

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580076

研究課題名(和文)

メタン生成古細菌メタノサルシナ・マゼイの細胞壁分解酵素の解析と機能利用

研究課題名(英文)

Analysis of cell wall degrading enzyme of a methanogenic archaeon, *Methanosarcina mazei*, and utilization of its functions

研究代表者：

浅川 晋 (ASAKAWA SUSUMU)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50335014

研究成果の概要(和文)：メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* (メタノサルシナ・マゼイ) の aggregate から single cell への形態変化に関わる細胞壁分解酵素 disaggregatase の発現条件を解明し、その機能をメタンの発生抑制とメタン発酵の効率化に活用するための基盤的情報を得ようとした。*Methanosarcina mazei* の disaggregatase の活性は適切なイオン組成の溶液中で還元すれば、安定的に発現されることを明らかにするとともに、disaggregatase 遺伝子を発現するイネの作出に成功した。また、disaggregatase の発現と single cell 化との関係が *Methanosarcina mazei* の菌株間で異なることを明らかにし、aggregate から single cell への形態変化のメカニズム解明の端緒を得た。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to elucidate conditions for expression of cell wall degrading enzyme, disaggregatase, involved in morphological changes from aggregates to single cells of a methanogenic archaeon, *Methanosarcina mazei*, and to obtain fundamental information to utilize functions of the enzyme for mitigation of methane emission and improvement of methane fermenting efficiency. Activity of disaggregatase in *Methanosarcina mazei* was expressed by reducing the proteins in solutions with appropriate concentrations of cations. Rice plants introduced with the disaggregatase gene successfully transcribed the gene. Relationships between expression of disaggregatase and morphological change from aggregates to single cells varied with two strains of *Methanosarcina mazei*, indicating a clue to reveal mechanism of the morphological changes in *Methanosarcina mazei*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：土壌微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：メタン生成古細菌、細胞壁分解酵素、形態変化、絶対嫌気性、*Methanosarcina mazei*、disaggregatase、aggregate、single cell

## 1. 研究開始当初の背景

メタン生成古細菌は、嫌気的環境における有機物分解の最終段階を担う絶対嫌気性菌

であり、メタン発酵として廃棄物処理やエネルギー生産に利用されるとともに、温室効果ガスメタンの発生との関連で注目されてい

る。中でも *Methanosarcina* 属のメタン生成古細菌は酢酸、メタノール、メチルアミン、水素+二酸化炭素など、メタン生成古細菌の中では最も広範な基質を利用することができる。また、水田などの様々な嫌気環境や各種のメタン発酵槽から分離されており、応用面でも生態的にも重要な菌である。

*Methanosarcina mazei* (メタノサルシナ・マゼイ) は条件により、その形態が球状の単一細胞体(single cell)、集合体(aggregate)、薄層体 (lamina)、シスト体 (cyst) に変化するという珍しい性質を有する。増殖期の細胞形態は single cell および aggregate であり、それぞれ、増殖能、環境変化への耐性の面で有利な形態であるため、両形態間の変化はメタン生成能や菌の生残性に密接な関係があると考えられている。aggregate は、細胞壁成分 (細胞間物質) であるヘテロ多糖メタノコンドロイチンが single cell 間を接着することにより形成される。aggregate から single cell への形態変化は、本菌自身が有する細胞壁分解酵素である、メタノコンドロイチンの分解酵素(disaggregatase)が関与することが明らかにされている (図1)。

single cell 状の *Methanosarcina mazei* の細胞表層は、薄い単純タンパク質からなる S レイヤーのみであり、浸透圧の低下や界面活性剤の作用などにより容易に溶菌する。すなわち、低張条件の環境中では disaggregatase の作用により、aggregate を single cell へと形態を変化させることにより、*Methanosarcina mazei* を溶菌することができる。そのため、メタンの発生抑制が求められる場面で disaggregatase の機能を溶菌酵素として利用できると考えられる。逆に、高張条件下では disaggregatase で *Methanosarcina mazei* を single cell 化することにより、メタン生成能を高め、菌を広く分散させることができるため、塩類濃度が高い廃棄物を用いたメタン発酵槽などにおけるメタン生産効率化に活用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* (メタノサルシナ・マゼイ) の aggregate から single cell への形態変化に関わる細胞壁分解酵素 disaggregatase の発現条件をタンパク質および細胞レベルで解明し、その機能をメタンの発生抑制とメタン発酵の効率化に活用するための基盤的情報を得ることを目



図1 メタノサルシナ・マゼイの形態変化と細胞壁分解酵素 disaggregatase (Dag).

