

令和元年5月29日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07661

研究課題名(和文) 原核細胞の細胞骨格による磁気感知オルガネラ配置の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of prokaryotic cytoskeleton for positioning of bacterial magnetic organelle

研究代表者

田岡 東 (Taoka, Azuma)

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：20401888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：磁性細菌は、マグネトソームと呼ばれる磁気オルガネラを用いて地磁気を感知する。本研究では、微小な細菌内での生細胞イメージングにより、MamK細胞骨格の生理的役割を解析した。その結果、MamK細胞骨格はマグネトソームを直鎖状に固定し、物理的な拡散を防ぐことでマグネトソームを磁気センサーとして機能させていることが明らかになった。また、MamKの重合特性を解析し、MamK繊維には真核生物のアクチンと同様に極性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細菌に多種類の細胞骨格蛋白質が見出されたが、その機能が明らかになっているものは少ない。MamKは、原核細胞オルガネラと相互作用する細胞骨格としてその役割が注目されていた。本研究では、蛍光イメージングにより生きた磁性細菌内のマグネトソーム動態を解析することで、MamK細胞骨格の具体的な機能を明らかにした。ナノサイズの細胞内構造物のイメージング法は、他の細菌細胞内構造物の機能や動態解析への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Magnetotactic bacterium orients and swims along the geomagnetic field using magnetic organelle, termed magnetosome, which is positioned in a chain-like configuration in the cells. In this study, we revealed the physiological role of MamK cytoskeleton by using live-cell imaging techniques. The results showed that the MamK cytoskeleton tethers magnetosomes in a static chain to prevent diffusion or aggregation of magnetosomes by a physical disturbance such as simple diffusion. Furthermore, we characterized polymerization properties of the MamK cytoskeleton and showed that MamK filament has polarity similar to eukaryotic actin.

研究分野：分子微生物学

キーワード：細胞骨格 磁気感知 細菌 生細胞イメージング 高速原子間力顕微鏡 アクチン オルガネラ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多くの生物が磁気を感じることができることが知られている^{文献1}が、磁気感知の分子機構は明らかにされていない。磁性細菌は、磁鉄鉱結晶（磁石）・蛋白質・リン脂質膜で構成される「マグネトソーム」とよばれる細胞内構造物を形成し、直鎖状に配置する（図1）。その結果、地磁気の方に細胞の向きを固定し、地磁気に沿って遊泳する（走磁性）。地磁気は鉛直方向に傾いているため、磁性細菌は鉛直方向に遊泳方向を固定し、生育に適した微好気環境を効率よく見出すことができる^{文献2}。

磁気センサーであるマグネトソームは、真核細胞のオルガネラ的特性を有する。オルガネラとは「膜で仕切られ、特化した形態と機能をもつ細胞内構造物」であり、真核細胞の特徴と考えられてきた。マグネトソームは、リン脂質膜小胞により細胞質から区分され、棒磁石のような特化した形態と磁気センサーとしての機能をもつ。細胞分裂時には娘細胞に均等分配され受け継がれる。以上のように、真核細胞のオルガネラと比較しても遜色ない組織化された構造と機能をもつ。

研究代表者らは、マグネトソームが3つ微細構造（マグネトソーム膜小胞、粒子間物質、マトリクス）で構成され、それぞれ特異的な蛋白質が局在することを明らかにした。これらマグネトソーム局在蛋白質（約30種類）は、磁性細菌に特有で機能未知の蛋白質群であり、マグネトソームの形成と機能を担っている。興味深いことに、マグネトソーム局在蛋白質にはアクチン様の細胞骨格蛋白質 MamK が含まれている。細胞骨格は、真核細胞のオルガネラでは、その動態の調節を行うことがよく知られているが、原核細胞のオルガネラであるマグネトソームではどのような機能を果たしているのだろうか。研究代表者らは、MamK が *in vitro* で繊維状に重合し、実際に細胞骨格として機能し得る蛋白質であることを報告した^{文献3}。一方、クライオ電子顕微鏡によりマグネトソームに MamK 細胞骨格が結合していることが示された^{文献4、5}。現在、この MamK 細胞骨格がマグネトソームの細胞内配置に中心的役割を果たすと考えられている。しかしながら、これまでの知見は、透過型電子顕微鏡観察を中心とした固定された細胞での観察結果から推察された仮説であり、実際に生きたマイクロメートルサイズの細胞内で、MamK 細胞骨格の機能を検証した研究は行われていない。また、MamK 細胞骨格がどのような仕組みでマグネトソームを配置し、磁気センサーとして機能させるのかについても不明である。

