

平成23年度科学研究費補助金（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価〕

◆記入に当たっては、「平成23年度科学研究費補助金（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成23年 5月23日現在

研究代表者 氏名	松永 是	所属研究機関・ 部局・職	東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・教授
研究課題名	バイオマグネタイト形成の分子機構解明とその応用		
課題番号	13002005		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 松永 是（東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・教授） 研究分担者 田中 剛（東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・講師） 新垣 篤史（東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・助手）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成13年度	110,000 千円
平成14年度	117,000 千円
平成15年度	75,500 千円
平成16年度	74,600 千円
平成17年度	69,000 千円
総計	446,100 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)～(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

特別推進研究においては世界で初めて磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株の全ゲノム解析を行い、その全ゲノム情報に基づきトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行い、多数のバイオマグネタイト合成関連遺伝子を同定した。さらに特別推進研究終了後の科学研究費補助金基盤研究 (A)「ゲノム情報に基づくマグネタイト結晶形成コアタンパク質群のプロテオーム解析 (平成18-19年度) では、磁性細菌におけるバイオマグネタイト合成機構の中でも最もキーとなる結晶化プロセスに着目し、そのアプローチとして他の磁性細菌に見られない弾丸状のバイオマグネタイトを形成する RS-1 株のバイオマグネタイトのプロテオーム解析を行った。さらに結晶表面に強固に吸着するタンパク質群の分離、機能解析を行った。同時に、*M. magneticum* AMB-1 株において既に得られている複数のタンパク質群の機能解析を進め、RS-1 株との比較解析を行い、結晶形態の制御因子を同定した。また、プロテオーム解析と並行して RS-1 株の全ゲノム解析を行い、既知の磁性細菌ゲノムとの比較ゲノム解析から、磁性細菌に共通する遺伝子領域(ゲノミックアイランド)を同定した。この結果によって、バイオマグネタイト合成能が起源の異なる細菌間において水平伝播によって広がったことが示された。

さらに科学研究費補助金特定領域研究「応用ゲノム」「環境ゲノムからのバイオナノマグネタイト合成遺伝子群の探索」(平成18-19年度)では、環境中の多様な磁性細菌群のゲノムからバイオマグネタイト合成のキーとなるタンパク質をコードする遺伝子群を獲得するため、環境磁性細菌のゲノムライブラリーの構築を行った。少数の磁性細菌からもゲノム解析を可能とするため、Multiple displacement amplification (MDA)法を用いたゲノム増幅を検討し、増幅産物を用いたゲノムライブラリーの構築が有効であることを示した。環境から得られた磁性細菌より、平均インサート長約 10 kbp、合計約 5 Gbp からなるゲノムライブラリーを構築した。さらに、この中からマグネタイト結晶形成においてキーとなるタンパク質をコードする新規遺伝子を同定した。また、磁気分離法とフローサイトメーターを用いることで単一の磁性細菌を分離する手法を開発した。MDA を用いたゲノム増幅と組み合わせることで、単一細菌から成るゲノムの調製にも成功した。

上記の基礎研究をさらに発展させて、科学研究費補助金基盤研究 (A)「磁性細菌のバイオミネラリゼーション機構を利用した高機能ナノ粒子の創製」(平成20-22年度)では、磁性細菌のバイオマグネタイト合成のキープロセスを担う複数のタンパク質を利用することで、*in vitro*の反応系における無機ナノ構造体の制御法を確立し、新しい機能性ナノ粒子材料の創製を行った。タンパク質の自己集積化能を利用した磁性結晶の形状制御、結晶形成反応プロセス構築に向けたリポソーム内へのイオン導入システムを確立し、構築したリポソーム内での磁性結晶合成を行った。鉄イオン結合タンパク質の溶液中での分子集合状態の制御によって、酸化鉄結晶の表面構造が制御されることを示した。この際、鉄イオンとの結合によってタンパク質分子集合体の大きさとこれを形成するタンパク質の立体構造の変化を確認した。この構造変化に伴ってタンパク質と無機物との相互作用が変化することで、合成される磁性結晶の形態が制御されることを明らかにした。また、リポソームに磁性細菌の鉄イオントランスポーターを導入し、添加した ATP を駆動力としてリポソーム内への能動的な鉄イオンの取り込みを確認し、同リポソーム内の環境を制御することで酸化鉄結晶の形成にも成功した。さらに、バイオマグネタイト形成関連タンパク質として同定された Bar domain タンパク質の脂質膜との相互作用を利用してチューブ状のリポソームの形態制御法を確立した。このようなリポソームの区切られたナノ空間内での反応は、生体適合性の高い脂質二重膜被覆結晶合成のための基盤技術となると考えられ、現在、脂質膜で被覆された機能性ナノ粒子材料の形態制御技術の開発に向けて研究を進めている。

