

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 16日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780063

研究課題名（和文） 原核細胞の磁気オルガネラの生細胞イメージング形成・機能メカニズムの解明—

研究課題名（英文） Live cell imaging of prokaryotic magnetic organelle to analyze mechanisms of organelle formation and function

研究代表者

田岡 東 (TAOKA AZUMA)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：20401888

研究成果の概要（和文）：本研究では、磁性細菌がもつナノサイズの原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」を構成する蛋白質を蛍光蛋白質で標識することで、生細胞内でマグネトソームを可視化し、その細胞内動態を解析した。蛋白質発現ベクターを作成し、マグネトソーム局在蛋白質と蛍光蛋白質の融合蛋白質を発現させ、マグネトソームの生細胞イメージングを行った。その結果、マグネトソームが細胞分裂後に娘細胞へ伝搬される様子が観察された。

研究成果の概要（英文）：Magnetotactic bacteria possess nano-sized prokaryotic magnetic organelles, magnetosomes. We developed live cell imaging technique by using fluorescence proteins to analyze cellular dynamics of the magnetosomes. By fusions of fluorescence proteins with magnetosomal proteins, we labeled magnetosome membrane and magnetosomal cytoskeleton in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. We successfully observed segregation of the magnetosomes to daughter cells during cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：微生物学、生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：原核細胞オルガネラ、生細胞イメージング、磁気微粒子、バイオミネラルリゼーション、細菌、微生物

1. 研究開始当初の背景

原核細胞は、原核細胞オルガネラと呼ばれ

る細胞内構造物を形成し、細菌に特徴的な反応（CO₂固定やアンモニア酸化、バイオミネラルリゼーションなど）の場として機能させて

いる。しかし、原核細胞オルガネラの細胞内動態や機能発現のメカニズムはほとんど未知である。本研究では、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 がもつ原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」を構成する蛋白質を蛍光蛋白質で標識することで、生きた細胞内でマグネトソームを可視化し、その動態解析を目指した。研究代表者は、これまでに磁性細菌のマグネトソーム局在蛋白質について研究を行った。マグネトソームには磁性細菌に特有の蛋白質群が局在している。これらの蛋白質の具体的な機能は不明であるが、マグネトソームの形成や構造の維持、磁気センサーとしての機能を担っていると考えられている。我々は、電子顕微鏡を用いてマグネトソームの構造を調べ、マグネトソームが複数の微細構造（膜小胞、マトリクス、粒子間物質）から構成される複雑な構造体であることを発見した (J. Bacteriol. 188: 3805-3812, 2006)。さらに、これらの微細構造に特異的な蛋白質が局在することを明らかにした。具体的には、MamC がマグネトソーム小胞に、MamA がマトリクスにそれぞれ局在していた。また、アクチン様蛋白質 MamK が、細胞内でマグネトソームと結合した細胞骨格繊維を形成していることを報告した (Bacteriol. 189: 8737-8740, 2007)。

マグネトソームの大きさはおよそ 50 nm であり光学顕微鏡では細胞内のマグネトソームを直接観察することができない。そのため、電子顕微鏡は微細なマグネトソームの研究において強力なツールである。しかしながら、電子顕微鏡内（真空、電子線中）は、マグネトソームが形成・機能している細胞内環境から大きなギャップあり、生きた細胞内でのマグネトソームの動態や形成過程は観察されていないかった。

2. 研究の目的

現在、様々な蛍光蛋白質を用いて、生きた細胞内の蛋白質や細胞小器官の動態観察が盛んに行われている。そこで、本研究では、原

核細胞オルガネラであるマグネトソームの細胞内動態やその機能を明らかにするために、マグネトソーム微細構造の可視化技術の開発を目的とした。これまでの研究により、マグネトソーム微細構造に特異的な蛋白質が局在することが明らかになった。これらのマグネトソーム微細構造の構成蛋白質を生細胞イメージング技術により可視化することで、生きた磁性細菌細胞内でのマグネトソームの動態を観察すること、さらにはその形成・機能メカニズムの解析を目的とした。

3. 研究の方法

磁性細菌細胞内で、蛍光蛋白質及び Halotag 蛋白質で標識したマグネトソーム局在蛋白質を発現させるため、広宿主域プラスミドベクターを用いて磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 で使用可能な蛋白質発現ベクターを作成した。作成したプラスミドベクターを用いて、マグネトソーム小胞局在蛋白質 MamC 及びアクチン様細胞骨格蛋白質 MamK と GFP、mCherry 及び Halotag の融合蛋白質の発現系を構築した。蛍光蛋白質で標識した MamC 及び MamK を発現させた細胞を、蛍光顕微鏡下で長時間タイムラプス観察することで、細胞内のマグネトソーム小胞および細胞骨格の細胞内動態を調べた。また、別のアプローチとして、高速原子間力顕微鏡を用いてマグネトソームの可視化と生細胞における蛋白質動態の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究で作成した蛋白質発現ベクターを用いて、複数の蛍光蛋白質の発現系を構築し、*M. magneticum* AMB-1 で利用可能な蛍光蛋白質を調べた。その結果、GFP、mCherry、及び Halotag 蛋白質の発現を確認し、これらの蛍光蛋白質が本細菌において標識蛋白質として利用可能であることが分かった。これらの標識蛋白質を用いてマグネトソーム局在蛋白質 MamC、及び MamK の標識し、蛍光蛋白質を用いたマグネトソーム小胞及び MamK 細胞骨格の標

