

1 細胞の環境磁性細菌からのバイオマグネタイト合成遺伝子群の獲得

●新垣 篤史 ◆松永 是

東京農工大学大学院共生科学技術研究院

<研究の目的と進め方>

磁性細菌と呼ばれる一群の細菌は、細胞内にナノサイズの磁性粒子(バイオマグネタイト)を合成する。バイオマグネタイトは、その表層を脂質とタンパク質から構成される薄膜に覆われていることから水溶液中での分散性に優れ、さらに磁氣的に単磁区構造を有することから磁気回収効率が非常に高い。このような特性を持つことから、バイオマグネタイトはバイオテクノロジー分野における自動計測、細胞分離や磁気イメージング技術などに利用可能な高性能磁性材料として注目を集めている。近年、我々のグループでは、分子系統学的に全く異なる2株の磁性細菌の全ゲノムを解析し、そのデータベースを構築した。その情報を利用して、遺伝子発現解析やバイオマグネタイト表層に存在するタンパク質の解析を行い、バイオマグネタイト生成機構の包括的理解に向けて研究を進めている。さらに、バイオマグネタイト合成において重要な役割を果たす複数のタンパク質およびその遺伝子を同定している。一方で、環境のサンプルから、人工的には合成の不可能な形態のバイオマグネタイトを合成する磁性細菌が観察されている。昨年度までの研究において、環境から多様な磁性細菌を回収し、MDA (multiple displacement amplification) によりゲノム増幅を行うことで、少数の細菌を含むサンプルからもゲノムライブラリーを構築し、結晶形成に関与すると考えられる遺伝子を含むバイオマグネタイト合成関連遺伝子を獲得した。しかしながら、複数の細菌種が混在する場合、得られた遺伝子の由来する細菌を同定することができず、バイオマグネタイト形態と遺伝子情報との関係を明らかにすることができなかつた。フローサイトメーターは、細胞を大きさによって分離し、さらに1細胞レベルで分離することが可能な装置として広く利用されている。本研究では、フローサイトメーターを用いて1細胞の環境磁性細菌を分取し、さらにMDAにより増幅したゲノムを用いて多様な磁性細菌からのバイオマグネタイト合成関連遺伝子を獲得する。特に、特に長形や弾丸状の結晶形成や形態制御に関わるタンパク質をコードする遺伝子群を探索する。さらに、得られた遺伝子情報に基づいて、タンパク質の機能性部位を模倣したペプチドを合成し、新規バイオナノマテリアルの創出に利用する。

<2008年度の研究の当初計画>

環境中の多様な磁性細菌からのゲノム情報の獲得を目的として、下記の研究項目の実施を計画した。

1) Race Track法による環境サンプルからの磁性細菌の回収とフローサイトメーターによる細胞の分離

昨年度までの研究において、環境サンプルから α -Proteobacteria に属する *Magnetospirillum* や *Magnetococcus* と考えられる磁性細菌が観察され、16S rDNA の分子系統解析から、その近縁種の配列が多数得られている。また、新規の磁性細菌の存在も、形態観察と16S rDNA の解析から示されている。特に、人工合成が困難な弾丸状のバイオマグネタイトを大量に合成し、難培養株とされる *Nitrospira* に属する *Magnetobacterium bavaricum* と呼ばれる桿状の細菌が確認されている。本課題では、特にこのような特徴的な難培養株をターゲットとして解析を行う。環境サンプルからの磁性

細菌の分離には、磁石を用いた磁気回収に基づいた手法 (Race Track 法) によって行う。フローサイトメーターによる細胞分離では、SYBR Green 染色した細胞の蛍光強度と、前方散乱光に基づいた細胞サイズを指標として分離を行う。

2) MDAを用いた1細胞からの遺伝子増幅と評価

バイオマグネタイト合成関連遺伝子のスクリーニングに要求される DNA 量を獲得するため、分取した1細胞の細菌から、MDAを用いたゲノム増幅を行う。また、フローサイトメーターで分取したサンプルの一部は、電子顕微鏡観察に使用し、目的の細菌が分離されたことを確認する。さらに、増幅された個々の細菌由来の DNA から16S rDNA 配列を決定し、細胞分離の確認と系統解析を行う。同サンプルは断片化後、ライブラリー構築に使用する。

3) バイオマグネタイト合成関連遺伝子群のスクリーニング

磁性細菌のこれまでの研究から、バイオマグネタイト合成に関与する主要な遺伝子群が集中する genomic island 様の遺伝子領域の存在が明らかにされている。この中の特定遺伝子をPCRによってスクリーニングする。また、得られた配列周辺には、バイオマグネタイト合成遺伝子群が多数存在することが予想される。磁性細菌に特異的な遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより、ゲノムライブラリーからスクリーニングし、末端シークエンスを行う。特に、結晶制御因子タンパク質をコードする遺伝子群をターゲットとして探索する。