また、特別推進研究において確立されたバイオマグネタイト上へのタンパク質ディスプレイ技術をさらに発展させ、都市エリア産学官連携促進事業(発展型)平成19-22年度「バイオナノ磁性ビーズの分子設計技術の開発とがん治療への応用」において静岡がんセンターとの共同研究により、作製した機能性バイオマグネタイトのがん治療への応用に向けたさらなる高機能化を図った。

このように、特別推進研究で得られた成果を基に生み出されたバイオマグネタイトの工学的応用技術を現在までに大きく発展させている。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

特別推進研究終了後（2006年以降）の国際誌への論文発表36件（主要論文16件のみをリストする）

1. Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "Efficient and Stable Display of Functional Proteins on Bacterial Magnetic Particles Using Mms13 as a Novel Anchor Molecule." *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 465-471 (2006)
2. Takeyuki Suzuki, Yoshiko Okamura, Ronie J. Calugay, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Global Gene Expression Analysis of Iron-Inducible Genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1" *J. Bacteriol.*, 188, 2275-2279 (2006)
3. Masayoshi Tanaka, Yoshiko Okamura, Atsushi Arakaki, Tsuyoshi Tanaka, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Origin of Magnetosome Membrane: Proteomic Analysis of Magnetosome Membrane and Comparison with Cytoplasmic Membrane" *Proteomics*, 6, 5234-5247 (2006)
4. Tadashi Matsunaga, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Haruko Takeyama, Masaaki Takahashi, Harumi Ginya, Junko Asahina, Hideji Tajima: "Fully Automated Immunoassay for Detection of Prostate-Specific Antigen Using Nano-Magnetic Beads and Micro-Polystyrene Bead Composites, 'Beads on Beads'" *Anal. Chim. Acta*, 597, 331-339 (2007)
5. Yosuke Amemiya, Atsushi Arakaki, Sarah S. Staniland, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: "Controlled Formation of Magnetite Crystal by Partial Oxidation of Ferrous Hydroxide in the Presence of Recombinant Magnetotactic Bacterial Protein Mms6" *Biomaterials*, 28, 5381-5389 (2007)
6. Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Masaaki Takahashi, Harumi Ginya, Junko Asahina, Hideji Tajima, Tadashi Matsunaga: "Noncovalent Immobilization of Streptavidin on In Vitro- and In Vivo-Biotinylated Bacterial Magnetic Particles." *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5139-5145 (2008)
7. Tomoko Yoshino, Chihiro Kaji, Makoto Nakai, Fumiyo Saito, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Novel Method for Evaluation of Chemicals Based on Ligand-Dependent Recruitment of GFP Labeled Coactivator to Estrogen Receptor Displayed on Bacterial Magnetic Particles" *Anal. Chim. Acta*, 626, 71-77 (2008)
8. Masayuki Takahashi, Yasuto Akiyama, Junpei Ikezumi, Takeshi Nagata, Tomoko Yoshino, Akira Iizuka, Ken Yamaguchi, Tadashi Matsunaga: "Magnetic Separation of Melanoma-specific Cytotoxic T Lymphocytes from a Vaccinated Melanoma Patient's Blood Using MHC/Peptide Complex-conjugated Bacterial Magnetic Particles" *Bioconjugate Chem.*, 20, 304-309 (2009)
9. Tadashi Matsunaga, Michiko Nemoto, Atsushi Arakaki, Masayoshi Tanaka: "Proteomic Analysis of Irregular Bullet-Shaped Magnetosomes in the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio magneticus* RS-1" *Proteomics*, 9, 3341-3352 (2009)
10. Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "Novel Nanocomposites Consisting of in vivo-biotinylated Bacterial Magnetic Particles and Quantum Dots for Magnetic Separation and Fluorescent Labeling of Cancer Cells" *J. Mater. Chem.* 19, 6361-6366 (2009)
11. Hidekazu Nakazawa, Atsushi Arakaki, Sachiko Narita-Yamada, Isao Yashiro, Koji Jinno, Natsuko Aoki, Ai Tsuruyama, Yoshiko Okamura, Satoshi Tanikawa, Nobuyuki Fujita, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Whole Genome Sequence of *Desulfovibrio magneticus* Strain RS-1 Revealed Common Gene Clusters in Magnetotactic Bacteria" *Genome Res.* 19, 1801-1808 (2009)
12. Atsushi Arakaki, Mie Shibusawa, Masahito Hosokawa, and Tadashi Matsunaga: "Preparation of Genomic DNA from a Single Species of Uncultured Magnetotactic Bacterium by Multiple Displacement Amplification" *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1480-1485 (2010)
13. Masayuki Takahashi, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "Surface modification of bacterial magnetic nanoparticles using asparagines-serine polypeptide designed to control interactions with cell surface" *Biomaterials* 31, 4952-4957 (2010)
14. Masayoshi Tanaka, Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga: "Identification and Functional Characterization of Liposome Tubulation Protein from Magnetotactic Bacteria" *Mol. Microbiol.* 76, 480-488 (2010)
15. Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "In vivo Biotinylation of Bacterial Magnetic Particles by Truncated form of *Escherichia coli* Biotin Ligase and Biotin Acceptor Peptide" *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5785-5790 (2010)
16. Masayoshi Tanaka, Eri Mazuyama, Atsushi Arakaki and Tadashi Matsunaga: "Mms6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization *in vivo*" *J. Biol. Chem.* 286, 6386-6392 (2011)

