

## 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

●松永 是 ◆新垣 篤史

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（バイオナノマグネタイト）を合成する。バイオナノマグネタイトは、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、さらに磁的に単磁区構造を有することから磁気回収効率が高い。このような特性を持つことから、バイオナノ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。ゲノム情報を利用して、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析や磁性細菌タンパク質のプロテオーム解析を行い、バイオナノマグネタイト生成機構の包括的理解へ向けて研究を進めている。さらに、バイオナノ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及びその遺伝子を同定している。一方で、環境中には様々な形態のバイオナノマグネタイトを合成する磁性細菌の存在が確認されており、これらの中には、人工的には合成の困難な形態や構造を有する結晶が多数観察されている。したがって、未培養の磁性細菌のゲノムからバイオナノマグネタイト形成に関与する遺伝子群を獲得することで、バイオナノマグネタイト合成機構の解明や、新しい磁性材料の創出技術の開発に繋がることが期待される。本研究では、環境中に存在する多様な磁性細菌群のゲノムから、バイオナノ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目的とした。さらに、得られた遺伝子の工学的利用として、新規磁性ナノ材料の創製についても検討を行った。

### <2007年度の研究の当初計画>

環境サンプルから分離した磁性細菌のゲノムからメタゲノムライブラリーを構築し、その中から新規のバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群を同定することを目的として、下記の研究計画を作成した。

1) メタゲノムライブラリーの作製とバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群のスクリーニング

昨年度の環境磁性細菌のサンプリングにおいて、分子系統学的に新規の磁性細菌群の存在が確認されたことから、特にこれらをターゲットとしたゲノムライブラリーの構築と評価を行う。これまでの検討において有効であることが示された Multiple displacement amplification (MDA) によってゲノム増幅を行い、数十 kb の DNA をクローニングする。バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子を中心にスクリーニングを進める。

2) バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群を用いた機能性磁性粒子の作製

環境中のサンプルから得られたバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子の工学的有用性について検討を行う。具体的には、ゲノム情報を利用し結晶制御因子タンパク質群の相同性領域からペプチドを設計し、化学合成法によるマグネタイト粒子の調製を行う。粒子の形態やサイズからタンパク質の機能解析を行う。また、得られたタンパク質及びそのペプチドを用いることで、イムノ

アッセイ等への利用が可能な機能性タンパク質を固定化した磁性ナノ粒子を調製する。

3) バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子を用いた環境磁性細菌の分子系統解析

得られた環境磁性細菌メタゲノムライブラリーにおけるバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子の分子系統解析を行う。多様な環境磁性細菌からのバイオナノマグネタイト生成機構関連遺伝子クラスターを比較解析することにより、生成機構に必要な遺伝子の同定につながると考えられる。また、その系統樹解析により、磁性細菌の進化におけるルーツを探る。

### <2007年度の成果>

本年度の成果を当初計画に沿って下記に述べる。

1) メタゲノムライブラリーの作製とバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群のスクリーニング

磁性細菌の少ないサンプルからもゲノム情報を獲得するため、全ゲノム情報の明らかにされている磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株を用いて、MDA によるゲノム増幅の検討を行った。フローサイトメトリーによって細胞数を正確に分取したサンプルについて MDA を行った。その結果、50  $\mu$ l の反応液を用いることで、1 細胞の磁性細菌から約 40  $\mu$ g の DNA を得ることができた。また、ゲノム情報に基づいて、バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群の増幅のためのプライマーのデザインを行った。得られたプライマーの評価を行うため、*M. magneticum* AMB-1 ゲノムから得られた MDA 産物に対する増幅について、qRT-PCR を用いた各遺伝子のコピー数から定量的に評価を行った。その結果、ゲノムワイドに分布する 8 個の遺伝子 (*mms6*, *mms7*, *mms13*, *mms24*, *mamJ*, *argK*, *mpsA*, *magA*) に対してそれぞれの増幅が確認され、コピー数の相対比から各遺伝子が均一に MDA によって増幅されていることがわかった。そこで、*Magnetospirillum* 属や、*Magnetococcus* 属の磁性細菌に類似した形態を持つ細菌が観察された河川源流域で採取したサンプルを使用して MDA を行い、増幅産物の shearing による断片化処理後、BAC ベクターにクローニングを行った。得られたライブラリーの平均インサートサイズは、約 7.5 kb であった。次に、バイオナノマグネタイト合成に関与する遺伝子群の探索を行った。特に、結晶形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子 *mms6* のスクリーニングから、AMB-1 株の同遺伝子と同一性を持つ新規遺伝子が同定された。その解析から、*Mms6* の N 末端領域に相当する遺伝子配列において塩基置換が確認された。一方で、C 末端領域には塩基置換は見られず、本領域の高い保存性が確認された。同様に、*mms7* に同一性を持つ遺伝子も得られている。

2) バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群を用いた機能性磁性粒子の作製

環境から得られた遺伝子の応用研究として、*mms6* 遺伝子のコードするアミノ酸配列を模倣した複数のペプチドを調製し、磁性ナノ粒子合成に利用した。鉄イオンを含む溶液にペプチドを添加し、部分酸化法に基づいて合成を行った。その結果、球状の 16 面体構造 (cubo-octahedron 型) を持つと考えられるマグネタイト結晶の合成が確認された。この結晶形態は *Magnetospirillum* 属が形成するものと一致しており、本遺伝子の由来が *Magnetospirillum*

属であること予想された。また、得られた粒子の粒度分布幅が、ペプチド無添加の場合及びコントロールとして作製した塩基性のペプチドを添加することで得られた粒子に対して狭くなっており、粒子サイズの均一化が示された。さらに、振動試料型磁力計を用いた磁気測定から、保磁力の向上が確認された。

また、これらタンパク質をアンカー分子として利用することで、磁性ナノ粒子上への機能性分子の固定化について検討を行った。C末端にFITC標識した上記ペプチドを調製し、予め用意した磁性ナノ粒子と混合した。数回洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察を行ったところ、これらペプチドの磁性粒子への吸着が確認された。コントロールとして使用したBSAや配列の異なるペプチドでは蛍光が確認されないことから、観察された吸着は、配列特異的なものであることが示された。ピオチン標識したペプチドを用いた際にも同様に吸着が確認され、機能性タンパク質の固定化に応用できることが示された。

### 3) バイオナノマグネタイト合成関連遺伝子を用いた環境磁性細菌の分子系統解析

得られたメタゲノム中に含まれるバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群及び16S rDNAを用いて、分子系統解析を行った。16S rDNAに基づく分子系統解析からは、顕微鏡観察結果と一致する *Magnetospirillum* 属、及び *Magnetococcus* 属の細菌が同定された他、新規と考えられる磁性細菌の存在が確認された。また、*Magnetococcus* 属は大きく4つのクラスターに分類されることが明らかになった。また、2)において分離された *mms6* 遺伝子を用いた解析では、本サンプルから得られた遺伝子群は、*M. magnetotacticum* MS-1株と *M. magneticum* AMB-1株の持つ *mms6* 遺伝子の中間に位置し、これらとクラスターを形成することから、*Magnetospirillum* 属由来の遺伝子であることが考えられた。したがって、*mms6* 遺伝子は *Magnetospirillum* 属において保存性が高く、これら細菌種に特徴的な遺伝子であることが考えられた。

### <国内外での成果の位置づけ>

バイオナノ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、特にバイオナノ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 (Schübbe et al., J Bacteriol 185, 5779-5790, 2003; Komeili et al., PNAS 101, 3839-3844, 2004)。このような中、我々はバイオナノ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 (Matsunaga et al., Biochem Biophys Res Commun, 2000; Okamura, Matsunaga et al., J Biol Chem, 2001) や、その合成に必須な鉄イオン輸送タンパク質 (Nakamura, Matsunaga 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, Matsunaga et al., J Biol Chem, 2003) 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株についてもほぼ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、バイオナノ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、トランスクリプトーム解析を行い、バイオナノ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、バイオナノ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、 $\alpha$ -Proteobacteriaに属する細菌である。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ナノ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ナノ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、バイオナノ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。さらに、近年、マグネタイト結晶形成に関与するタンパク質群が同定されたが、特徴的な形態のバイオナノマグネタイトを持つ細菌の遺伝子を単離し、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ナノ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>

概ね当初の計画通り研究を進めることができたが、得られた遺伝子に当初予想していたほどの多様性は認められなかった。既存のデータベース上におけるバイオナノマグネタイト合成関連遺伝子群の情報量が少ないことが一因であり、下記の新しいアプローチも含めたゲノムライブラリーの充実と個々の遺伝子の機能解析の必要性が考えられた。

### <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気的に回収し、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の構築が可能であることが示された。さらに、ライブラリーからバイオナノマグネタイト合成のキーとなる結晶核形成に関与するタンパク質の遺伝子を獲得し、MDAを利用したスクリーニング法の有効性を示した。しかしながら、本手法では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、バイオナノマグネタイトの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った。一方で、MDAの条件検討を行う中で、フローサイトメーターで分離した1細胞の磁性細菌からMDAによるゲノム増幅が可能であることを示した。このような1細胞からのアプローチによって、未だ情報の獲得されていない磁性細菌からのゲノムライブラリーの構築が可能であると考えた。今後は、特に長形や弾丸状のバイオナノマグネタイトの合成に関わる結晶核形成タンパク質をコードする遺伝子群の獲得を目的として、1細胞の磁性細菌からのゲノムライブラリー構築を行う。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。

### <成果公表リスト>

論文発表:

1. 060832204  
Yoshino, T. and Matsunaga, T.: 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. 060832133  
Suzuki, T., Okamura, Y., Calugay, R.J., Takeyama, H. and Matsunaga, T.: Global gene expression analysis of iron-inducible genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. J. Bacteriol., 188, 2275-2279(2006)
  3. 0801252029  
Matsunaga, T., Suzuki, T., Tanaka, M., Arakaki, A.: Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional magnetic particles for nano-biotechnology. Trend Biotechnol., 25, 182-188(2007)
- URL: <http://www.tuat.ac.jp/~matunaga/>