的とした。

具体的には、大腸菌で発現した disaggregatase を用いて、その活性発現条件をタンパク質レベルで解明するとともに、*Methanosarcina mazei* の disaggregatase 遺伝子の転写解析に基づいて、酵素の発現に影響を与える要因を細胞レベルで明らかにし、本酵素の機能を活用するための基盤的情報を得ようとした。さらに、本酵素遺伝子をイネに導入・発現することにより、*Methanosarcina mazei* を溶菌する植物の作出を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) disaggregatase タンパク質の活性発現条件の解明

*Methanosarcina mazei* は絶対嫌気性の微生物であり、disaggregatase についても、酸素により活性が容易に失われ、嫌気条件下でのみ活性の発現が見られる酸素感受性の酵素である。*Methanosarcina mazei* の aggregate から single cell への形態変化に、disaggregatase の作用を安定的に活用するために必要となる基盤的条件をタンパク質レベルで明らかにするため、大腸菌を用いた disaggregatase 遺伝子の発現系により、disaggregatase タンパク質の大量発現を行い、発現時およびタンパク質調製時の酸素条件や抽出液の組成と還元条件、得られたタンパク質の活性発現に必要なイオン強度や還元状態など、disaggregatase タンパク質の活性が安定的に発現される条件を検討した。

(2) *Methanosarcina mazei* における disaggregatase の発現に影響を与える要因の解明

*Methanosarcina mazei* の aggregate から single cell への形態変化には、培地中の陽イオンや基質の濃度、生育ステージが影響を及ぼすことが明らかにされている。*Methanosarcina mazei* の disaggregatase の発現に影響を及ぼす種々の要因を細胞レベルで明らかにするため、陽イオン濃度に対する反応性に関し、細胞形態変化の表現型の異なる *Methanosarcina mazei* の2菌株 (LYC株 [中程度の陽イオン濃度でも single cell 化しやすい] および TMA 株 [高い陽イオン濃度のみで single cell 化する]) における disaggregatase の発現に及ぼす培地中の陽イオン組成の影響を細胞レベルで調査した。上述の2菌株を陽イオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ) 組成の異なる4種類の培地で培養し、細胞形態の観察と disaggregatase の活性確認を行い、培養菌体より抽出した RNA について、逆転写・定量的 PCR により disaggregatase 遺伝子の発現を転写レベルで解析し、また、disaggregatase に特異的な抗体を用いて酵素タンパク質の発現を解析した。

(3) *Methanosarcina mazei* を溶菌する植物作出の試み

disaggregatase の作用により aggregate から single cell となると、*Methanosarcina mazei* の細胞表面は単純タンパク質の薄い S レイヤーだけとなり、浸透圧の低下や界面活性剤などにより容易に溶菌するため、*Methanosarcina mazei* の溶菌酵素として disaggregatase を用いることができる。disaggregatase の作用をメタン発生抑制に利用する一つの試みとして、disaggregatase 遺伝子を導入した植物を作出するため、発現用ベクター (p35S-nos/Hm3) を用いて、イネ (キヌヒカリ) の培養細胞へ *Methanosarcina mazei* の disaggregatase 遺伝子をアグロバクテリウム法で導入した。個体を分化・再生後、葉から RNA を抽出し、逆転写 PCR により disaggregatase 遺伝子の転写解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) disaggregatase タンパク質の活性発現条件の解明

disaggregatase タンパク質を発現させた大腸菌より好氣的に調製した可溶性画分について、気相の窒素ガス置換処理と還元剤添加を行った場合、また、大腸菌の嫌気培養と無酸素条件下での抽出液調製、さらに還元剤添加を行った場合でも、disaggregatase の活性は得られなかった。*Methanosarcina mazei* の disaggregatase 粗酵素液の活性発現条件の検討から、酸素感受性以外の要因として、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$  のイオン強度などが考えられたため、発現タンパク質を含む可溶性画分についてそれらの条件を調整した緩衝液を用いることにより disaggregatase の活性が得られた (図 2)。