招待講演（2006年以降）19件

1. Use of Nano-Scale Engineering Biomagnetite for Biosensing, 10th Fischer Symposium, Benediktbeuern, Germany (2006)
2. Bacterial magnetite as an element in nanotechnology, Gordon Research Conferences on Biomineralization, NH, USA (2008)
3. Controlled Mechanism of Iron Oxide Nano-Crystal Formation in Magnetotactic Bacteria, 14th International Conference on Inorganic Chemistry, Aichi, Japan (2009)

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

科学研究費補助金（基盤研究（A））平成18-19年度「ゲノム情報に基づくマグネタイト結晶形成コアタンパク質群のプロテオーム解析」 研究代表者：松永 是、直接費総額：38,100千円

科学研究費補助金（特定領域研究「応用ゲノム」）平成18-19年度「環境ゲノムからのバイオナノマグネタイト合成遺伝子群の探索」 研究代表者：松永 是、直接費総額：7,700千円

科学研究費補助金（基盤研究（A））平成20-22年度「磁性細菌のバイオミネラリゼーション機構を利用した高機能ナノ粒子の創製」 研究代表者：松永 是、直接費総額：38,000千円

都市エリア産学官連携促進事業（発展型）平成19-21年度「バイオナノ磁性ビーズの分子設計技術の開発とがん治療への応用」 研究代表者：松永 是、直接費総額：21,818千円

文部科学省 地域イノベーションクラスタープログラム・受託研究（財団法人しずおか産業創造機構）平成22年度「がん治療・早期診断を目指したバイオチップ技術の確立」 研究代表者：松永 是、直接費総額：27,273千円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

1) ゲノム、トランスクリプトーム、及びプロテオーム解析によるバイオマグネタイト合成関連遺伝子の同定

本研究において、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株を用いて世界で初めて磁性細菌の全ゲノム解析を行った (DNA Res. 2005)。解読された全ゲノム情報を基に、トランスポゾン変異体の解析を行い複数のバイオマグネタイト合成関連遺伝子を明らかにした。特別推進研究終了後は、全ゲノム情報を基に構築した DNA マイクロアレイを用いて、鉄イオン存在下、非存在下における遺伝子の発現動態を解析することで、高濃度の鉄イオン取り込み能を有する磁性細菌の鉄イオン代謝機構を明らかにした (J. Bacteriol. 2006)。さらに、全ゲノム情報を基に行ったバイオマグネタイト膜のプロテオーム解析においては、バイオマグネタイト上に存在する複数の形成関連タンパク質を同定すると共に、細胞膜タンパク質との比較解析からバイオマグネタイト膜が細胞質膜に由来することを明らかにした (Proteomics 2006)。このように磁性細菌の全ゲノム情報に基づいたオーム解析を通して、バイオマグネタイト形成における、小胞膜形成、鉄イオン取り込み及びマグネタイト結晶化に参与するタンパク質群を同定することに成功し、バイオマグネタイト合成機構の全容を明らかにした。

2) 近縁種間比較解析によるバイオマグネタイト合成関連遺伝子の水平伝播機構の解明

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株の解析に加え、1993年に単菌分離した弾丸状バイオマグネタイトを形成する磁性細菌 *Desulfovibrio magneticus* RS-1 株のゲノム解析及びプロテオーム解析を行った。比較ゲノム解析の結果、 α -Proteobacteriaの磁性細菌及びRS-1株のゲノム上に共通して存在する遺伝子領域を新たに二つ発見した (Genome Res. 2009)。さらに、プロテオーム解析により同定されたRS-1株特異的なバイオマグネタイト膜タンパク質が、水平伝播により獲得されたと考えられる磁性細菌共通の遺伝子領域にコードされていることを発見した (Proteomics 2009)。また、単菌分離されていない環境中の磁性細菌からバイオマグネタイト合成に関する遺伝子を同定することを目的とし、Multiple Displacement Amplification法を用いて環境中の磁性細菌からゲノム増幅を行い、ゲノムライブラリーを構築した (Appl. Environ. Microbiol. 2010)。その結果、結晶形成に参与するタンパク質をコードする遺伝子 *mms6* と相同性を持つ新規遺伝子が同定された。