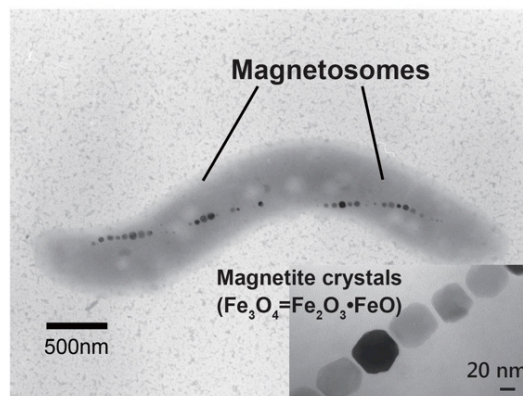


図1 磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の透過型電子顕微鏡写真。細胞内に直鎖状に並ぶ粒子がマグネトソーム。

2. 研究の目的

本研究では、磁性細菌に保存されるアクチン様蛋白質である MamK によって構成される細胞骨格のマグネトソームにおける機能を生細胞イメージングにより明らかにする。また、MamK 細胞骨格によるマグネトソームの配置機構を解析する。従来、オルガネラや細胞骨格は、真核細胞の特徴とされていたが、ナノメートルの分解能を持つ可視化技術の進歩に伴い、原核細胞にもオルガネラや細胞骨格が存在することが明らかとなった。しかし、その具体的な機能や仕組みは不明である。本研究により原核細胞オルガネラにおける細胞骨格の機能が明らかになる。

3. 研究の方法

(1) マグネトソームの生細胞イメージング

本研究では、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1（以下 AMB-1 と記載する）細胞内のマグネトソームを細胞周期を通してタイムラプス観察し、その細胞内動態を観察した。具体的には、マグネトソーム小胞に特異的に局在する膜蛋白質 MamC と緑色蛍光蛋白質（GFP）の融合蛋白質を、プラスミドから発現させることでマグネトソームを蛍光標識した。高感度の EMCCD カメラを装備した全反射蛍光顕微鏡を用いた斜光照明観察法（HILO）により、蛍光標識したマグネトソームの細胞内動態を動画撮影した。AMB-1 野生株、*mamK* 遺伝子欠損株、および ATP 分解酵素活性をもたない変異型 MamK を発現させた AMB-1 細胞のマグネトソームをそれぞれ生細胞イメージングで観察し、その表現型を比較検討した。

(2) 単量体 MamK 蛋白質調製

MamK の特性を生化学的に解析するためには、単量体の MamK 蛋白質の精製が必須である。MamK の精製のため、MamK を大腸菌で発現させると、MamK は大腸菌細胞内で繊維状に重合した。そこで、*in vitro* で MamK の脱重合条件を検討したところ、アルカリ性緩衝液中で MamK が脱重合することが分かった。この脱重合条件を用いて、単量体 MamK の精製方法を確立した。具体的には、MamK 蛋白質を発現させた大腸菌から得た無細胞抽出液を塩析、MamK 画分のアルカリ処理による脱重合、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを経ることで MamK の単量体の精製標品を得た。

(3) MamK 細胞骨格の重合特性の解析

MamK 細胞骨格の重合特性の解析は、ペレットティングアッセイや光散乱法といった生化学的手法に加えて、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）^{文献6}による分子イメージングを用いた。高速 AFM は、溶液中での生体分子の動態をナノメートルの空間分解能と、サブ秒の時間分解能で可視化することができる。(2)の方法で精製した単量体 MamK に ATP を添加し、重合する MamK 繊維の様子を高速 AFM で観察し、その重合特性を解析した。