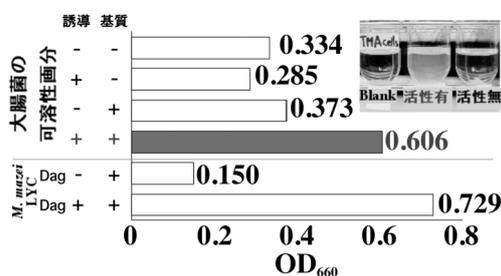


図2 pET-39b(+)-dag を導入した大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株の可溶性画分の disaggregatase 活性 (基質, *Methanosarcina mazei* S-6<sup>+</sup> 株の集合体細胞)

以上より、disaggregatase タンパク質は好気条件下で大腸菌により発現・調製した後、適切なイオン組成の溶液中で還元すれば、活性が得られることを明らかにした。

(2) *Methanosarcina mazei* における

disaggregatase の発現に影響を与える要因の解明

陽イオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ) 組成の異なる 4 種類の培地で培養した結果、*Methanosarcina mazei* LYC 株、TMA 株ともに SC2 培地では単一細胞、LPBM 培地では集合体の形態を示した。MS 培地では LYC 株は単一細胞あるいは細胞数個分の微小な集合体で生育したのに対し、TMA 株は LPBM 培地と同様の大きな集合体の形態であった (表 1)。単一細胞で生育した培養上清には disaggregatase の活性が確認され、培養菌体には disaggregatase タンパク質の発現が認められた。

表 1 陽イオン組成の異なる培地で生育した *Methanosarcina mazei* の細胞形態\*

菌株	培地			
	LPBM	MS	SC2-NaCl	SC2
LYC	A(S)	S, A	S(A)	S
TMA	A	A	A(S)	S

陽イオン	濃度 (mM)			
$Mg^{2+}$	1.8	4.9	49	49
$Ca^{2+}$	<0.1	2.7	2.7	2.7
$Na^{+}$	89	59	59	459

\*S, 単一細胞(single cell); A, 集合体(aggregate).

Disaggregatase 遺伝子 (*dag*) の mRNA に由来する cDNA 数は、培養液 1mL 当たりで比較すると、TMA 株ではどの培地で培養した場合でも差は見られなかったのに対し、LYC 株では LPBM、MS、SC2 培地の順に増加した。また、細胞数に比例すると考えられるゲノム DNA 中の *dag* (遺伝子) 数は、培養液 1mL 当たりで比較すると、TMA 株を SC2 培地で培養した場合に最も高く ( $10^9$  台)、LYC 株を LPBM 培地で培養した場合に最も低く ( $10^7$  台)、それ以外は  $10^8$  台であった。*dag* の mRNA に由来する cDNA 数を *dag* (遺伝子) 数当たりで比較すると、LYC 株では培養液 1mL 当たりの場合と同様に LPBM、MS、SC2 培地の順に増加したが、TMA 株では SC2、LPBM、MS 培地の順に増加し、培地中の陽イオン濃度や細胞形態変化との関係は明らかではなかった。さらに、代謝活性を反映していると考えられる 16S rRNA 数は、培養液 1mL 当たりで比較すると、菌株間で大きな差は見られなかったものの、どちらの菌株の場合も LPBM、MS、SC2 培地の順に一桁ずつ増加し、培地の組成に従って代謝活性が増加したと考えられた。*dag* の mRNA に由来する cDNA 数を *dag* (遺伝子) 数と 16S rRNA 数で除し、細胞数及び代謝活性当たりで比較すると、LYC 株では LPBM、MS、SC2 培地の順に増加したが、TMA 株では SC2、MS、LPBM 培地の順に増加し、全く逆の傾向を示した。

以上より、*Methanosarcina mazei* LYC 株では、培地中の陽イオン濃度の増加に伴って *dag* の転写量が増加し、単一細胞への形態変化と *dag* の発現が対応していることが示唆された。一方、TMA 株では培地中の陽イオン濃度や細胞形態変化と *dag* の転写量に対応は見られず、単一細胞化には *dag* の発現以外にも何らかのメカニズムが関与していると推察された。