3) タンパク質を用いたマグネタイトの形態制御技術

本研究では磁性細菌 AMB-1 株のバイオマグネタイトからマグネタイトに強固に吸着するタンパク質ファミリー (Mms5, Mms6, Mms7, Mms13) を発見し、その中でもMms6の鉄イオン結合能及びマグネタイトの結晶形態制御作用を示した (J. Biol. Chem. 2003)。研究期間終了後は、合成法を最適化することでMms6タンパク質を用いたマグネタイト結晶形態制御法を新たに開発することに成功した (Biomaterials 2007)。Mms6タンパク質の部分配列を有するペプチドを用いることで、その結晶形態制御機構を解明した。さらに、相同性組み換え法を用いて *in vivo* で *mms6* のマグネタイト結晶形態制御能を示すことに成功している (J. Biol. Chem. 2010)。

4) バイオマグネタイト上へのタンパク質ディスプレイ技術の発展

本研究ではバイオマグネタイトの工学的応用に向けて磁性細菌の大量培養法を確立した (Enzyme Microb Technol. 2001)。さらに磁性細菌の遺伝子組み換え技術の基盤を確立した (Appl. Environ. Microbiol. 2003)。研究期間終了後はさらにプロモーター、アンカータンパク質を最適化することにより、バイオマグネタイト上へ機能性タンパク質をより高効率に発現させることに成功した。特に、アンカータンパク質として、2003年に発見されたマグネタイト表面に強固に吸着しているタンパク質ファミリーの一つであるMms13を用いたことで発現効率が飛躍的に上昇することが示された (Appl. Environ. Microbiol. 2006)。また発現タンパク質の多様化によりバイオマグネタイトを用いた細胞医療分野や医療計測分野、またバイオテクノロジー分野への展開を図っている。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

1. バイオミネラリゼーション基礎研究への貢献

本研究ではバイオマグネタイトを、界面活性剤を用いて段階的に処理することで、マグネタイト表面に強固に吸着するタンパク質ファミリーを分離し、そこからマグネタイト結晶形成に関与する Mms6 タンパク質を同定することに成功した。生物による鉱物形成、バイオミネラリゼーションは主に骨や歯、貝殻を用いて数多く行われてきており、複数の形成関連タンパク質がバイオミネラル中から分離されてきているが、マグネタイト形成に関与するタンパク質の同定は本報告が世界で初めてであり、画期的な報告としてこれまでに多く引用されている（引用回数 91 回）。これまでバイオミネラリゼーションの研究は主に真核生物を用いて行われてきており、遺伝子組み換えが容易ではないことから、バイオミネラルから分離されたタンパク質の機能証明が困難であった。一方、磁性細菌は既に遺伝子組み換え技術が構築されていることから、*in vitro* 及び *in vivo* 両面からの機能解析が可能である。Mms6 タンパク質においても既に、その結晶形態制御作用は組み換えタンパク質を用いた *in vitro* でのマグネタイト結晶合成により示されていたが、近年、相同性組み換え法による *mms6* 遺伝子のノックアウトにより、Mms6 タンパク質が切頂八面体形のマグネタイト形成に関与していることを示すことに成功した。Mms6 タンパク質のさらなる詳細な作用機構解明を目指して現在も精力的に研究を進めている。

2. バイオマグネタイトの工学的応用

本研究では、磁性細菌の大量培養法の確立及び遺伝子組み換え技術の構築により、バイオマグネタイトの工学的応用に向けた基盤技術を確立した。さらに、Mms13 タンパク質をアンカータンパク質として用いることで、機能性タンパク質を高密度にディスプレイすることが可能となり、バイオマグネタイトの工学的応用の可能性をさらに広げることに成功した。上記の報告を行った論文は他の研究グループにより数多く引用され、バイオマグネタイト上へのタンパク質ディスプレイ法の基盤技術として用いられている。また、近年は当該技術をさらに発展させ、バイオマグネタイト上へディスプレイされたタンパク質の *in vivo* 標識法や、磁性細菌内で誘導可能なプロモーターの構築による毒性タンパク質の発現等が行われており、バイオマグネタイトを用いた工学的応用の今後のさらなる発展が期待される。

3. 原核生物を用いた膜形成機構の解明

これまで真核生物における細胞内小器官の膜形成機構については多くの研究が行われてきているが、その形成機構は非常に複雑であり未解明の部分が多く残されている。磁性細菌は細胞内小器官としてバイオマグネタイトを有し、さらにその全ゲノム情報が利用可能であり、遺伝子組み換え技術も構築されたことから、真核生物の細胞内小器官形成機構解明における理想的なモデル生物と言える。