4. 研究成果

(1) 生細胞イメージングによる MamK 細胞骨格の機能解析

生細胞イメージングにより、野生株 AMB-1 のマグネトソームの細胞内動態を観察したところ、マグネトソームは細胞中央に直鎖状に固定されており、まったく移動しなかった。そこで、24 時間の長時間タイムラプス観察を行ったところ、野生株では、細胞伸長や細胞分裂が起きても、マグネトソームは直鎖状の配置に固定された状態で安定に保持されていた。細胞分裂が起こる際には、マグネトソームが娘細胞へ均等に受け渡される様子が観察できた。*mamK* 欠損株でも長時間タイムラプス観察を行ったところ、マグネトソームは細胞内をランダムに移動して分散するか、大きな蛍光輝点に凝集し、細胞内の偏った位置に存在していた。*mamK* 欠損株に MamK 蛋白質をプラスミドから発現させたところ、マグネトソームの静的な直鎖状配置が回復した。以上の結果から、MamK 細胞骨格はマグネトソームを細胞周期を通じて細胞中央に直鎖状に固定する働きをしていることが明らかになった。一方、ATP 分解酵素活性を持たない変異型 MamK 蛋白質(MamK^{E143A} および MamK^{D161A})をプラスミド上から *mamK* 欠損株に発現させたところ、マグネトソームは部分的に直鎖状に配置されるが、一部のマグネトソームは細胞内を分散または凝集し、マグネトソームの直鎖状配置は完全には回復しなかった。このことから、MamK の ATPase 活性がマグネトソームの配置に必要であることが示された。

(2) 細胞骨格によるマグネトソーム配置の役割

生細胞イメージングの結果を解析し、*mamK* 欠損株細胞内のマグネトソームの拡散定数を求めた。その結果、細胞内のマグネトソームの拡散定数は、 $0.1\sim 0.02\ \mu\text{m}^2/\text{min}$ の間で分布していることが分かった。細胞内の分子は、単純拡散によって細胞内を移動する。細胞内を拡散する分子とその分子の大きさの関係式に基づいて、マグネトソームが単純拡散する場合の拡散定数を求めると、大きさ約 50 nm の 1 個のマグネトソーム粒子は $0.4\ \mu\text{m}^2/\text{min}$ 、10~30 個の粒子から構成されるマグネトソーム鎖は、 $0.03\sim 0.01\ \mu\text{m}^2/\text{min}$ と計算された。この値は、*mamK* 欠損株細胞内のマグネトソームの観察値とよく一致した。このことは、*mamK* 欠損株においてマグネトソームは、単純拡散によって、細胞内をランダムに移動していることを示している。つまり、MamK 細胞骨格は、マグネトソームを直鎖状に繋ぎとめることで、単純拡散による分散を防いでいる。この結果から、MamK 細胞骨格は、マグネトソームを細胞中央に直鎖状につなぎとめ、拡散によるマグネトソームの分散を防ぎ、安定に固定された磁気センサーとして機能させていることが明らかになった。微小な細菌細胞内のナノサイズの構造は、拡散の影響を強く受ける。細胞骨格による固定は、磁気センサーとしての機能に重要と考えられた。また、細胞中央へのマグネトソームの安定的な配置は、細胞分裂の際に娘細胞にマグネトソームを均等に受け渡す役割も果たしていた。研究成果は、mBio 誌で論文発表した（主な発表論文等の項の雑誌論文④）。また、国内学会誌にも本研究の内容を紹介した（雑誌論文③）。

mamK 遺伝子は、これまでゲノム配列が解析された全ての磁性細菌で保存されている。そこで MamK 細胞骨格の機能が、異なる種の磁性細菌で保存されているかを確認した。具体的には、AMB-1 の *mamK* 欠損株に、アルファ、ガンマ及びデルタプロテオバクテリアの分類される 5 種の形態的、生理的に異なる磁性細菌の MamK 蛋白質を発現させ、マグネトソームを固定することができるかを検証した。その結果、すべての磁性細菌の MamK 蛋白質がマグネトソームを直鎖状に固定できた。このことから MamK の機能が磁性細菌で保存されていることが示された（論文発表準備中）。

(3) 高速原子間力顕微鏡による MamK 重合特性の解析

(2) の生細胞イメージングの結果から、MamK の ATP 分解酵素活性は、マグネトソームの安定な直鎖状配置に必須であることが示された。一般的にアクチン様蛋白質の ATP 分解酵素活性は、重合・脱重合を介した細胞骨格繊維の動態の調整に関わることが知られている。しかし、重合時の MamK 繊維の分子動態を調べた報告はなく、MamK 繊維がどのような特性を持った細胞骨格なのかは明らかにされていない。そこで、我々は高速 AFM を用いて、MamK 繊維重合の観察を行った。