<2008年度の成果>

1) フローサイトメーターによる磁性細菌の分離

はじめに、純水培養株である螺旋状の *M. magneticum* AMB-1 株と、桿状の *D. magneticus* RS-1 株について、フローサイトメーターによる細胞分離の検討を行った。AMB-1 株は1 μm 以下のゲートから分離され、一方、RS-1 株は約1 μm のゲート中に分離された。次に、球菌の観察された環境サンプルを用いて、同様にソーティングを行ったところ、電子顕微鏡で観察された直径約2 μm の細胞サイズを反映したプロファイルが得られた。この結果から、フローサイトメーターでは、球状の細菌はそのサイズに基づいて検出されるが、長形の細菌では細胞の幅を反映して検出されることが考えられた。また、細胞数の少ないサンプル (10³ cells/ml 以下) からも同手法によって細胞を分離できることが示された。分離された細胞は透過型電子顕微鏡によって細胞形態とバイオマグネタイトの形態観察を行った。

2) 1細胞の磁性細菌からのMDAによるゲノム増幅と評価

全ゲノム配列が明らかにされている *M. magneticum* AMB-1 株をモデルとして、少数細胞からのMDAによるゲノム増幅について検討を行った。フローサイトメーターを用いて、AMB-1 株を1~100細胞ずつ分取を行った。これら細胞サンプルについてMDAを行い、ゲノム増幅量の確認を行ったところ、全てサンプルにおいて約50 μg のDNAが得られていることが確認された。次に、得られたMDA産物をAMB-1ゲノム上に散在する25個の遺伝子をターゲットとしてPCRを行うことで、少数細胞から得られたMDA産物の評価を行った。その結果、1細胞由来のMDA産物については、25遺伝子中の約30-50%の遺伝子におい

て増幅が確認された。一方、100細胞を用いてMDA増幅を行ったサンプルからは、25個の全ての遺伝子の増幅が確認された。さらに、リアルタイムRT-PCRによって、反応液中に含まれる各遺伝子の分子数を算出したところ、平均 2.0×10^5 copies/reaction含まれていることが示された。リアルタイムRT-PCRに使用したDNA量は0.5 ngであり、1細胞のAMB-1のゲノム重量は5 fgであることから、理論的には 1.0×10^5 copies/reactionのゲノムが存在すると算出された。得られた知見と理論値がほぼ一致することから、100細胞をテンプレートとして使用することで反応が良好に行えていることが示された。一方、1細胞からのMDA増幅についても同様にリアルタイムRT-PCRによるゲノム増幅の評価を行ったところ、増幅に偏りがあることが確認され、増幅反応の効率化が必要であることが考えられた。同条件検討の結果に基づいて、以下の環境サンプルを使用した検討においては、100細胞の磁性細菌を使用することとした。

3) バイオマグネタイト合成関連遺伝子群のスクリーニング

目的遺伝子のスクリーニングを行うため、環境の磁性細菌由来のMDA産物の調製を行った。環境サンプルを観察すると、磁性細菌が優先種として確認される土壌サンプルと、非常に少ない割合で存在するサンプルとが存在する。本検討では、その典型的例として、球状の磁性細菌が高い割合で含まれるサンプル(約 10^6 cells/ml)と、少数の桿状の磁性細菌が含まれるサンプル(10^3 cells/ml以下)を使用した。

球状の細菌が確認されたサンプルの電子顕微鏡観察から、球状の磁性細菌は直径約 $2 \mu\text{m}$ で、長形のバイオマグネタイトを合成する細菌であることがわかった。また、土壌からゲノム抽出を行ったサンプルの16S rDNA解析から、球状の磁性細菌群は、近縁の2系統の細菌種から構成されることがわかった。また、磁性細菌は全細菌中のおよそ10%を占めることが確認された。次に、Race Track法による磁性細菌の磁気分離と、フローサイトメーターによる細胞の分離を連続的にを行い、土壌サンプルから磁性細菌を精製した。調製された100細胞をテンプレートとしてMDAを行い、16S rDNAによる分子系統解析を行ったところ、得られたシーケンスの全ては*Magnetococcus*の磁性細菌と同一性を示し、1菌種に由来することが確認された。Race Track法による磁気分離の過程での細菌の泳動速度の差異によって、1菌種が選択的に分離されたことが考えられた。このことは、現在実験的な検証を進めている。