本研究においては、GTPase 活性を有する Mms16 タンパク質を発見し、バイオマグネタイト膜形成への関連を示した。さらに、研究期間終了後は、細胞質膜及びバイオマグネタイト膜の比較プロテオーム解析から、バイオマグネタイト膜が細胞質膜の陥入により形成されることを実証した。また、近年バイオマグネタイト上から真核生物の膜形成に関与することが知られている BAR ドメインを有するタンパク質を新たに発見し、機能解析によりバイオマグネタイト膜形成への関与を示した。GTPase 及び BAR ドメインタンパク質は真核生物の膜形成に関与するタンパク質として既にその存在が知られているが、原核生物で発見されたのは本研究が初めてであり、今後、真核生物の膜形成機構解明に向けた研究のモデルとして磁性細菌が有用であることが示された。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Atsushi Arakaki, John Webb, Tadashi Matsunaga: "A Novel Protein Tightly Bound to Bacterial Magnetic Particles in <i>Magnetospirillum magneticum</i> Strain AMB-1." <i>J. Biol. Chem.</i> , 278, 8745-8750 (2003)	磁性細菌 AMB-1 株のバイオマグネタイト上に強固に吸着しているタンパク質がマグネタイトの形態に影響を与えることを示した。	91
2	Tadashi Matsunaga, Yoshiko Okamura, Yorikane Fukuda, Aris Tri Wahyudi, Yaeko Murase, Haruko Takeyama: "Complete Genome Sequence of the Facultative Anaerobic Magnetotactic Bacterium <i>Magnetospirillum</i> sp. strain AMB-1." <i>DNA Res.</i> , 12, 157-166 (2005)	世界で初めて磁性細菌の全ゲノム解析を行い、バイオマグネタイト形成に関与する複数の遺伝子を同定した。	63
3	Motoki Kuhara, Haruko Takeyama, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: "Magnetic Cell Separation Using Antibody Binding with Protein A Expressed on Bacterial Magnetic Particles." <i>Anal. Chem.</i> , 76, 6207-6213 (2004)	抗体結合タンパク質プロテイン A を発現させたバイオマグネタイトを用いて、選択的な細胞の分離技術を構築した。	63
4	Chen-Dong Yang, Haruko Takeyama, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: "Effects of Growth Medium Composition, Iron Sources and Atmospheric Oxygen Concentrations on Production of Luciferase-Bacterial Magnetic Particle Complex by a Recombinant <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1." <i>Enzyme Microb. Technol.</i> , 29, 13-19 (2001)	培養条件を最適化することで、磁性細菌 AMB-1 株の組み換え体の高密度培養及びバイオマグネタイトの生産性向上に成功した。	49
5	Brandon Yoza, Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga: "DNA Extraction Using Bacterial Magnetic Particles Modified with Hyperbranched Polyamidoamine Dendrimer." <i>J. Biotechnol.</i> , 101, 219-228 (2003)	ポリアミンデンドリマーで修飾したバイオマグネタイトを用いた DNA 抽出法を確立し、世代数の増加に伴い DNA 抽出効率が上昇することを示した。	48
6	Brandon Yoza, Mitsufumi Matsumoto, Tadashi Matsunaga: "DNA Extraction Using Modified Bacterial Magnetic Particles in the Presence of Amino Silane Compound." <i>J. Biotechnol.</i> , 94, 217-224 (2002)	アミノシラン化合物でコートしたバイオマグネタイトを用いた DNA 抽出法を確立した。	47
7	Yoshiko Okamura, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "A Magnetosome Specific GTPase from the Magnetic Bacterium <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1." <i>J. Biol. Chem.</i> , 276, 48183-48188 (2001)	バイオマグネタイト上で強発現している Mms16 タンパク質が GTPase 活性を有することを示し、阻害剤を用いた解析から GTPase がバイオマグネタイト形成に関与することを示した。	45
8	Toshifumi Sakaguchi, Atsushi Arakaki, Tadashi Matsunaga: "Desulfovibrio magnetis sp. nov., a Novel Sulfate-Reducing Bacterium That Produces Intracellular Single-Domain-Sized Magnetite Particles." <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 52, 215-221 (2002)	新規硫酸還元磁性細菌 <i>Desulfovibrio magnetis</i> RS-1 株の微生物学的分類及び命名を行った。	33
9	Tadashi Matsunaga, Fumiko Ueki, Kimimichi Obata, Hideji Tajima, Tsuyoshi Tanaka, Haruko Takeyama, Yasuhiro Goda, Shigeru Fujimoto: "Fully Automated Immunoassay System of Endocrine Disrupting Chemicals Using Monoclonal Antibodies Chemically Conjugated to Bacterial Magnetic Particles." <i>Anal Chim Acta</i> , 475, 75-83 (2003)	モノクローナル抗体を修飾したバイオマグネタイトを用いて、内分泌かく乱物質の全自動検出システムを構築した。	33
10	Tomoko Yoshino, Masayoshi Takahashi, Haruko Takeyama, Yoshiko Okamura, Fukuichi Kato, Tadashi Matsunaga: "Assembly of G Protein-Coupled Receptors onto Nanosized Bacterial Magnetic Particles Using Mms16 as an Anchor Molecule." <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 70, 2880-2885 (2004)	バイオマグネタイト特異的タンパク質 Mms16 をアンカー分子として用いることで、7 回膜貫通の G 蛋白質共役型受容体をバイオマグネタイト上に発現させることに成功した。	31

