

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850051

研究課題名(和文) 磁性細菌の磁気微粒子合成に関わる新奇ヘム蛋白質の機能解明

研究課題名(英文) Functional analyses of the novel hemoproteins for biomineralizing magnetic particles in magnetotactic bacteria

研究代表者

田岡 東 (TAOKA, Azuma)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：20401888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、磁性細菌における磁鉄鉱結晶形成機構の分子基盤を明らかにすることを目的として、磁性細菌ゲノムの保存された新奇のc型シトクロムの機能解析を行った。その結果、MamPは2つのヘムcをもつ膜結合型シトクロムであり、細胞質膜に局在し、磁鉄鉱結晶が合成される対数増殖期に発現が誘導されることがわかった。また、MamPは、マグネトソームにおける磁鉄鉱結晶の成長を促進する蛋白質であることが明らかになった。さらに、MamPが嫌気呼吸経路である脱窒との電子伝搬に関与することが示唆され、磁鉄鉱結晶形成時の電子伝達経路についてモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：Magnetotactic bacteria have unique c-type cytochromes for biomineralizing magnetite crystals. We characterized and analyzed one of the magnetotactic bacteria specific cytochrome c MamP using *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. MamP was localized in cytoplasmic membrane, and was specifically expressed during the exponential growth phase. According to MamP overproduction experiments, we found that MamP is crucial to the normal growth of magnetite crystals during the exponential growth phase. Moreover, we showed that MamP can be involved in electron transfer to denitrification pathway, and proposed the new model for the electron transfer pathway during the biomineralization of magnetite.

研究分野：分子微生物学

キーワード：細菌 磁性 磁鉄鉱 ヘム蛋白質 シトクロム バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

生命の歴史は、巨大な磁石である地球の上で営まれてきた。近年では、多くの生物が、磁気を感じることが知られている[1]。生物の磁気感知機構の分子メカニズムに関する知見は国内外を問わず乏しい状況であるが、その中でも磁性細菌は研究が最も進展している。磁性細菌は、細胞内磁気センサーをもち、地磁気を感じし磁場に沿って移動する“走磁性”を有する。磁性細菌は、磁鉄鉱結晶・蛋白質・リン脂質膜で構成される磁気コンパスの役割を果たす「マグネトソーム」を形成し、これを細胞の長軸方向に沿って直鎖状に配置する(図1)。その結果、本細菌は、地磁気の方に細胞を固定でき、磁場に沿って移動する。地磁気は鉛直方向に傾いているため、磁性細菌は生育に適した微好気環境を見出すことができる[2]。どのようにして、このナノサイズの磁気コンパスは形作られているのだろうか?“走磁性”という現象の記載と、それに関わる遺伝子群の同定は行われているが、マグネトソームがどのように形成されるのか、具体的なメカニズムは不明である。

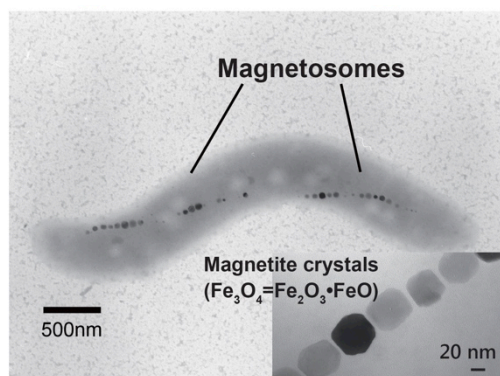


図1 磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の透過型電子顕微鏡写真。細胞内に直鎖状に並ぶ粒子がマグネトソーム。

2. 研究の目的

磁性細菌は、外界から鉄イオンを取込み、磁鉄鉱 (magnetite) 結晶を生合成し、磁気コンパスとして利用する。生物が鉱物を作り出す作用をバイオミネラリゼーションと呼ぶが、磁鉄鉱のバイオミネラリゼーションの分子機構は全く分かっていない。本研究では、コンパス機能の中心である磁鉄鉱合成の分子機構に迫る。磁性細菌ゲノム中のマグネトソームアイランドと呼ばれる領域には、磁性細菌に特異的に保存されたおよそ 30 種類の蛋白質群がコードされており、マグネトソームの形成と機能を担っている。従って、これらの蛋白質の機能を解析することで、磁気感知機構の分子メカニズムを解明することができる。磁鉄鉱 (Fe_3O_4 [$\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$]) は Fe^{2+} と Fe^{3+} の化合物であり、その合成には鉄の酸

