

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651251

研究課題名(和文) methanogenesis 関連酵素の産業利用微生物への応用

研究課題名(英文) Methane synthesis using the budding yeast expression system

研究代表者

開 俊樹 (hiraki, toshiki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20608492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタン生成アーキアのメタン合成遺伝子を産業利用が容易な微生物の染色体にインテグレートすることで、難培養性であるメタン生成アーキアよりも容易にメタンガスを生合成する事を意図した。メタン生合成系のうち、宿主である *S.cerevisiae* で安定発現が確認された CoenzymeF420 合成関連遺伝子 5 つを、プロモーターと共に宿主の染色体のトランスポゾン領域にインテグレートしてタンパク質が発現されるかを検討した結果、発現が確認出来なかった。今後、*S.cerevisiae* の欠損可能な遺伝子座に遺伝子置換する方法で、発現が可能か検討を続ける予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we be to integrate into the chromosome of *S.cerevisiae* the methane synthesis gene, it was intended to be the biosynthesis of methane in other archaea.

In methane biosynthesis, CoenzymeF420 synthesis-related genes expressed in *S.cerevisiae*. Result of studyin g protein is to be expressed and integrated into the transposon region of a chromosome of the host together with the promoter ADH1, it was not able to confirm expression. Future, we plan to in a way that gene replacement in a possible loss locus of *S.cerevisiae*, to continue the investigation or possible expression.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生合成

キーワード：メタン生合成

1. 研究開始当初の背景

近年の炭酸ガス温暖化対策として、化石燃料からカーボンニュートラルな資源への移行が世界的な潮流となっている。その中でメタン生成アーキアは水素と炭酸ガスから、我々が日常的に使っている天然ガスの主成分:メタンを生成できる点で画期的である。

メタンガスは天然ガスの主成分であり、我が国ではその殆どを輸入に頼っている。しかし発展途上国の近代化によりエネルギー獲得競争が激しくなり、価格の上昇傾向が長期にわたり継続すると予想される。また天然ガスの生産国は、中東・ロシアなどに偏りがあり、政治リスクを無視出来ない。現に 2009 年にはロシアがウクライナとの間で、欧州も巻き込んだ資源恫喝外交を繰り広げた事は記憶に新しい。

その中でメタン生成アーキアによって発生するバイオガスの利用は、資源問題をクリアし安定的なエネルギーを供給出来る点で社会的に大きな貢献が可能である。原料となるのは温暖化ガスで削減が議論されている二酸化炭素であり、積極的に利用を進めればカーボンニュートラルな社会実現に向けて新たな一歩を踏み出せると確信する。

しかしアーキアは非常に培養が困難であり、常に嫌気的条件を維持しなければならないという問題点がある。そこで我々はメタン生成関連遺伝子のみを培養が容易な通性好気微生物に形質転換し、メタン生成を容易に行えるような培養系の開発を目標とした。

2. 研究の目的

深海で発見されたメタン生成アーキア(古細菌)は、水素と CO₂ を原料にメタンを生合成する細菌である。この生物を利用すれば CO₂ を原料に天然ガスの主成分であるメタンを合成出来るが、人工培養が困難で効率的なメタン生成には至っていない。当該研究で、既に培養技術が確立した生物にメタン合成関連遺伝子を形質転換し、効率的な培養とメタン合成を目的とした。

研究期間内に明らかにしようとしたのは次の2点である。

1. 通性好気微生物に形質転換したメタン生成関連遺伝子の安定的発現
2. 形質転換された細胞で、補酵素生成やメタン生成が行われているか否かの確認

3. 研究の方法

(1) メタン生成アーキアから。メタン生成遺伝子群のクローニング

メタン生成遺伝子は *Methanocaldococcus jannaschii* の染色体から PCR で増幅した。*M. jannaschii* は既に全ゲノム解析が終了しており、PCR で必要な遺伝子配列の詳細は公共のデータベース KEGG PATHWAY(<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)より検索した。PCR に使用した酵素は東洋紡から発売されている KOD-Plus-Neo を利用した。本製品を利用した目的は、微量サンプルをテンプレートにした場合でも、高性格、高効率に目的遺伝子を増幅可能であったためである。サーマルサイクラーは日本ジェネティクス株式会社の Life Touch Thermal Cycler を使用し、3ステップで PCR 反応を行い、1%アガロースゲル電気泳動でそれぞれのバンドを確認した。PCR に用いたプライマーは全て life technologies 社の invitrogen カスタム DNA プライマーというオリゴ DNA 受託合成によって合成されたものを購入した。プライマーの両端には各メタン合成遺伝子の配列を確認した上で、内部遺伝子配列を切断しないように制限酵素サイトを事前に導入した。