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "Efficient and Stable Display of Functional Proteins on Bacterial Magnetic Particles Using Mms13 as a Novel Anchor Molecule." <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 72, 465-471 (2006)	バイオマグネタイトに強固に吸着している膜タンパク質 Mms13 をアンカー分子として用いることで、バイオマグネタイト上にタンパク質を効率的かつ安定的にディスプレイすることに成功した。	40
2	Masayoshi Tanaka, Yoshiko Okamura, Atsushi Arakaki, Tsuyoshi Tanaka, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Origin of Magnetosome Membrane: Proteomic Analysis of Magnetosome Membrane and Comparison with Cytoplasmic Membrane" <i>Proteomics</i> , 6, 5234-5247 (2006)	初めてバイオマグネタイト上のタンパク質の網羅的解析を行い、さらに細胞膜タンパク質と比較することでバイオマグネタイト膜が細胞質膜由来であることを明らかにした。	32
3	Yorikane Fukuda, Yoshiko Okamura, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Dynamic Analysis of a Genomic Island in <i>Magnetospirillum</i> sp. Strain AMB-1 Reveals How Magnetosome Synthesis Developed." <i>FEBS Lett.</i> , 580, 801-812 (2006)	バイオマグネタイト形成に関与するゲノミックアイランドの存在を明らかにした。さらにゲノミックアイランドがゲノム上から欠失することでバイオマグネタイト合成能が失われることを示した。	31
4	Yosuke Amemiya, Atsushi Arakaki, Sarah S. Staniland, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: "Controlled Formation of Magnetite Crystal by Partial Oxidation of Ferrous Hydroxide in the Presence of Recombinant Magnetotactic Bacterial Protein Mms6" <i>Biomaterials</i> , 28, 5381-5389 (2007)	バイオマグネタイト上に強固に吸着するタンパク質 Mms6 を利用したバイオメテックな手法を用いて磁気微粒子の形態制御に成功した。	27
5	Takeyuki Suzuki, Yoshiko Okamura, Ronie J. Calugay, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Global Gene Expression Analysis of Iron-Inducible Genes in <i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1" <i>J. Bacteriol.</i> , 188, 2275-2279 (2006)	磁性細菌 AMB-1 株の全ゲノム配列を基に作成した DNA マイクロアレイを用いて、鉄イオン取り込みに関与する遺伝子を同定した。	19
6	Takahito Nakagawa, Reisque Hashimoto, Kohei Maruyama, Tsuyoshi Tanaka, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Capture and Release of DNA Using Aminosilane-Modified Bacterial Magnetic Particles for Automated Detection System of Single Nucleotide Polymorphisms" <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , 94, 862-868 (2006)	アミノシランでコートしたバイオマグネタイトを用いることで、全血からの DNA の回収及び一塩基変異多型の検出に成功した。	18
	Tomoko Yoshino, Hisashi Hirabe, Masayuki Takahashi, Motoki Kuhara, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga: "Magnetic Cell Separation Using Nano-Sized Bacterial Magnetic Particles with Reconstructed Magnetosome Membrane" <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , 101, 470-477 (2008)	脂質膜を再構築することで、細胞毒性の低い磁気細胞分離用のバイオマグネタイトの作製に成功した。	16
7	Tadashi Matsunaga, Masayuki Takahashi, Tomoko Yoshino, Motoki Kuhara, Haruko Takeyama: "Magnetic Separation of CD14+ Cells Using Antibody Binding with Protein A Expressed on Bacterial Magnetic Particles for Generating Dendritic Cells" <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 350, 1019-1025 (2006)	Mms13 をアンカー分子として抗体結合タンパク質プロテイン A を発現させたバイオマグネタイトを用いることで、高効率な磁気細胞分離システムを確立した。	15
9	Tadashi Matsunaga, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Haruko Takeyama, Masaaki Takahashi, Harumi Ginya, Junko Asahina, Hideji Tajima: "Fully Automated Immunoassay for Detection of Prostate-Specific Antigen Using Nano-Magnetic Beads and Micro-Polystyrene Bead Composites, 'Beads on Beads'" <i>Anal. Chim. Acta</i> , 597, 331-339 (2007)	ポリスチレンビーズ上にバイオマグネタイトを固定化した 'Beads on Beads' を用いて、前立腺特異抗原の全自動検出システムを構築した。	14
10	Tadashi Matsunaga, Kohei Maruyama, Haruko Takeyama, Takahiko Katoh: "High-Throughput SNP Detection Using Nano-Scale Engineered Biomagnetite." <i>Biosens. Bioelectron.</i> , 22, 2315-2321 (2007)	ストレプトアビジンを固定化したバイオマグネタイトを用いて、半自動化された高効率な一塩基変異多型検出システムを構築した。	13