化還元反応が必要である。マグネトソームアイランドには、新奇の膜結合型ヘム蛋白質がコードされており、マグネトソーム膜に局在していると考えられている。このうち、MamP は、ヘム c 結合部位を2つもち、すべての磁性細菌に保存されているが、既知のシトクロムとは同姓性を示さない。mamP 遺伝子欠損株では、細胞内の磁鉄鉱結晶の数が減少または小さな磁鉄鉱結晶が形成された[3]。このことから、このマグネトソーム特異的なシトクロム c が磁鉄鉱形成時の酸化還元反応を担っていると考えられる。そこで、これらの新奇のヘム蛋白質の機能を解析することにより、磁性細菌の磁鉄鉱のバイオミネラリゼーションの分子機構に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌における MamP 発現系の構築

ヘム c 結合型 MamP 及び変異型 MamP の発現は、蛋白質発現ベクター pET-29b (メルク) を用い、ヘム c 合成系遺伝子群 (ccm operon) を共発現させた大腸菌 C41 (DE3) を宿主として用いた。大腸菌から精製した MamP 蛋白質は、分光光度計によるスペクトル解析と抗 MamP ポリクローナル抗体の作製に用いた。

(2) *M. magneticum* AMB-1 における MamP 細胞内局在と発現量解析

AMB-1 における MamP の細胞内局在は、抗 MamP 抗体による免疫蛍光染色により調べた。MamP 発現量の変化は、AMB-1 の菌体を培養開始後、12、24、48、72、144 時間後に回収し、細胞抽出液を抗 MamP 抗体を用いたイムノブロットングにより調べた。

(3) *M. magneticum* AMB-1 における MamP 大量発現株の作製と表現型解析

野生株 AMB-1 に、磁性細菌用の蛋白質発現ベクター pBBR111 を用いて、tac プロモーター下で、MamP および MamP^{C224A}, C268A を定常的に大量発現させた。MamP の発現量は、野生株のおよそ 5 倍であった。MamP および MamP^{C224A}, C268A 大量発現株の細胞を透過型電子顕微鏡で観察し、細胞内で合成された磁鉄鉱結晶の数と大きさを測定した。

(4) 硝酸塩の消費活性の測定

野生株 AMB-1、mamP 遺伝子欠損株、レスキュー株の培養液中の硝酸塩濃度の変化を亜硝酸塩/硝酸塩アッセイキット (シグマアルドリッチ) を用いて定量した。

(5) Mms6 と MamA の蛋白質相互作用解析

MamA 蛋白質を固定したアフィニティークロマトグラフィカラムに、マグネトソームから抽出した蛋白質溶液をかけ、カラムに特異的に結合する蛋白質をスクリーニングした。その結果、磁鉄鉱合成に関わる蛋白質 Mms6 が MamA との相互作用蛋白質として同定された。両蛋白質間の相互作用は、免疫沈降実験、プ

ルダウンアッセイ、ゲル濾過法で更に確認した。

4. 研究成果

(1) 膜結合 *c* 型シトクロム MamP

磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 の磁鉄鉱の生合成への関与が期待されているヘム蛋白質 MamP を大腸菌で発現させ精製した。大腸菌のヘム *c* 合成蛋白質群をコードする *ccm* オペロンと *mamP* 遺伝子を共発現することで、大腸菌の膜面にヘム *c* 結合型の MamP 蛋白質の発現に成功した。大腸菌で発現させた MamP は典型的なシトクロム *c* のもつ分光学的特性を示した。MamP がもつ2つのヘム *c* 結合モチーフ (CXXCH) の両方に変異を導入した MamP^{C224A, C268A} は、ヘム結合能を失うことから、MamP は、2分子のヘム *c* をもつ膜結合型のシトクロム *c* であることが示唆された。*M. magneticum* AMB-1 において、MamP の細胞内局在を調べたところ、興味深いことに、マグネトソームではなく、細胞質膜全体に分布していることが分かった (図2)。また、MamP の発現時期を調べたところ、MamA や MamK など、他のマグネトソーム蛋白質は、定常的に発現するのに対し、MamP は対数増殖期特異的に発現しており、静止期にはほとんど発現していなかった。磁鉄鉱の生合成は細胞分裂の行われる対数増殖期に行われ、MamP の発現時期と一致していた。