はじめに、観察に用いる単量体 MamK を精製した。大腸菌の細胞内で発現させた MamK 蛋白質を、3 (2) の方法で一旦、脱重合させ、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを経ることで MamK の精製標品を得た。この方法で精製した単量体 MamK が、重合能を持つことをペレットティングアッセイにより確認した。また、精製した単量体 MamK の ATP 分解酵素活性を調べたところ、既報の数値と一致したことから、ネイティブな蛋白質が得られた

ことを確認した。高速 AFM を用いて、マイカ基板表面での MamK の重合過程を観察した。単量体 MamK は、ATP 依存的に重合を開始し、二重らせん構造の繊維を形成した。伸長時の繊維には重合の速い端(+端)と遅い端(-端)があり、MamK 繊維の重合には極性があることが示された。また、マイカ基板上で、+端での重合と-端での脱重合に駆動される MamK 繊維のトレッドミル運動を直接観察することに成功した。

本研究課題では、MamK 細胞骨格の生理的役割が明らかになった。すなわち、MamK 細胞骨格は磁気オルガネラであるマグネトソームを直鎖状に固定し、細胞内への物理的な拡散を防ぐことでマグネトソームを磁気センサーとし機能させている。今後は、*in vitro* の生化学実験や高速 AFM による分子イメージングを組み合わせ、MamK 細胞骨格によるマグネトソーム配置の詳細な分子機構を解明したい。また、本研究で開発したマグネトソームの生細胞イメージング法を用いて、マグネトソームの形成過程や磁気感知のメカニズムへと迫りたい。

<引用文献>

- [1] Bioessays 28:157-168 (2006). [4] Science 311:242-245 (2006).
[2] Nature Reviews Microbiology 14:507-519 (2016). [5] Nature 440:110-114 (2006).
[3] Journal of Bacteriology 189: 8737-8740 (2007). [6] Biophys Rev 2: 285-292 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Eguchi, Y., Fukumori, Y., Taoka, A., “Measuring magnetosomal pH of the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 using pH-sensitive fluorescent proteins.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(7), 1243-1251, DOI: 10.1080/09168451.2018.1451739 (査読有)
- ② 田岡 東, 福森 義宏「細菌の磁気感応運動のためのオルガネラ「マグネトソーム」」*生物工学*, 2018, 96(5), 248-252, (査読有)
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9605/9605_tokushu_3.pdf
- ③ 田岡 東, 福森 義宏「細菌のアクチン様細胞骨格による磁気オルガネラの配置とその役割」*生物物理*, 2018, 58(2), 91-93, DOI: 10.2142/biophys.58.091 (査読有)
- ④ Taoka A., Kiyokawa, A., Uesugi, C., Kikuchi Y., Oestreicher Z., Morii K., Eguchi Y., Fukumori, Y. “Tethered magnets are the key to magnetotaxis: direct observations of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 show that MamK distributes magnetosome organelles equally to daughter cells.” 2017, *mBio*, 8:e00679-17. DOI: 10.1128/mBio.00679-17 (査読有)

〔学会発表〕(計23件)