PCR 合成したメタン合成遺伝子は日本ジェネティクス社の FastGene Gel/PCR Extraction Kit で生成し、New England Biolabs 社の各種制限酵素で処理したのち、*S. cerevisiae* 用の単コピー型プラスミドベクター YCplac33 のマルチクローニングサイトに挿入した。挿入にはタカラバイオ株式会社から販売されている T4 DNA Ligase を使用した。挿入したベクターのマルチクローニングサイト前後には、タンパク質発現用にアルコール脱水素酵素 ADH1 のプロモーターと FLAG タグが存在しており、*S. cerevisiae* での

恒常的な発現が可能である。FLAG タグは発現のチェックをウエスタンブロットにて確認する際に必要となるため挿入した。

サブクローニングは大腸菌 DH5 株を利用した。LB 液体培地（アンピシリン 50ng/ml 添加）で培養した菌体から、日本ジェネティクス社の FastGene Plasmid Mini Kit でプラスミドを抽出精製し、SIGMA GENOSYS の DNA 受託シーケンス解析サービスによって配列を確認した。

PCR クローニングした遺伝子のうち、38 遺伝子はデータベース登録配列と比較して 1～複数の DNA 変異が確認された。変異が確認された遺伝子は Agilent Technologies 社の Quik Change Lightning Multi-site-Directed を使用して、DNA 配列の修正を行いデータベースの登録配列に一致させた。

メタン関連遺伝子を発現させるホストには *Saccharomyces cerevisiae* の 1 倍体 BY4741 を選択した。BIO-RAD 社の Gene Pulser Xcell を用いてエレクトロポレーション法によってプラスミドを形質転換した。形質転換体の選別にはペプタープラスミドに存在する URA3 遺伝子を用いたウラシルの栄養要求性を利用した。

ADH1 プロモーターによって恒常的に遺伝子発現は行われているはずなので、各形質転換体をウラシル欠損最小栄養培地で培養し、ガラスビーズで破碎後、FLAG タグによる抗体染色を行い、ウエスタンブロットで確認した。1 次抗体には SIGMA-ALDRICH 社の monoclonal ANTI-FLAG M2, Clone M2、2 次抗体には GE ヘルスケア社の Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep を利用し、GE ヘルスケア社 ECL advanced western blotting detection kit を用いて可視化した。

次いで、ホスト内で安定に発現すると確認出来た遺伝子を、*S. cerevisiae* の染色体にインテグレートした。*S. cerevisiae* は染色体上に複数のトランスポゾンを持っており、これらの位置も既にゲノム解析から明らかになっている。トランスポゾン領域にプロモーターと結合したメタン合成遺伝子をインテグレート

し、タンパク質が効率的に発現するかどうかを検討した。インテグレーションの方法はウラシルの栄養要求性を利用した 5-FOA 法を用いた。インテグレーションには YIplac211 プラスミドを使用した。

4. 研究成果

現在判明しているメタン合成関連遺伝子約 200 種類のうち、KEGG pathway からメタン合成経路に直接関連する遺伝子 104 種類を選別した。

結果、59 遺伝子が可溶性に発現し、37 遺伝子が不溶性に発現、11 遺伝子は発現が認められなかった。

プラスミドによって安定発現が確認された遺伝子のうち、メタン合成系の各ステップで全ての関連遺伝子が安定して発現しているのは CoenzymeF420 合成系の遺伝子群のみであった為、CoenzymeF420 合成系遺伝子 7 つ (MJ_0887, MJ0446, MJ_1431, MJ_1256, MJ_0768, MJ_1001) をプロモーターと共に宿主の染色体のトランスポゾン領域にインテグレートしてタンパク質が発現されるかを検討した結果、発現が確認出来なかった。

今後、*S. cerevisiae* の欠損可能な遺伝子座に遺伝子置換する方法で、発現が可能か検討を続行する予定である。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

開 俊樹 (HIRAKI TOSHIKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20608492

(2)研究分担者

臼井 けい子 (USUI KEIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・その他部

局等・研究員

研究者番号：40608494

坪内 泰志 (TSUBOUCHI TAISHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・その部・

研究員

研究者番号：30442990

(3)連携研究者

()

研究者番号：