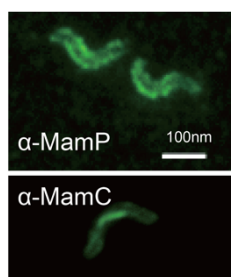


図2 免疫蛍光染色 (上) 抗 MamP 抗体による免疫蛍光染色。MamP は細胞質膜に局在する。(下) マグネトソーム局在蛋白質 MamC の免疫蛍光染色像。

(2) MamP 大量発現の磁鉄鉱合成への影響

AMB-1 株において、プラスミド上から *tac* プロモーター下で定常的に大量発現させ、磁鉄鉱合成への影響を調べた。MamP 大量発現株では、野生株と比較して対数増殖期に細胞内の磁鉄鉱結晶の数が1.6倍に増加することがわかった (図3AB、4A)。一方、静止期では、MamP 大量発現の影響は見られなかった。このことは、MamP は、磁鉄鉱合成時期である対数増殖期に機能を有することを示している。さらに、ヘム結合モチーフの変異体 MamP^{C224A, C268A} を大量発現させると、結晶数は野生株と同様であったが、小さな磁鉄鉱結晶 (平均16 nm) を合成した (図3C、4AC)。この表現型は、*mamP* 遺伝子欠損株と同様である。*mamP* 遺伝子欠損株は、直径約10 nm程度の小さな磁鉄鉱結晶を形成したが、結晶数は野生株と差がない (図3D、4BC)。以上の結果から、MamP は、対数増殖期に時期特異的に発現する膜結合型シトクロム *c* であり、磁鉄鉱結晶の成長

に必須の蛋白質あることが分かった。一方、磁鉄鉱結晶の数には影響しないことから、磁鉄鉱結晶の核形成には関わっていないことが示唆された。これらの研究成果について雑誌論文②の論文に発表した。

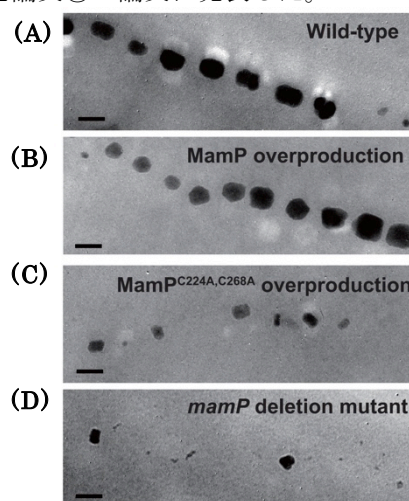


図3 MamP 大量発現の磁鉄鉱結晶合成への影響。(A) 野生株、(B) MamP 大量発現株、(C) MamP^{C224A, C268A} 大量発現株、(D) *mamP* 遺伝子欠損株の細胞内で合成された磁鉄鉱結晶。スケールバーは50 nm。

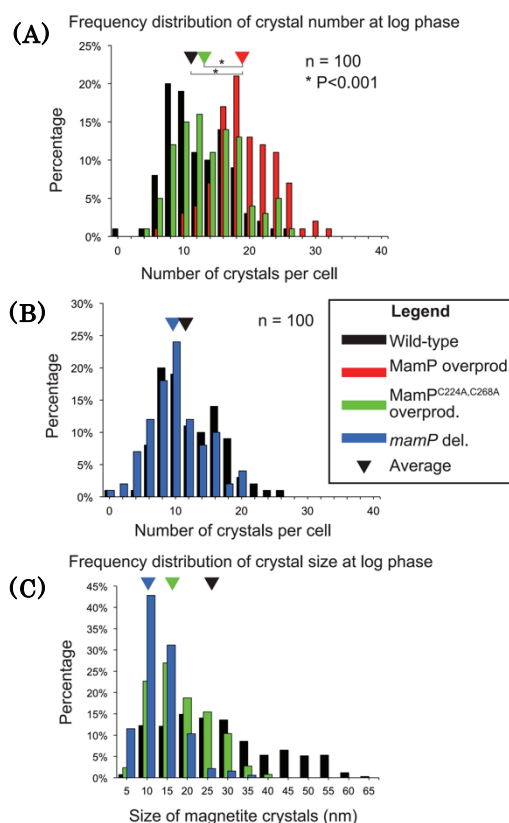


図4 (A) 対数増殖期の細胞内の磁鉄鉱結晶の数の分布、(B) 野生株と *mamP* 遺伝子欠損株の細胞内の磁鉄鉱結晶の数の分布、(C) 対数増殖期の細胞内の磁鉄鉱結晶のサイズ分布。