一方、桿状の磁性細菌を含むサンプルについて、光学顕微鏡観察を行ったところ、全細菌に占める磁性細菌の割合は非常に少なく、電子顕微鏡による観察は困難であった。そこで、上記のサンプルと同様に、Race Trackおよびフローサイトメーターによって、細菌の濃縮・精製を行い、細胞数を求めた。調製された100細胞の磁性細菌を含むサンプルについてMDAを行い、16S rDNA解析を行ったところ、未培養の弾丸状のバイオマグネタイトを合成する磁性細菌*M. bavaricum*と高い同一性を示した。また、得られたシーケンスは全て同一種の細菌に由来した。現在、PCRおよび末端シーケンスによって、調製されたゲノムの評価と遺伝子のスクリーニングを進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

バイオマグネタイト合成機構の解明については、当研究グループの他、米、独の研究グループが主体となり、国際的な研究競争を繰り広げている。近年、特にバイオマグネタイト表面に局在するタンパク質の網羅的解析から、新規タンパク質が相次いで発見されている(Scheffel et al., Nature, 2006; Komeili et al., PNAS, 2004)。このような中、我々はバイオマグネタイト合成において必要とされる膜小胞体の形成に関与するタンパク質(Okamura et al., J Biol Chem, 2001, Tanaka et al., Proteomics, 2006)や、その

合成に必要な鉄イオン輸送タンパク質(Nakamura et al., J Biol Chem, 1995)、さらに鉄イオンを蓄積し、結晶形成に関与するタンパク質(Arakaki et al., J Biol Chem, 2003; Amemiya et al., Biomaterials, 2006)などを発見した。さらに、磁性細菌*M. 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達成し(Matsunaga et al., DNA Res, 2005)、これとは種属の異なる*Desulfovibrio magneticus* RS-1株についても全ゲノム解析を終了している。また、この2種の磁性細菌間における比較ゲノム解析から、バイオマグネタイト合成に関わる遺伝子クラスターを同定している。さらに、*M. magneticum* AMB-1株の全ORFを載せたDNAマイクロアレイを作製し、遺伝子発現解析を行い、バイオマグネタイト合成に関わる鉄イオン取り込み機構を明らかにした(Suzuki, Matsunaga et al., J Bacteriol, 2006)。これらの研究の結果、バイオマグネタイト合成の概要が明らかにされつつあるが、個々のプロセスの詳細を理解するには、さらなる検討が必要である。

一方で、現在までに分離された磁性細菌の純粋培養株はわずか20株に満たず、さらに我々の分離した*D. magneticus* RS-1を除く全てが、 α -Proteobacteriaに属する細菌である(Sakaguchi et al., Nature, 1993)。しかしながら、環境サンプルからは、非常に多様な形態のバイオマグネタイトを形成する磁性細菌が観察されており、未分離ながら*Nitrospira*に属し、大量の弾丸状のバイオマグネタイトを形成する磁性細菌も発見されている(Spring and Schleifer, System Appl Microbiol, 1995)。このような磁性細菌の遺伝子情報を獲得し、純粋培養株との比較解析を行うことで、バイオマグネタイト合成機構の解析とその起源の探索が可能になると考えられる。また、このような特徴的な形態のバイオマグネタイトを持つ環境の細菌の遺伝子を解析し、これらタンパク質を利用することで、新規磁性ナノ材料の構築が可能になると期待できる。本研究では環境からのバイオマグネタイト合成関連遺伝子群の探索を目的とするが、世界的に見てもこのような試みは行われていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1~100細胞の少数細胞からもMDAによるDNA増幅が可能であり、遺伝子のスクリーニング等に利用できることが示された。しかしながら、10細胞以下の磁性細菌から得られたMDA産物では、増幅における偏りと反応効率の減少が認められた。この結果は、細胞からのDNA抽出操作とMDA反応効率に起因していると考えられた。抽出操作を含むプロトコルの改変、反応液の小容量化などの検討により、反応の効率化の検討を進めている。

<今後の課題>

本研究によって、環境サンプルから多様な磁性細菌群を磁氣的に回収し、MDAによりゲノム増幅を行うことで、少数の細菌を含むサンプルからも遺伝子のスクリーニングが可能であることが示された。今後は、長形や弾丸状のバイオマグネタイトの合成に関わるタンパク質をコードする遺伝子群の獲得を目的として、PCR、末端シーケンス解析などによって、環境サンプルからの遺伝子スクリーニングを進める予定である。得られた遺伝子情報に基づいて、タンパク質の機能性部位を模倣したペプチドを合成し、新規バイオナノ材料の創出に利用する。

<成果公表リスト>

論文発表:

0801252029 Matsunaga, T, Suzuki, T, Tanaka, M, Arakaki, A. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. Trends Biotechnol., 25: 182-188, 2007