(3) *Methanosarcina mazei* を溶菌する植物作出の試み

発現用ベクター (p35S-nos/Hm3) を用いて、イネ (キヌヒカリ) の培養細胞へ *Methanosarcina mazei* の disaggregatase 遺伝子をアグロバクテリウム法で導入した。個体を分化・再生後、葉から RNA を抽出し、逆転写 PCR により disaggregatase 遺伝子の転写解析を行ったところ、非特異バンドが観察されたものがあつたが、いくつかの個体で disaggregatase 遺伝子の全長に相当する断片が得られ、イネで disaggregatase 遺伝子が発現・転写されていることが確認できた (図 3)。

タンパク質の発現解析と発現タンパク質における disaggregatase の酵素活性については研究期間内に解析できなかったが、再生個体より種子が得られたため、種子より生育させた植物体を用いて、今後調査を行ってきたい。

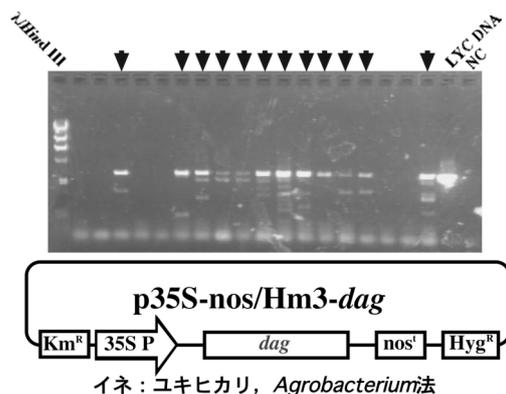


図 3 disaggregatase 遺伝子 (*dag*) のイネへの導入と発現。導入・発現用ベクターと逆転写 PCR による発現解析。矢印で示す個体で *dag* の発現が見られる。

## 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 2 件)

- ① Osumi N, Kakehashi Y, Matsumoto S, Nagaoka K, Sakai J, Miyashita K, Kimura M, Asakawa S, Identification of the gene for disaggregatase from *Methanosarcina mazei*, *Archaea*, 査読有、vol.2、2008、185-191

- ② 浅川晋、水田における微生物の機能と群集構造、*バイオサイエンスとインダストリー*、査読無、vol.66、2008、482-487

[学会発表] (計 5 件)

- ① 渡邊健史、木村真人、浅川晋、水田生態系におけるメタン生成古細菌群集の多様性と分布、日本 Archaea 研究会第 2 3 回講演会、2010 年 7 月 9 日、名古屋市
- ② 浅川晋、水田土壌におけるメタン生成古細菌の生態 ~培養から分子生態へ~、第 25 回日本微生物生態学会広島大会 嫌気性界の微生物生態研究部会、2009 年 11 月 21 日、東広島市
- ③ Asakawa S, Watanabe T, Kimura M, Microbial communities in paddy field soil are stable and diverse, 9th International Conference of the East and Southeast Asian Federation of Soil Science, 2009 年 10 月 28 日、ソウル
- ④ 浅川晋、渡邊健史、木村真人、水田土壌はメタン生成古細菌にとって安住の地である、日本 Archaea 研究会第 2 2 回講演会、2009 年 7 月 11 日、札幌市
- ⑤ Osumi N, Kakehashi Y, Matsumoto S, Nagaoka K, Sakai J, Miyashita K, Kimura M, Asakawa S, Identification of the gene for disaggregatase from *Methanosarcina mazei*, International Union of Microbiological Societies [IUMS] World Congresses 2008, 2008 年 8 月 8 日、イスタンブール

[図書] (計 3 件)

- ① 浅川晋・村瀬潤 (分担執筆)、培風館、身近な自然の保全生態学 -生物の多様性を知る- (水田の土壌環境と微生物相、生物群ごとの基本的な多様性調査法 微生物について)、2010 年、pp.149-173 および pp.196-200
- ② 浅川晋 (分担執筆)、養賢堂、湿地環境と作物 (湿地土壌の微生物)、2010 年、pp.82-89
- ③ 浅川晋 (分担執筆)、朝倉書店、微生物の事典 (農地から発生する温室効果ガス (メタン、亜酸化窒素) と微生物)、2008 年、pp.317-318

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 晋 (ASAKAWA SUSUMU)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：50335014