(3) MamP が介する電子伝達経路の解析

細菌の細胞内において、鉄イオンは Fe^{2+} の状態で存在しており、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の化合物である磁鉄鉱 ($\text{Fe}_3\text{O}_4[\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3]$) の合成には、鉄の部分酸化が必要である。最近、MamP が鉄酸化活性を示すことが報告された[4, 5]。それでは、MamP はどのような電子伝達経路を介して磁鉄鉱合成のための酸化還元反応を行っているのだろうか。

以前から、嫌気呼吸経路である脱窒が、マグネトソームでの磁鉄鉱結晶の最適な合成に必要であることが知られている[6, 7]。免疫染色とイムノブロット解析結果から、MamP はマグネトソームでなく細胞質膜に局在していた (図2)。即ち、MamP と脱窒の電子伝達系が同所的に局在しており、両者の関連が予測された。そこで、*M. magneticum* AMB-1 野生株、*mamP* 遺伝子欠損株、欠損株に MamP を発現させたレスキュー株において、脱窒経路の開始反応である硝酸塩還元反応の活性を比較した。その結果、野生株では、磁鉄鉱結晶形成が行われる対数増殖期中期において、培地中の硝酸塩濃度が著しく減少するのに対し、*mamP* 欠損株では、硝酸塩の消費速度が緩やかになった。一方、レスキュー株では硝酸塩消費が回復した。このことから MamP は、マグネトソームと内膜との間の電子運搬に関わるシトクロムであることが示唆され、磁鉄鉱合成のための鉄酸化により生じた電子を脱窒経路へと受け渡すという、磁鉄鉱形成の新しいモデルが提案できる。

(4) 磁鉄鉱合成に関わる蛋白質の蛋白質間相互作用

マグネトソームに局在する磁鉄鉱合成に関わる蛋白質間相互作用のスクリーニングをアフィニティークロマトグラフィーを用いて行ったところ、磁鉄鉱結晶形成に関わる膜蛋白質 Mms6 とマグネトソーム小胞の表面を覆う MamA 蛋白質が相互作用することを発見した。両蛋白質間の相互作用は、免疫沈降法、プルダウンアッセイ、ゲルろ過によって確認した。相互作用の生理的機能は不明であるが、マグネトソーム内における蛋白質相互作用を示した初めての報告として論文発表した (雑誌論文①)。

<引用文献>

- [1] Bioessays 28:157-68 (2006)
- [2] FEMS Microbiol Rev 36:232-255 (2012)
- [3] PNAS 107:5593-5598 (2010)
- [4] PNAS 112:3904-3909 (2015)
- [5] Nature 502:681-684 (2013)
- [6] Can J Microbiol 49:197-206 (2003)
- [7] Eur J Biochem 233:665-671 (1995)

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4件)

- ① Nguyen, H. V., Suzuki, E., Oestreicher, A., Minamide, H., Endoh, H., Fukumori, Y., Taoka, A. A protein-protein interaction in magnetosomes: TPR protein MamA interacts with an Mms6 protein. Biochemistry and Biophysics Reports, 2016, 7, 39-44 doi: 10.1016/j.bbrep.2016.05.010
- ② Taoka, A., Eguchi, Y., Mise, S., Oestreicher, Z., Uno, F., Fukumori Y. A magnetosome-associated cytochrome MamP is critical for magnetite crystal growth during the exponential growth phase. FEMS Microbiol. Lett., 査読有り, 2014, 358, 21-29, doi: 10.1111/1574-6968.12541
- ③ Taoka, A. †, Kondo, J. † (†共同筆頭著者), Oestreicher, Z., Fukumori Y. Characterization of uncultured giant rod-shaped magnetotactic Gammaproteobacteria from a fresh water pond in Kanazawa, Japan. Microbiology, 査読有り, 2014, 160, 2226-2234, doi:10.1099/mic.0.078717-0
- ④ 福森 義宏、田岡 東、磁性細菌オルガネラ「マグネトソーム」の構造機能関連の解明、「生物物理」誌、査読有り、54号1巻、2014、11-14、doi: 10.2142/biophys.54.011

