

磁性細菌が生合成する磁気微粒子のインターフェイス設計

吉野 知子

はじめに

磁性細菌は細胞内にマグネタイトからなる磁気微粒子を生合成する微生物の総称である(図1)。磁気微粒子を用いて地磁気を感知し、泳動方向を決定する走磁性を獲得している。この磁気微粒子は、菌体破碎液から外部磁場により容易に磁気回収でき、人工のマグネタイトと比較して優れた分散性も有する。これらの特徴を利用し、抗体の磁気固定化担体として用いた高感度免疫測定法の開発やドラッグデリバリーシステムの磁気キャリアへの応用がなされてきた。1995年、磁性細菌の遺伝子改変により磁気微粒子表面への外来タンパク質のターゲティング技術が確立され、磁性細菌を用いたタンパク質-磁気微粒子複合体の生産は、より簡便かつ低コストで実現できるようになった。それとともに、遺伝子設計に基づき多様なタンパク質-磁気微粒子複合体の創製への道が開かれた。そこで、本稿では、はじめにこれまで明らかになっているマグネトソームの形成メカニズムについて概説し、磁気微粒子のインターフェイス設計に資する知見を整理する。続いて、多様なインターフェイス設計の基盤となる磁性細菌のホスト-ベクター系についてまとめ、機能性タンパク質-磁気微粒子複合体や磁気特性、粒子分散性の改良に成功した例を示し、その医療分野、環境分野への有用性と今後の展望を述べる。

マグネトソーム形成メカニズムの理解

磁性細菌の磁気微粒子は、マグネトソームと呼ばれる細胞小器官であり、マグネタイトコアとそれを覆う脂質二重膜小胞(リポソーム)、マグネトソーム特異的なタンパク質から構成される。マグネトソーム形成メカニズムの詳細は他の総説を参照されたい¹⁾。本稿では概略の



図1. 磁気微粒子を生合成する微生物(磁性細菌)

みを述べる。リポソームは、磁性細菌の細胞質膜が陥没することによって形成される。リポソーム上にはプロトン/鉄アンチポーターが局在しており、リポソーム内に鉄イオンを蓄積する。このとき鉄イオンが内部に輸送されると同時に外部にプロトンが排出されることで、リポソーム内はアルカリ化し、マグネタイトが生じる。またマグネタイト結合タンパク質はマグネタイトの形状、サイズを制御する因子であることが明らかになっている。

マグネタイト結合タンパク質の中でもっとも局在量の多いMms13タンパク質は、マグネタイトに強固に結合しており、さまざまなターゲットタンパク質の“アンカー分子”として利用することが可能である。我々はMms13を用いてターゲットタンパク質を磁気微粒子表面上に運搬することで機能性磁気微粒子を創製する“マグネトソームディスプレイ法”の要素技術を開発し(図2)、磁気微粒子インターフェイスを自在に制御することを可能とした。その要素技術について次項で詳細を説明する。

磁性細菌のホスト-ベクター系の構築

最初に純粋培養に成功した磁性細菌 *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 株についてはコロニー形成が難しく、遺伝子工学的手法を用いるのが困難であった。一方、当研究室で分離した *M. magneticum* AMB-1 株は酸素耐性を有するため、好気条件下の寒天培地上でのコロニー形成が可能である。磁性細菌では、このAMB-1株において初めて遺伝子組換え技術が確立し、現状では合成生物学での利用にもっとも適したホストとして用いている。AMB-1株の改良も行われており、内在性のプロ