- ① Taoka, A., Eguchi, Y., Kikuchi, Y., Fukumori, Y. “Measuring magnetosomal pH in living magnetotactic bacterial cell”, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年 (招待講演)
- ② Ichinaka, Y., Kikuchi, Y., Taoka, A., Fukumori, Y., Imaging of living bacterial cell surface structures using high-speed atomic force microscopy, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年
- ③ Kikuchi, Y. Oestreicher, Z., Taoka, A., Fukumori, Y., “Characterization of MamK polymerization using high-speed atomic force microscopy”, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年
- ④ Omura, M., Taoka, A., Fukumori, Y., “Subcellular localization of MamQ in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1”, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年
- ⑤ Takaoka, Y., Taoka, A., Fukumori, Y., Live-cell imaging of flagellar rotation during magnetotactic motility, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年
- ⑥ Yamazaki, I., Taoka, A., Fukumori, Y., “Functional analyses of MamJ which is cytoskeleton associating protein for magnetosome positioning”, The 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2018 meeting), 2018 年
- ⑦ 高岡 祐太, 田岡 東, 福森 義宏「磁性細菌の走磁性運動におけるべん毛回転運動の生細胞イメージング」, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018 年
- ⑧ 田岡 東, 菊池 洋輔, 福森 義宏「高速原子間力顕微鏡を用いた磁性細菌の細胞骨格タンパク質 MamK の重合特性解析」, 第 91 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2018 年
- ⑨ 江口 友佳子, 田岡 東, 福森 義宏「pH 感受性蛍光蛋白質を用いた原核細胞およびオルガネラ内の pH 蛍光イメージング解析」, 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年
- ⑩ 山崎 いづみ, 菊池 洋輔, 田岡 東, 福森 義宏「原核細胞オルガネラの細胞内配置に関わる細胞骨格および新奇細胞骨格結合タンパク質の機能解析」, 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年
- ⑪ 田岡 東, 清河 文子, 菊池 洋輔, 福森 義宏 “Actin-like MamK cytoskeleton tethers bacterial magnetosome organelles in a static chain”, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年

- ⑫ 田岡 東「磁性細菌の磁気感应運動のための細胞内磁気センサー「マグネトソーム」と MamK 細胞骨格」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ「環境変化とそれに応答する細胞内変化の再発見」, 2017 年 (招待講演)
- ⑬ 田岡 東「磁石を作るオルガネラ: 磁性細菌の磁気コンパス」環境微生物系学会合同大会 2017 シンポジウム「バクテリアのオルガネラ?!: 特殊な構造体がもたらす細菌のユニークな生存戦略」, 2017 年 (招待講演)
- ⑭ 田岡 東, 福森 義宏「磁石を操る」第 7 回日本微生物学連盟フォーラム「微生物変わり者たちの素顔」, 2017 年 (招待講演)
- ⑮ 山崎 いづみ, 田岡 東, 福森 義宏「磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の細胞骨格結合蛋白質 MamJ の精製」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) , 2017 年
- ⑯ 江口 友佳子, 田岡 東, 福森 義宏「磁性細菌の生細胞内 pH の蛍光イメージング」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) , 2017 年
- ⑰ 高岡 祐太, 川村 想, 田岡 東, 福森 義宏「磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の極べん毛回転運動の可視化」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017, 2017 年
- ⑱ 稲川 麻織奈, 菊池 洋輔, 田岡 東, 福森 義宏「全反射蛍光顕微鏡を用いたアクチン様蛋白質 MamK の重合特性解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017, 2017 年
- ⑲ 田岡 東「磁性細菌の走磁性運動と磁気オルガネラ「マグネトソーム」」第 36 回エアロ・アクアバイオメカニズム学会, 2017 年, (招待講演)
- ⑳ 田岡 東「磁性細菌の走磁性運動とそれを支える細胞骨格」"Motility of magnetotactic bacteria and cytoskeletal element for magnetosomes positioning", 第 6 回分子モーター討論会, 2016 年 (招待講演)
- ㉑ Taoka, A., Kiyokawa, A., Uesugi, C., Oestreicher, Z., Y. Fukumori Y., "The actin-like cytoskeletal protein MamK and its ATPase activity play a role in the positioning of magnetosomes" Magnetotactic Bacteria 5th International Meeting (Marseille, France), 2016 年 (招待講演)
- ㉒ 清河 文子, 田岡 東, 福森 義宏「アクチン様細胞骨格蛋白質 MamK とその ATPase 活性のマグネトソーム細胞内配置における役割」, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年
- ㉓ 菊池 洋輔, 稲川 麻織奈, 田岡 東, 福森 義宏「アクチン様タンパク質 MamK 繊維のダイナミクス観察」第 89 回日本生化学会大会, 2016 年

[図書] (計 1 件)

- ① Taoka, A. and Fukumori, Y. "Structure and function of aligned magnetic crystals in magnetotactic bacteria." *Biological Magnetic Materials and Applications*, 2018, Chapter 1, pp 3-22. Springer

[その他]

ホームページ等

金沢大学生体分子生理学研究室ホームページ

<http://pronet.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。