[学会発表] (計17件)

- ① 田岡東、福森義宏、磁性細菌の遊泳運動—アクチン様細胞骨格の役割—、第89回日本細菌学会総会シンポジウム「細菌の運動」、2016年3月23日、大阪国際交流センター (大阪府大阪市)、招待講演
- ② 田岡東、清河文子、上杉知佳、福森義宏、磁性細菌ゲノムに保存されたアクチン様細胞骨格蛋白質 MamK によるマグネトソーム配置調節、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016年3月4日、東京工業大学大岡山キャンパス (東京都)
- ③ 田岡東、磁性細菌の磁気オルガネラ「マグネトソーム」の生細胞イメージング、第55回浜松特別セミナー (静岡大学テ

- ニューアトラック普及・定着事業主催)、2016年2月29日、静岡大学浜松キャンパス(静岡県浜松市)、招待講演
- ④ 田岡東、清河文子、福森義宏、細菌のオルガネラ「マグネトソーム」の細胞内配置調節に関わるアクチン様細胞骨格蛋白質、2016年生体運動合同班会議、2016年1月9日、キャンパスプラザ京都(京都府京都市)
- ⑤ 清河文子、田岡東、福森義宏、生細胞蛍光イメージングを用いた磁性細菌のアクチン様細胞骨格 MamK の機能解析、BMB2015(第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同大会)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑥ N. V. Hoang, A. Taoka, E. Suzuki, Y. Fukumori, Protein interactions in bacterial organelle magnetosomes: TPR protein MamA interacting with N-terminal region of Mms6、BMB2015(第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同大会)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑦ 江口友佳子、田岡東、福森義宏、磁性細菌のマグネタイトの生合成と細胞質膜局在c型シトクロムMamPの関連性の研究、BMB2015(第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同大会)、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑧ 田岡東、清河文子、上杉知佳、福森義宏、磁性細菌に特異的な細胞骨格蛋白質MamKによるマグネトソーム細胞内配置調節、2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会、2015年9月20日、富山県立大学(富山県射水市)
- ⑨ 田岡東、清河文子、上杉知佳、福森義宏、生細胞蛍光イメージングを用いた磁性細菌のアクチン様細胞骨格MamKの機能解析、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)
- ⑩ 江口友佳子、見世慎吾、田岡東、福森義宏、マグネタイトの生合成における磁性細菌特有のc型シトクロムMamPの役割、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)
- ⑪ 田岡東、近藤純也、Z. Oestreicher、福森義宏、淡水湖沼から単離された巨大磁性桿菌GRS-1の走磁性運動、2015年生体運動合同班会議、2015年1月9日、学習院大学目白キャンパス(東京都目黒区)
- ⑫ 田岡東、山下隼人、Z. Oestreicher、福森義宏、高速AFMを用いた細菌表層構造の生細胞イメージング、ナノプローブテクノロジー第167委員会第76回研究会、2014年10月23日、キャンパスプラザ京都(京都府京都市)、招待講演
- ⑬ N. V. Hoang, E. Suzuki, A. Taoka, Y. Fukumori Identifying specific partners of MamA, an unique TPR protein in the bacterial organelle 'magnetosome'、第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、国立京都国際会館(京都府京都市)
- ⑭ A. Taoka, C. Uesugi, Z. Oestreicher, K. Morii, A. Kiyokawa, Y. Fukumori Fluorescence live-cell imaging for visualizing the subcellular dynamics of magnetosomes, 4th International Meeting on Magnetotactic Bacteria, September 15-18, 2014, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas-CBPF (Rio de Janeiro, Brazil), 招待講演
- ⑮ 上杉知佳、田岡東、森井香、福森義宏、生細胞タイムラプスイメージングによる原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の細胞内動態観察、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月27-30日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
- ⑯ 近藤純也、田岡東、福森義宏、新規巨大磁性細菌の単離、第29回日本微生物生態学会大会、2013年11月23-25日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
- ⑰ 江口友佳子、見世慎吾、田岡東、福森義宏、原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」に局在する新奇ヘム蛋白質MamPの役割、第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ等
 金沢大学理工学域自然システム学類動物口
 微生物生理化学研究室ホームページ
<http://pronet.s.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田岡 東 (TAOKA, Azuma)

金沢大学・理工研究域自然システム学系・
助教

研究者番号：20401888