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

1. バイオマグネタイト上への機能性タンパク質ディスプレイ技術

細胞医療分野への貢献

癌の治療等において注目されている細胞医療技術においては、特定細胞を高効率かつ損傷を与えることなく分離する技術の開発が求められている。本研究で構築された基盤技術を用いて、バイオマグネタイト上に目的細胞のみに結合する抗体を高効率にディスプレイし、磁気回収により細胞を回収する磁気細胞分離システムが確立され、細胞を用いた試験からその有用性が示されている。さらに、細胞の非特異吸着を低減する為のバイオマグネタイト上への NS ポリペプチドの導入や回収の際の細胞毒性を低下させるためのバイオマグネタイト膜の除去及び脂質膜の再構築を通して、確立した細胞分離技術のさらなる発展が図られている。上記の研究は、都市エリア産学官連携促進事業の下で実施された、静岡ガンセンターとの共同研究の結果であり、今後は確立したシステムを用いた医療現場での細胞分離への応用が見込まれている。

医療計測分野への貢献

抗体やオリゴヌクレオチドを表面に固定化することで、医療計測に応用可能な様々な機能性バイオマグネタイトを作製した。さらに、作製したバイオマグネタイトを用いたアッセイの全自動化技術の開発を行った。実際に共同研究先である病院から提供を受けた 800 サンプル以上の実サンプルを対象とした遺伝子の多型解析を行い、確立した全自動化システムが優れた精度を有していることが示されている。構築された全自動化遺伝子検出システムは、現在マルコム（株）において、実用化、販売されており臨床診断の現場で利用されている。

その他のバイオテクノロジー分野への貢献

当該技術を用いることでドラッグスクリーニングのターゲットとして多く用いられている 7 回膜貫通型タンパク質の G タンパク質共役型受容体のバイオマグネタイト上へのディスプレイに成功した。また、エストロゲン受容体を発現させたバイオマグネタイトと GFP 標識したコアクチベーターを用いた環境ホルモンの検出も行われている。作製されたこれらの機能性バイオマグネタイトは今後、創薬等の分野において活用されることが期待される。また、近年ピルビン酸リン酸ジキナーゼをディスプレイしたバイオマグネタイトを作製し、パイロシークエンス用の酵素固定化ビーズとして利用可能なことを示した。

2. タンパク質を用いたマグネタイト結晶形態制御技術

材料工学分野への貢献

現在、電磁石や変圧器の材料として広く工業的に用いられているフェライトは結晶相及び結晶サイズを制御する為、高温下での焼結や煩雑な粉碎プロセスを経て合成されている。しかし、これらの方法はコストや手間がかかる為、穏和な条件下での溶液合成法が種々試みられているが、いまだに低温でのフェライト合成法は確立されていない。本研究を通して、研究代表者らは磁性細菌から同定したタンパク質 Mms6 を利用したマグネタイト結晶の形態制御法を開発した。現在、分子レベルでの Mms6 の作用機構の解明を進めており、今後模倣分子を用いた穏和な条件下でのマグネタイト合成が可能となることで、現在工業的に生産されているフェライトの新規合成法の開発につながることを期待される。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助手やポストドク等の研究終了後の動向を記述してください。）

カッコ内は平成 23 年 5 月現在の所属機関と職名

宮下英明（京都大学大学院人間・環境学研究科、准教授）

研究期間中は助手として本研究に参画し、シデロフォアの精製・構造解析を分担した。平成 14 年に京都大学に異動後は、微細藻類の基礎と応用に関する研究に従事している。特に、クロロフィル *d* に関する研究では、Science 誌 2 報をはじめとするメジャー誌に多数の論文を発表している。その研究が評価され、平成 22 年度の基盤研究 (A) に採択されている。また、第 11 回マリンバイオテクノロジー学会大会（平成 20 年 5 月 24 日～25 日、京都大学）では実行委員長を務めるなど、当該分野において中心的に活躍している。

田中 剛（東京農工大学大学院工学研究院、准教授）

研究期間中は助手、講師として本研究に参画し、バイオマグネタイトを用いたバイオ分析技術の開発を分担した。ここで培った知見、技術に基づいて、マッチングファンド（平成 15～17 年度）、若手研究 (A)（平成 17 年度～19 年度）などの大型研究助成の獲得に成功し、Anal. Chem. 誌などに多くの論文発表を行った。さらに、平成 21 年度戦略的創造研究推進事業 CREST「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」の研究代表者として採択され、海洋微細藻類を利用したバイオディーゼル生産の研究に従事している。