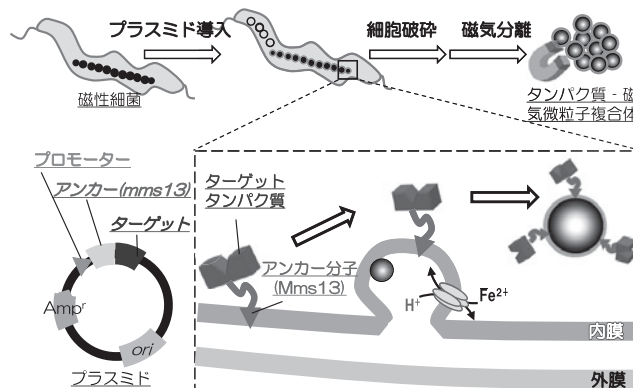


図2. マグネトソームディスプレイ法の概要

テアーゼ (Lonプロテアーゼ) 欠損株 (Δlon 株) や内在性の *mms13* 欠損株を作成し、ホストとして利用している。野生株と比較してこれらの欠損株では、ターゲットタンパク質のディスプレイ量が最大で8倍増加することが示されている。この結果から、*mms13* 欠損株において磁気微粒子インターフェイスがターゲットタンパク質のディスプレイ効率に大きく関与していると考えられる。つまり、野生株ではゲノム由来と外来プラスミド由来の両方の *mms13* 遺伝子から Mms13 タンパク質が発現するため、磁気微粒子上にはプラスミド由来の Mms13-ターゲットの融合タンパク質に加え、ゲノム由来の Mms13 が局在することになる。一方、*mms13* 欠損株ではプラスミド由来の融合タンパク質のみで磁気微粒子インターフェイスを設計できるため、ターゲットタンパク質のディスプレイ量が向上したと考えられる。

さらに磁性細菌 MGT-1 株が保有するプラスミドをベクターとして用いたホスト-ベクター系の構築により、磁性細菌の組換え系は飛躍的に発展した。MGT-1 株が保有するプラスミドと pUC 系のプラスミドを融合した発現ベクターである pUMG が開発され、大腸菌と磁性細菌の両方で複製可能なベクター系を自由に利用することが可能となった。また、磁気微粒子上のターゲットタンパク質量の増大や発現時期を制御するためのプロモーターの検討により発現誘導システムを開発するなど、合成生物学に利用可能なホスト-ベクター系の構築を進めている。

ターゲットタンパク質の固相化ストラテジー

マグネトソームディスプレイ法で生産した機能性タンパク質-磁気微粒子複合体を用いることで、反応液中から機能性タンパク質と結合する特定の物質のみを効率的に磁気回収することができる。この原理は、環境水サンプルからのエストロゲン様物質の検出、血液中からの標的細胞の分離など、幅広い分野に応用可能である。これまでの試みでは、アンカー分子である Mms13 の遺伝子の下流にターゲットタンパク質の遺伝子を組み込むことで、磁気微粒子上にターゲットを効率的に運搬する方法がとられてきた(図2)。本手法により GFP やルシフェラーゼなどのマーカータンパク質に加え、さまざまな受容体や酵素などの発現に成功している。上述のようにマグネトソームディスプレイ法の要素技術の開発により、ある一定量のターゲットを磁気微粒子上にディスプレイできるようになったが、その機能性向上までには至っていなかった。たとえば、単鎖抗体である scFv (single chain fragment variable) 発現の試みでは、磁気微粒子上への発現量は良好であるのに対し、抗原との結合がまったく見られない事例が示されている²⁾。これは、ターゲットタンパク質が発現する細胞質内が還元的环境であるため、scFv 内に存在する多くのジスルフィド結合が

形成されず、立体構造が不安定であることが原因と考えられた。そこで磁性細菌のペリプラズム空間が酸化的環境を有することに着目し、scFv を一度ペリプラズム内で発現させ正しいフォールディングに折りたたませた後、細胞破碎とともに磁気微粒子上に回収する方法を考案した。“*in vitro* ドッキング法”と命名した本法の概略を図3に示す。Mms13 遺伝子の下流および scFv 遺伝子の下流にそれぞれドッキングタンパク質を融合することで *in vitro* ドッキングが可能となる。本研究では、ドッキングタンパク質として scFv に抗体の定常部位 (Fc) を連結、また磁気微粒子上には Fc と強く相互作用する Protein A をディスプレイさせた。その結果、ペリプラズムと細胞質という細胞内の別の空間において、二つの構成物を別々に生産し、最後に磁性細菌を破碎することで、ペリプラズム内にあった scFv を磁気微粒子上に移行・固定化 (ドッキング) させることができる。我々はこの方法により、抗原特異的な結合能を有する scFv を粒子上に固定化することに成功している。

