

古細菌ゲノムの体系的・網羅的機能解析を支援する 逆遺伝学的方法論の開発

●野村 紀通

京都大学大学院農学研究科

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムサイエンスの方法論を多種多様な微生物ゲノムに適用することにより、未知の生命機構の解明や産業上有用な遺伝子資源の開拓における大きなブレイクスルーが期待できる。80~100℃の高温条件下で活発に増殖する超好熱古細菌は、種々のバイオ産業技術に応用可能な耐熱酵素を産生すること、また系統進化学的に真正細菌とも真核生物とも異なる「第三の生物」に属すること等の理由から、ゲノム研究の対象として早くから強い関心が寄せられた。深海底熱水口から分離された超好熱古細菌 *Methanococcus jannaschii* のショットガン法による全ゲノム塩基配列決定(1996年)を皮切りとして、現在までに10種の全ゲノム塩基配列が明らかにされている。当研究室で分離された超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1もその一例であり、1999年に全ゲノム塩基配列解読(1.67 Mbp)が終了している。

A. pernix K1のゲノム解析の結果、全ORF(約2,600)のうち約50%が真核生物ゲノムや真正細菌ゲノムにホモログが存在しない機能未知の遺伝子であることが明らかになった。これら未知ORF群の機能解析や遺伝子発現ネットワークの解析によって得られる情報は、古細菌が代謝・増殖・環境応答・極限環境への適応などの諸機能においていかに真正細菌や真核生物と異なる生命システムを有しているかを解明するものであり、単に古細菌研究のみならず、生命科学全体に新たな概念や生命現象を提示する可能性があり重要である。

全ゲノム塩基配列が明らかになった生物において、体系的な遺伝子破壊実験からその遺伝子の機能を探ることはきわめて有効な手段である。しかしながら、古細菌を対象とした逆遺伝学的方法論は確立されていない。本研究では、超好熱古細菌ゲノム生物学の推進に必要な汎用性の高い基盤技術を開発する目的で、(1)相同組換えによるワンステップ遺伝子破壊法の確立と、(2)古細菌の「動くイントロン(mobile intron)」の転移メカニズムを応用した染色体標的部位への外来DNA挿入法の確立をめざす。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 古細菌におけるワンステップ遺伝子破壊実験系の確立、および遺伝子破壊株コレクションの作製
- (2) 古細菌の可動性イントロン(mobile intron)の転移メカニズムを応用した染色体標的部位への外来DNA挿入法の確立

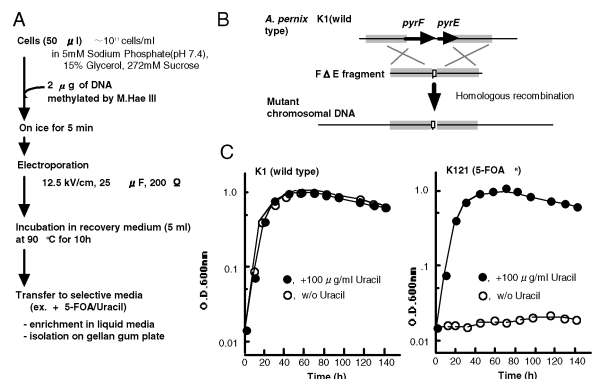
〈研究期間の成果〉

(1-a) 超好熱古細菌の遺伝子操作系に必要な耐熱性選択遺伝マーカーを開発した。ピリミジン合成系遺伝子のうちのpyrFEを選択遺伝マーカーとして利用する系を確立した。in silico解析からゲノム上にpyrB, pyrC, pyrD, pyrE(URA5), pyrF(URA3)が存在し、ピリミジン合成がオロト酸を代謝中間体として経由すると推測された。また、オロト酸の類似体5-フルオロオロト酸(5-FOA)を180

μg/mlの濃度で合成培地に添加すると、90℃において*A. pernix* 野生株の増殖が完全に阻害された。さらに、野生株にUVを照射してpyrEまたはpyrFにナンセンス変異を導入した変異株では5-FOA耐性/ウラシル要求性の表現型が現れることが確認された。以上から、pyrFEを選択遺伝マーカーとして用いて5-FOA耐性/感受性あるいはウラシル要求性の有無によって、pyrFE変異株と野生株を選別できることが示された。

古細菌には既存の抗生物質が効かないこと、さらに抗生物質自体が高温では不安定なものが多いことから、大腸菌や枯草菌に対して使われる薬剤耐性マーカーは超好熱古細菌の遺伝子操作系では利用できない。その問題点を克服するために出芽酵母の遺伝子操作系で汎用されるURA3選択マーカーを模倣して、耐熱性選択遺伝マーカーの開発を試みた。5-FOAは90℃で150時間の加熱後も*A. pernix*野生株の増殖阻害効果を安定に維持しており、pyrFE変異株の正の選択に有効であることが明らかになった。*A. pernix*の自然突然変異率は元々きわめて低いが、pyrFE遺伝子座領域のほとんどを除いたΔpyrFE株(K121)を遺伝子破壊実験の宿主に用いることで、破壊株選択の際に復帰変異等によって生じるバックグラウンドを低く抑えることが可能になると考えられる。

