

メタン生成アーキアの増殖コントロール技術の開発を目指した細胞周期解析法の確立

尾木野 弘 実*

Establishment of Cell Cycle Analysis Method for the Development of Growth Control Technology of Methanogenic Archaea

Hiroimi OGINO*

Methanogenic archaea produce methane, which is the most important greenhouse gas, and grow in a variety of environments without oxygen. *Methanosarcina acetivorans* used in this study can produce methane from a wide range of substrates, including acetic acid and methanol, as well as carbon dioxide. However, research and development for effective utilization of methanogens is still in its infancy. Although various groups have analyzed the molecular mechanisms of DNA replication, repair, and recombination in archaea, including methanogens, cell division and the cell cycle have remained largely unknown except in a few species, and techniques and agents to synchronize the cell cycle are scarce. In this study, we tried to establish a stable genetic engineering technology for *M. acetivorans* in Japan, to analyze genes related to cell division and the cell cycle using genetic techniques, and to establish a growth control technology. Although we could not isolate single colonies on plates, we have succeeded in isolating the five different gene-deficient strains by stepwise dilution of the culture after lipofection. Future studies are expected to elucidate the function of target genes by comparing the growth rates and gene expression levels of these gene-deficient strains with those of the wild strain.

1. 研究背景・目的

メタン菌は、温室効果ガスとして最も影響の大きいメタンを生成し、牛・ヒトの体内や海洋など、酸素のない環境であれば様々な場所で生育している。メタン菌の生成するメタンによる地球温暖化への影響が懸念される一方で、メタン菌は大気中の二酸化炭素を基質としてエネルギー利用可能なメタンを生成できることから、温室効果の抑制とともに石油・石炭に替わる将来のエネルギーの問題に関連づけて注目を集めている。中でも、本研究で用いた *Methanosarcina acetivorans* は二酸化炭素のみならず、酢酸、メタノールなどの幅広い基質を用いてメタンを生成することができる⁽¹⁾。しかし、メタン菌が属するアーキア（古細菌）と呼ばれる生物ドメイン（図1）を有効利用する研究は、バクテリアや真核生物といった他の生物ドメインと比べて歴史が浅い。アーキアは、外観はバクテリアと同じ単細胞の原核生物であるが、保存されている遺伝子は真核生物に近いというユニークな特徴がある。特にメタン菌は偏性嫌気性で培養の難易度が高い生物種が多く、増殖も遅いことから有効利用するための研究開発は未だ発展途上である。

これまで、メタン菌を含むアーキアにおいて DNA 複製・修復・組換えの分子メカニズムに関する解析がさまざまなグループにより行われてきたが、細胞分裂・細胞周期はごく一部の生物種を除いてほとんど明らかになっておらず、細胞周期を同調させる技術や薬剤も乏しい。また、*M. acetivorans* における遺伝子工学技術は Metcalf らによって報告されているが⁽²⁾、他グループによる再現例はほとんどない。本研究における課題は、*M. acetivorans* における安定した遺伝子工学技術を国内で確立し運用すること、細胞分裂・細胞周期に関連する遺伝子を中心に遺伝学的手法を用いて解析し、将来の増殖コントロール技術の確立に繋げることである。

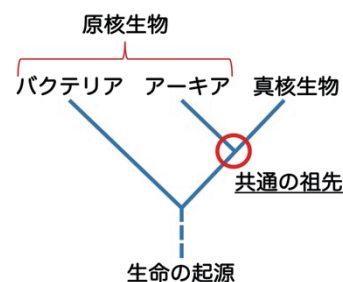


図1 16S rRNAによる進系統樹。

2. 実験手法

M. acetivorans の遺伝子操作は、リポフェクションにより導入した直線化プラスミド DNA との相同組換えにより行った (図2)。pUC19 プラスミドに欠損・改変を行いたい目的遺伝子の upstream と downstream に相同な塩基配列をそれぞれ 1 kb を挿入した。さらに、マーカー遺伝子として *puromycin N-acetyltransferase* (Pac) を用いることで、*M. acetivorans* がピューロマイシン耐性を獲得したかどうかを指標に組換え体を選別した。これらの操作は全て嫌気チャンバー内で行い、試薬も嫌氣的に調製したものをを用いた。ピューロマイシン耐性を獲得した株について、シングルコロニーの単離を試み、PCR により目的遺伝子が改変されたかどうかを調べた。

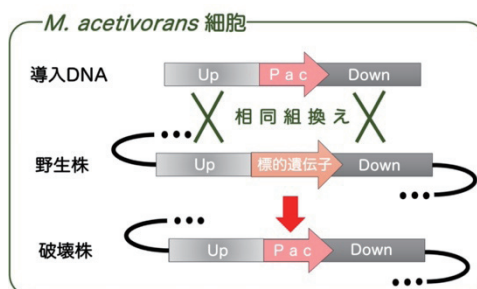


図2 *M. acetivorans* 遺伝子操作の概略。

3. *M. acetivorans* の遺伝子欠損株の単離

8 $\mu\text{g/ml}$ ピューロマイシンを含む培地においてリポフェクション後の *M. acetivorans* を 37°C で培養したところ、10 日程で培地が濁り、目的遺伝子の欠損株と予想される菌体の生育が観察された。この菌体をプレート上で嫌氣的に培養し、シングルコロニーを単離することを試みたが、現在までに成功していない。

そこで、生育した培地を 10 倍ずつ段階希釈することで遺伝子欠損株のみを単離した。その結果、最大で 8 回 (10^8 倍) に希釈した培地において生育が観察された。この菌体についてゲノム DNA を回収し、目的遺伝子を欠損し代わりに Pac が挿入されているかどうかを PCR により調べると、予想通り目的遺伝子が Pac に置き換わっており、元の遺伝子は検出されなかった (図3)。

以上のことから、リポフェクションによる目的遺伝子の欠損に成功したと結論づけた。同様の手法により、現在までに 5 種類の遺伝子について遺伝子欠損株の単離に成功した。今後は、これらの遺伝子欠損株の増殖速度や遺伝子発現量を野生株と比較することにより、目的遺伝子の機能解明が期待される。プレート上でコロニーが生育できるように培地の条件検討を行い、遺伝子欠損株の単離を簡便に行えるようにすること、遺伝子欠損だけでなくプロモーター領域を改変することで遺伝子発現を制御することも今後の課題である。

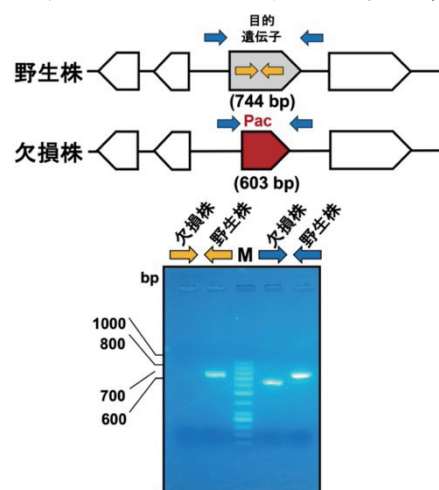


図3 PCR による遺伝子欠損株の分析。

4. 謝辞

本研究の遂行をご支援下さいました公益財団法人豊田理化学研究所に心よりお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) M. Rother and W. W. Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (2004) 16929-16934.
- 2) W. W. Metcalf, J. K. Zhang, E. Apolinario, K. R. Sowers and R. S. Wolfe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (1997) 2626-2631.