ターゲットタンパク質を細胞内のどこで発現させるかに加え、磁気微粒子上の空間配置を制御する試みも行っている。この方法では、アンカー分子に融合するタンパク質をターゲットタンパク質ではなく、複数種類のターゲットタンパク質を配列化可能な足場タンパク質とすることで高度なインターフェイス設計が可能となる。たとえば、複数の酵素で進む一連のカスケードについて酵素同士の近接配置により反応速度の向上が示された例を紹介する³⁾。本技術は高い親和性 (K_d 値 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ M) をもつコヘシン-ドッケリン相互作用を利用している。複数種類のコヘシン-ドッケリン相互作用の組合せを用いることで、好みの酵素を選択的に、かつナノ空間を制御して固定化することが可能である。上記の方法でセルラーゼの一種であるエンドグルカナーゼ (EG) および β -グ

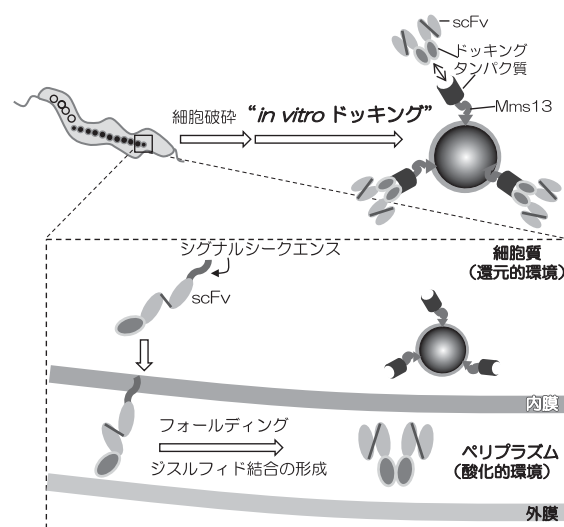


図3. *in vitro* ドッキング法の概略

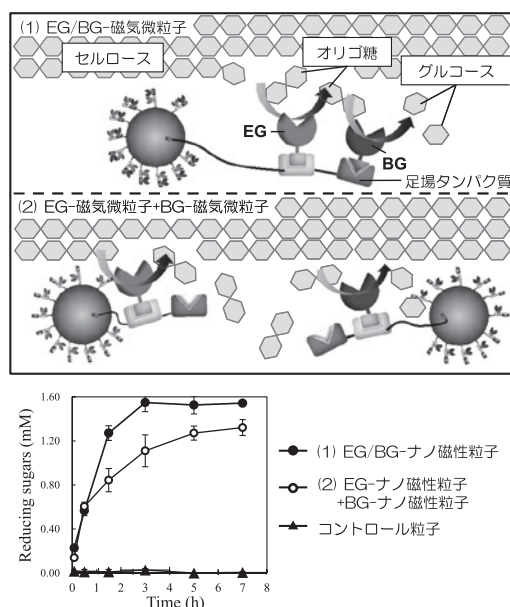


図4. セルラーゼ-磁気微粒子複合体を用いたセルロースの加水分解

ルコシダーゼ (BG) を足場タンパク質を介して固定化し、セルロースの加水分解試験を行った結果、EGとBGを近接に固定化した磁気微粒子では、個々のセルラーゼを固定化した磁気微粒子の混合物と比較し、セルロースの分解反応が約2倍の速度で進行していることが示された (図4)。このような磁気微粒子インターフェイス制御により酵素反応カスケードの設計も可能となる。