識に成功した。

(2) 蛍光蛋白質を発現させた磁性細菌を、ポリリジンコートした灌流培養用スライドに固定し、培養液中で長時間にわたり蛍光顕微鏡観察した。その結果、24時間以上にわたって蛍光シグナルを検出でき、マグネトソーム局在のタイムラプス観察ができた。MamCの細胞内局在を調べたところ、マグネトソームが細胞分裂後に娘細胞へ伝搬される様子が観察された。また、MamK細胞骨格の局在は、細胞周期を通じて変化しなかった。

(3) マグネトソームは、細胞膜が貫入し形成される構造体である。そこで、細胞表面からマグネトソームの観察が可能かを確かめるため、高速原子間力顕微鏡を用いて、生きた磁性細菌の細胞表面を観察した。磁気ビーズによるラベルなどを試みたが、細胞表面にマグネトソームに関連する構造は確認できなかった。一方で、細胞表面がポーリン分子より構成される網目状構造によって覆われていること、またその分子動態を明らかにした。本技術は、生細菌の表層構造の動態観察への応用が期待でき、その成果を論文発表した。

(4) 本研究で開発した蛋白質発現ベクターを用いて、マグネトソームの細胞骨格を構成するMamK蛋白質を*mamK*遺伝子欠損株に発現させ、その表現型を調べた。その結果、*mamK*欠損株は、相補株より走磁性が弱いこと、対数増殖期の細胞中の磁鉄鉱結晶数が少ないことが分かった。また、生細胞イメージングの結果、MamK細胞骨格は細胞周期を通じて細胞極間を結ぶ直線状に分布していた。これらの結果から、MamK細胞骨格が、細胞分裂時のマグネトソーム分配に関わっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Sakaguchi, S., Taoka, A., and Fukumori Y. Analysis of magnetotactic behavior

by swimming assay. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有り, in press (2013). doi:10.1271/bbb.120880

- ② Yamashita, H[†], Taoka, A[†], Uchihashi, T., Asano, T., Ando, T., and Fukumori, Y. (†共同筆頭著者) Single-Molecule Imaging on Living Bacterial Cell Surface by High-Speed AFM. *J. Mol. Biol.*, 査読有り, 422: 300-309 (2012). doi:10.1016/j.jmb.2012.05.018
- ③ Yamamoto, D[†], Taoka, A[†], Uchihashi, T., Sasaki, H., Watanabe, H., Ando, T., and Fukumori, Y. (†共同筆頭著者) Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有り, 107: 9382-9387 (2010). doi: 10.1073/pnas.1001870107

[学会発表] (計19件)

- ① 田岡 東、福森 義宏, 生きた細菌細胞表層のナノオーダー構造解析, 第86回日本細菌学会総会, 2013年3月19日, 幕張メッセ (千葉県)
- ② Azuma Taoka, Shoutaro Sakaguchi, and Yoshihiro Fukumori, Functional Analysis of Actin-Like Cytoskeletal Protein MamK Associated with Prokaryotic Organelle Magnetosomes, The 23rd CDB Meeting : Building multicellular systems form cellular cross-talk, 2013年1月22日, RIKEN center for developmental biology (兵庫県)
- ③ 江口 友佳子、見世 慎吾、田岡 東、福森 義宏, 生物磁気微粒子の生合成に関わるヘム蛋白質MamPの機能解析, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ④ 田岡 東、山下 隼人、内橋 貴之、安藤 敏夫、福森 義宏, 高速AFMによる生きた原核細胞表面における分子動態イメージング, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日

, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)

- ⑤ Azuma Taoka, Hayato Yamashita, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Yoshihiro Fukumori, Molecular imaging in living magnetotactic bacterial cell surface by high-speed atomic force microscopy, The 2012 International Meeting on Magnetotactic Bacteria (MTB 2012), 2012年6月13日, カリフォルニア大学バークレー校 (アメリカ バークレー市)
- ⑥ 森井 香, 田岡 東, 福森 義宏, 原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の生細胞イメージング, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学池袋キャンパス (東京都)
- ⑦ 坂口 祥太郎, 田岡 東, 福森 義宏, 新しい走磁性測定法によるマグネトソーム局在蛋白質の機能解析, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 国立京都国際会議場 (京都府)
- ⑧ Yoshihiro Fukumori, Daisuke Yamamoto, Azuma Taoka, Takayuki Uchihashi, Hiroki Watanabe, Toshio Ando, First visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy, 第63回日本細胞生物学会年会, 2011年6月27日, 北海道大学札幌キャンパス (北海道)
- ⑨ Azuma Taoka, Daisuke Yamamoto, Takayuki Uchihashi, Hideaki Sasaki, Hiroki Watanabe, Toshio Ando, and Yoshihiro Fukumori, Structural analysis of nano-sized prokaryotic organelle 'magnetosome' using atomic force microscopy, 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2010), 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑩ Azuma Taoka, Daisuke Yamamoto, Takayuki Uchihashi, Hideaki Sasaki, Hiroki Watanabe, Toshio Ando, and Yoshihiro

Fukumori, New approach for visualization of the ultrastructures of magnetosome using atomic force microscopy. International Symposium on Magnetotactic Bacteria and Biomineralization (MTB2010), 2010年9月3日, Institute of Geology and Geophysics Chinese Academy of Sciences, (中国)

[その他]

ホームページ等

<http://pronet.s.kanazawa-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田岡 東 (TAOKA AZUMA)
金沢大学・自然システム学系・助教
研究者番号: 20401888

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし