成に関わるタンパク質であった。従って、マグネトソームタンパク質の局在と機能に相関があることが明らかになった。

(3) 磁気微粒子の形態・サイズを制御する基盤技術の確立

mms 遺伝子の発現制御に基づいた磁気微粒子の形態とサイズの制御

(1) の *mms7* 遺伝子欠損株の解析から Mms7 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。このことから、同タンパク質の発現量を変化させることで、細胞内において結晶成長を調節し、磁気微粒子の形態を制御できると考えられた。そこで、遺伝子発現誘導システムを用いて細胞内で *mms7* 遺伝子の発現制御を行った。誘導剤である Anhydrotetracycline (ATc) の培地中濃度の増加

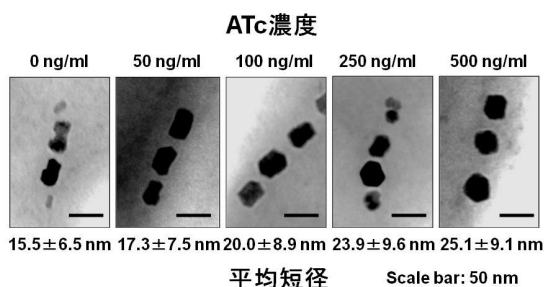


図5 培地中ATcの濃度に伴う磁気微粒子形態の変化

に伴い、*mms7* 遺伝子の増加が確認された。さらに、ATcの添加量の増加と共に、粒子の短径が伸長し、粒子形態がロッド状から球状に変化した(図5)。したがって、細胞内におけるMms7タンパク質の発現量を調節することで、磁気微粒子の特定方向への結晶成長を促進し、粒子形態を制御することが可能なが示された。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、用途に合わせた磁気特性を持つ磁気微粒子材料の合成が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計23件)

Masayoshi Tanaka, William Knowles, Rosemary Brown, Nicole Hondow, Atsushi Arakaki, Stephen Baldwin, Sarah Staniland, Tadashi Matsunaga “Biomagnetic Recovery and Bioaccumulation of Selenium Granules in Magnetotactic Bacteria” *Appl. Environ. Microbiol.*, (2016) in press (査読有)

DOI: 10.1128/AEM.00508-16

Toru Honda, Yoshiaki Maeda, Takayuki Yasuda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino “Novel Designs of Single-chain MHC I/peptide Complex for the Magnetosome Display System” *Protein Eng. Des. Sel.*, 28, 53-58 (2015) (査読有)

DOI: 10.1093/protein/gzu056

Jos J.M. Lenders, Harshal R. Zope, Ayana Yamagishi, Paul H.H. Bomans, Atsushi Arakaki, Alexander Kros, Gijsbertus de With, Nico A.J.M. Sommerdijk “Bioinspired Magnetite Crystallization Directed by Random Copolypeptides” *Adv. Funct. Mater.*, 25, 711-719 (2015) (査読有)

DOI: 10.1002/adfm.201403585

Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino “Stoichiometrically Controlled Immobilization of Multiple Enzymes on Magnetic Nanoparticles by the Magnetosome Display System for Efficient Cellulose Hydrolysis” *Biomacromolecules*, 16, 3863-3868 (2015) (査読有)

DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01174

Yasuhiro Sugamata, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino “Functional Expression of an scFv on Bacterial Magnetic particles by in Vitro Docking” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 445, 1-5 (2014) (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.102

Atsushi Arakaki, Ayana Yamagishi, Ayumi Fukuyo, Masayoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga “Co-ordinated 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

Yasuhiro Sugamata, Ryo Uchiyama, Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino “Functional Expression of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor on Nano-Sized Bacterial Magnetic Particles in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1” *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 14426-14438 (2013) (査読有)

DOI: 10.3390/ijms140714426

Yuka Kanetsuki, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino “Enhanced Heterologous Protein Display on Bacterial Magnetic Particles Using a Lon Protease Deletion Mutant in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1” *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 65-70 (2013) (査読有)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.016

Masayoshi Tanaka, Rosemary Brown, Nicole S Hondow, Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga, Sarah S Staniland “Highest Levels of Cu, Mn and Co Doped into Nanomagnetic Magnetosomes through Optimized Biomineralisation” *J. Mater. Chem.*, 22, 11919-11921 (2012) (査読有)

DOI: 10.1039/C2JM31520C

Masayoshi Tanaka, Kevin Critchley, Tadashi Matsunaga, Stephen D Evans, Sarah S Staniland, “Fabrication of Quantum Dots Embedded Lipid Tubules by Membrane Tubulation Protein”, *Small*, 8, 1590-1595 (2012) (査読有)

DOI: 10.1002/sml.201102446

(他13件)

[学会発表](計38件)

松永 是, “ナノバイオの展望 - ボトムアップアプローチとトップダウンアプローチ”, 分子・物質合成プラットフォーム平成25年度シンポジウム, つくば国際会場, 茨城県つくば市, 2014年3月10日.

Tadashi Matsunaga “Cell Bioelectronics and Biomagnet”, PRiME 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, HI, USA, October 12, 2012.

Tadashi Matsunaga “Genomic and Proteomic Approaches: Towards the Elucidation of Magnetosome Formation in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1”, The 3rd International Magnetotactic Bacteria Meeting (MTB2012), UC Berkeley, CA, USA, April 11, 2012.

(他 3 5 件)

〔図書〕(計 3 件)

Atsushi Arakaki, Michiko Nemoto, 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, John Wiley & Sons, Inc., 387(pp241-272) (2013)(査読無)

(他 2 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 是 (MATSUNAGA, Tadashi)

東京農工大学・学長

研究者番号：1 0 1 3 4 8 3 4

(2)研究分担者

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：1 0 3 6 7 1 5 4

吉野 知子 (YOSHINO, Tomoko)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：3 0 4 0 9 7 5 0

(3)連携研究者

山岸 彩奈 (YAMAGISHI, Ayana)

東京農工大学・大学院工学府・産官学連携

研究員

研究者番号：0 0 7 7 8 2 9 3

(4)研究協力者

田中 祐圭 (TANAKA, Masayoshi)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：6 0 5 3 3 9 5 8