

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

Development of Magnetotactic Bacteria Producing Useful Substances, through the Reconstruction of Organelles Synthesizing Magnetic Particles

松永 是 (MATSUNAGA TADASHI)

東京農工大学・学長



研究の概要

磁性細菌のゲノム研究から、生体内での磁気微粒子合成機構の概要が明らかにされつつある。本研究では、本合成機構の詳細を明らかにし、細菌の磁気微粒子合成をゲノムレベルで制御するための基盤技術開発に取り組んでいる。得られた知見と技術に基づいて、工学的に有用な磁性材料の開発を目指している。

研究分野：工学、プロセス工学

科研費の分科・細目：生体機能・バイオプロセス

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

磁性細菌は、池や川などの底泥中に見られる細菌で、細胞内にナノサイズの磁気微粒子を合成する。その組成はマグネタイト (Fe_3O_4) であり、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。また、粒子の表面は脂質の二分子膜に覆われており、ここにタンパク質やDNAなどの分子を修飾することで、バイオ計測や物質回収に応用できる。これまでの研究から、磁気微粒子は細胞内小器官(マグネトソーム)の中で合成されることがわかっている。また、磁性細菌の比較ゲノム解析から、マグネトソームの合成に必須の遺伝子群が同定され、個々の遺伝子にコードされるタンパク質の機能も明らかにされつつある。磁気微粒子合成機構の詳細が解明されれば、この機構を利用した自在な磁性材料の合成が可能になると考えられるが、その合成機構をゲノムレベルで制御し、工学的に活用するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、マグネトソームの形成に関わるタンパク質の機能と局在を解析する。これに基づいて、ゲノムレベルでの遺伝子の再編を行い、マグネトソームの再構築を行う。さらにタンパク質の発現制御や機能改変により、細胞を用いて磁気微粒子を自在に合成する技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者らの分離した *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株 (図A) と *Desulfovibrio magneticus* RS-1 株 (図B) の2株の磁性細菌と、これらの遺伝子組換え株を利用する。これまでの研究において、両株の全ゲノムを明らかにし、磁気微粒子合

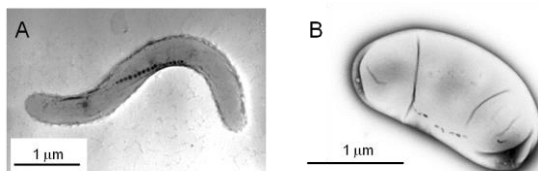


図. 磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 株 (A) と *D. magneticus* RS-1 株 (B) の電子顕微鏡写真

成オルガネラであるマグネトソームに局在するタンパク質とその遺伝子を同定した。本研究では、これらの遺伝子、タンパク質の情報に基づいて多様な遺伝子欠損株を作製し、磁気微粒子の形態や細胞内構造を解析する。また、マグネトソームの機能と構造の理解のため、マグネトソームタンパク質の細胞内での局在解析、マグネトソームタンパク質をコードする遺伝子の発現解析を行う。遺伝子への変異導入によるタンパク質の機能や構造の改変、タンパク質発現量やタイミングの調

節を行い、マグネトソームの機能を制御する。これにより、磁気微粒子のサイズ、形態、組成等の自在な制御を行う。

4. これまでの成果

M. magneticum AMB-1 株の相同性組み換えにより、マグネトソーム合成に関わる遺伝子の欠損株を作製し、各株の表現型を比較することで、タンパク質の機能を解析した。透過型電子顕微鏡を用いて各遺伝子欠損株が合成する結晶を観察したところ、複数の遺伝子欠損株において野生株が合成する粒径 40 nm の結晶よりサイズの小さな結晶が確認された。このことから、タンパク質が結晶の成長過程に関与することを明らかにした。また、これらのタンパク質には、等方的に結晶成長を促進するものと、異方的に結晶成長を促進するものが存在することを示した。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、切頂点八面体の形態をも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、人工的には合成の困難なダンベル状や伸長した多面体の磁気微粒子を合成することに成功した。

結晶成長に関与するタンパク質の機能領域を同定するため、遺伝子組換えによりアミノ酸配列の部分欠損株を作製し、C 末端部に近い酸性アミノ酸領域が形態制御機構に大きく寄与していることを明らかにした。酸性アミノ酸を塩基性アミノ酸に置換した場合においても、機能の回復は見られないこともわかった。また、N 末端側に存在する疎水性領域もタンパク質の機能に影響することを明らかにした。

テトラサイクリン誘導発現システムを利用し、細胞内のマグネトソーム合成を制御する系を構築した。結晶成長に関わる遺伝子の欠損株において、同遺伝子の発現誘導ベクターを導入することで、外部からの化学誘導剤の添加により、遺伝子発現が誘導されることを示し、その結果、磁気微粒子の結晶成長が促進されることを示した。また、培地中への誘導剤の添加量により、磁気微粒子のサイズが制御可能なことを示した。

蛍光タンパク質タグをマグネトソーム合成関連タンパク質に融合発現させることで、タンパク質の局在性の解析を行った。タンパク質の局在はその機能と関連しており、細菌の細胞ステージと発現量・局在との関係を明らかにした。

マグネトソーム表面への外来タンパク質発現の増大を目指し、AMB-1 株のホスト株の改変を行った。内在性プロテアーゼ遺伝子の欠損株では、プロテアーゼによる外来タンパク質の分解を抑制することでマグネトソ-

ム上への発現量を増大させることに成功した。また、マグネトソームタンパク質をコードする遺伝子欠損株では、マグネトソーム上の外来タンパク質の発現スペースを確保することにより、発現量を増大させることに成功した。

5. 今後の計画

細胞内でのマグネトソームの再構築とその改変による有用物質生産を目指し、マグネトソーム合成に関与する各遺伝子の機能と細胞内局在の解析を進める。細胞内でのマグネトソームの再構築を行い、複雑な構造や機能を持つオルガネラをゲノム再編により細胞内に再構築できることを示す。微生物を用いた無機材料創製の可能性を探索する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Atsushi Arakaki, Ayana Yamagishi, and *Tadashi Matsunaga, "Protein-Mediated Morphological Regulation of Magnetite Crystal in Magnetotactic Bacteria", *ICF Proc., In press*.

Yasuhiro Sugamata, Ryo Uchiyama, Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, and *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).

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).

Yuka Kanetsuki, Masayoshi Tanaka, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, and *Tomoko Yoshino, "Effective Expression of Human Proteins on Bacterial Magnetic Particles in an Anchor Gene Deletion Mutant of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **426**, 7-11 (2012).

ホームページ等

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