磁気微粒子の物性改良

磁気微粒子インターフェイスの設計については、ターゲットタンパク質のディスプレイに加え、磁気微粒子自体の物性改良に関する試みも行っており、遺伝子工学的な手法によりどこまで自在に磁気微粒子を設計できるかに挑戦している。これまでに、上述で紹介した磁気微粒子に強固に結合する Mms シリーズの遺伝子欠損株の作出により、磁気微粒子の形態を制御できることが明らかとなっている。これらの結果は、磁気特性の異なる磁気微粒子を遺伝子工学的な改変で創製できることを示しており、今後の検討により新たな研究領域の創製が可能となる。

また、磁気微粒子の分散性向上や刺激応答性の制御が可能な表面改質の試みも行っている。その例として磁気微粒子表面の電化や親水性を遺伝子工学的に制御した例を紹介する⁴⁾。磁気微粒子の細胞医療分野での汎用性を向上するためのボトルネックとして、磁気微粒子への細胞の非特異吸着があげられる。これまでにポリエチレングリコール (PEG) などの合成ポリマーを使用した表面修飾により、マテリアル表面への細胞の非特異的吸着

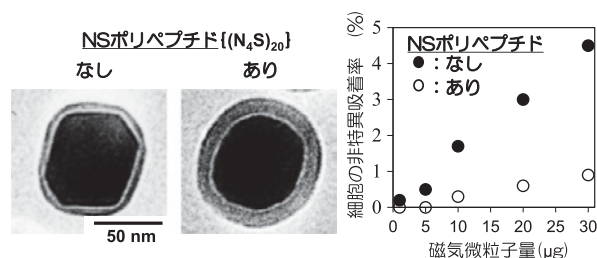


図5. NSポリペプチドをディスプレイした磁気微粒子の評価

の抑制が試みられている。PEGは親水性の非荷電分子であり、この特性がマテリアルと細胞との非特異的吸着を回避する必要不可欠な性質である。このことに着想を得て、この性質を模倣する人工ポリペプチドを設計した。その結果、アスパラギン (N) とセリン (S) から構成された人工ポリペプチド、NSポリペプチド $\{(N_4S)_{20}\}$ を磁気微粒子上にディスプレイすることで、細胞への非特異的な吸着を大幅に抑制できることを見いだした (図5)。また、人工ポリペプチドによる磁気微粒子表面の機能化の応用として、温度を上げると疎水性が向上する性質である下限臨界溶液温度型のポリペプチド (エラスチン) を粒子上に導入することで、温度変化により粒子の凝集や分散を制御可能な磁気微粒子の開発にも成功している。本手法の最大の利点は、各ポリペプチドが遺伝子でコードされているため、あらゆる機能性タンパク質との遺伝子融合により人工タンパク質を設計できることである。

おわりに

以上のように、磁性細菌をタンパク質と磁気微粒子の複合体合成の場とし、タンパク質の局在場所や発現時期に加え、タンパク質の空間的位置やアミノ酸配列までを厳密に制御することで磁気微粒子のバイオインターフェイスを自在に分子設計できるようになった。さらにタンパク質に加え、磁気微粒子表面に覆われている生体膜の設計・改変を合成生物学的なアプローチにより進めることで、タンパク質の機能発現の新たな戦略が期待できる。物質代謝やエネルギー代謝とマグネトソーム形成メカニズムとのリンク付けにより、生物磁石の生合成の本質的な理解が深まり、合成生物学ホストとしての磁性細菌の利用性が広がるものと考えられる。

文 献

- 1) Arakaki, A. et al.: *J. Jpn. Soc. Powder Powder Metallurgy*, **61**, S99 (2014).
- 2) Sugamata, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445**, 1 (2014).
- 3) Honda, T. et al.: *Biomacromolecules*, **16**, 3863 (2015).
- 4) Takahashi, M. et al.: *Biomaterials*, **31**, 4952 (2010).