岡村好子（広島大学大学院先端物質科学研究科、准教授）

研究期間中は大学院生、博士研究員として参画し、ゲノム解析、遺伝子発現解析、タンパク質の機能解析を分担した。平成 14 年 3 月に博士後期課程修了後、東京農工大学・博士研究員、日本学術振興会特別研究員、県立広島大学・助手、早稲田大学・講師などを経て、平成 23 年 4 月より現職となる。その間、特定領域研究「ライフサーベイヤ」において磁気ビーズを用いた 1 分子遺伝子増幅技術の開発、メタゲノムからのバイオプロセス酵素スクリーニングと応用に関する研究に従事し、多数の論文発表、特許出願を行った。

新垣篤史（東京農工大学大学院工学研究院、助教）

研究期間中は大学院生、助手として本研究に参画した。マグネタイトのバイオミネラリゼーションに関わるタンパク質 Mms6 を発見し、この成果に基づいて平成 15 年 3 月博士後期課程修了、博士(工学)を取得した。その後、早稲田大学・客員研究助手、日本学術振興会特別研究員を経て、2005 年 4 月より東京農工大学・助手として再び本研究に従事した。Mms6 タンパク質に関わる研究が認められ 2 件の受賞を受け、平成 18 年度 NEDO 産業技術研究助成事業、平成 22 年度新学術領域研究などに採択されている。

Brandon A. Yoza (University of Hawaii at Manoa, HNEI, Assistant Researcher)

平成 15 年 3 月に博士後期課程修了、博士(工学)を取得した。研究期間中は大学院生として本研究に携わり、デンドリマー磁気微粒子の構築とこれを用いた DNA 分離技術の開発に従事した。本技術は低濃度の核酸溶液の中からの回収に有効であり、これに基づいて計測機器関連企業との共同研究を実施した。現在は、University of Hawaii において、海洋バイオマスからのエネルギー生産技術の研究開発に従事している。

Aris Tri Wahyudi (Bogor Agricultural University, Department of Biology, Lecturer)

研究期間中は大学院生として本研究に携わり、トランスポゾンを用いた遺伝子変異株の作製と遺伝子の機能解析に従事した。平成 16 年 3 月に博士後期課程修了、博士(工学)の学位取得後は、母国の大学で教鞭を執りながら、根瘤菌の研究に従事している。

吉野知子（東京農工大学大学院工学研究院、准教授）

研究期間中は大学院生として本研究に参画し、磁気微粒子ディスプレイ技術の開発、応用技術の開発に従事した。平成 17 年 3 月に博士後期課程修了、早稲田大学・助手を経て、平成 18 年 10 月より特任助教授（特任准教授）、平成 23 年度 4 月より准教授に就任した。磁気微粒子ディスプレイ技術の実用化に向けて、磁性細菌内でのタンパク質の効率的な発現方法（特許第 4599597 号）などの複数の特許を取得し企業との共同研究を展開している。また、平成 21 年度 NEDO 産業技術研究助成事業にも採択されている。

丸山浩平（早稲田大学研究戦略センター、准教授）

研究期間中は大学院生として本研究に参画し、核酸の自動計測技術の開発に従事した。この成果により、平成 17 年 3 月博士後期課程修了、博士(工学)の学位を取得した。東京農工大学・産学連携研究員、早稲田大学・研究助

手、早稲田大学・講師を経て、平成 20 年 4 月より准教授となる。現在は、科学技術振興機構研究開発戦略センター・フェローを兼務し、研究プロジェクトの企画にも携わっている。

田中祐圭 (University of Leeds, School of Physics & Astronomy, Newton Fellow)

研究期間中は大学院生として本研究に参画し、磁性細菌のプロテオーム解析を担当した。その後の研究において、マグネトソーム膜の形成に関与する MamY タンパク質を同定し、平成 20 年 3 月博士後期課程を修了、博士(工学)の学位を取得した。さらに、MamY タンパク質を用いることでリポソームの形態制御が可能なことを示し、工学的応用研究を展開している。これらの成果が認められ、英ニュートン記念財団の特別研究員に採択され、2009 年 9 月よりリーズ大学にて新規バイオマテリアルの開発に従事している。

雨宮陽介 (東京農工大学大学院工学研究院、博士研究員)

研究期間中は大学院生として本研究に参画し、Mms6 タンパク質を利用したバイオミメティック磁気微粒子合成法の開発を担当した。この研究が評価され、平成 20 年 3 月博士後期課程修了、博士(工学)の学位を取得した。その後、産業技術総合研究所・博士研究員を経て、現職に至っている。現在は、本学中村史教授の指導の下、ナノニードルを利用した細胞解析技術の開発に従事している。