(1-b) 染色体DNAと部分的に相同領域を有する線状DNA断片を古細菌細胞に導入し、相同組み換え能を利用して標的遺伝子をワンステップで破壊する手法を確立した。pyrFEコード領域の大部分を欠失し、相同領域としてpyrFEの5'および3'隣接領域をもつ線状DNA断片をin vitroで作製し、M. HaeIIIメチラーゼでメチル化後、エレクトロポレーションにより*A. pernix*野生株細胞に導入した。90℃の高温でも融解しないGellan Gumプレート培地上で5-FOA耐性となったコロニーを選択した結果、pyrFE欠失株K121(ΔpyrFE)を得た。また、既にゲノム配列情報から機能推定ができていたORFのうち任意に選んだ14個(例えば、recA/RAD51ホモログであるradA[APE0119]など)について、コード領域にpyrFE遺伝子マーカーを挿入したDNA断片をK121(ΔpyrFE)株に導入後、ウラシル不含培地に生育するクローンとして破壊株を分離した。これら各破壊株についてはPCRやサザン分析で遺伝子破壊を確認するとともに表現型の解析も行った。



A. 古細菌における遺伝子導入法の概略。B. 古細菌 *Aeropyrum pernix* における pyrFE オペロンの構造とワンステップ遺伝子破壊実験。灰色の四角の部分は、相同領域として、用いた pyrFE の 5' および 3' 隣接領域。100-1000bp の範囲で相同領域の長さを覚えて破壊株の出現頻度を検討した。C. 野生株と pyrFE 破壊株の表現型の比較。合成培地を用いて 90℃ で増殖を測定した。pyrFE 遺伝子破壊株 (5-FOA 耐性を示す) ではウラシル要求性となっている。

古細菌への遺伝子導入実験については種々の条件を検討したが、いくつかの操作においてこの菌特有の工夫が必要であった。A. pernixは海底熱水噴出口から分離された海洋細菌であるため、グリセロールとショ糖を添加した等張液で浸透圧を保持しながら細胞密度を高めた懸濁液を調製し、エレクトロポレーションに供する必要がある。また導入するDNA断片は、宿主の制限修飾系のバリアを乗り越えるためM.HaeIIIメチラーゼにより予めメチル化したものを使用する必要があった。しかしながら、導入する線状DNA断片両端の相同領域の長さは100bpであっても10⁻⁶から10⁻⁷の組込み頻度で遺伝子破壊株が出現したので、遺伝子破壊が起こった集団を選択培地で集積培養後にクローン化すれば、比較的簡単に破壊株が作製可能であることが明らかになった。

(1-c) 古細菌ゲノム特有のorphan genesのうち、無作為に選んだ約90の遺伝子に対してその破壊を試みた。現在までに67の遺伝子破壊株が作製できた(全ORFの2.6%にあたる)。これらの破壊株について、表現型の評価(増殖温度、低温ショック応答、UV感受性、栄養要求性、増殖基質の資化性、各種阻害剤の影響)を進めている。ΔAPE0461株がUV高感受性であること、さらにはゲノム上に人為的に導入した二本鎖DNA切断(DSB)を修復できないことが明らかになっている。

(2) 古細菌rRNA遺伝子イントロンは「動く」遺伝因子であることを明らかにした。本研究を開始する時点で既に、A. pernix K1の16S-23S rRNA遺伝子領域に3つのイントロンI_α、I_βおよびI_γが存在することが知られていた。そこでこの知見を敷衍し、A. pernix 種内の近縁株(11株)のrRNA遺伝子を解析したところ次のようなイントロン分布がoptionalであり、株間で著しい多様性があることを見いだした。この知見をもとに下の図に示すような可動性イントロンの水平伝播モデルを提案した。

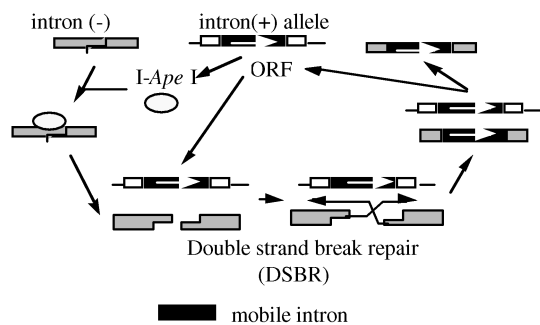


図. 古細菌「動くイントロン」の水平伝播モデル

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究で確立した遺伝子破壊の手法は、真正細菌(大腸菌、枯草菌、あるいは75℃付近で生育する高度好熱菌 Thermus thermophilus など)や真核生物(ヒト、イネ、ショウジョウバエ、線虫、出芽酵母など)とは異なる進化の道筋を辿った古細菌独特の遺伝子機能統御システムを解明するのに有用であり、グローバルな生物進化の視点から生命現象の普遍性と多様性についてのより深い理解が可能になるものと考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初計画では古細菌ゲノム上に存在する可動性イントロンの転移メカニズムを応用してインテグレーションベクターを作製する予定であったがそれは達成できなかった。イントロンの構造を改変して内部に外来DNAを挿入すると多くの場合、スプライシング異常により致死とな

るためである。

〈今後の課題〉

今後、本実験で確立した手法で網羅的に遺伝子破壊を行って表現型を体系的に解析するとともに、必須遺伝子の破壊法や多重変異株の作製法についても研究を進め、多数の遺伝子が関与する生命現象の解析、ひいては遺伝子機能ネットワークの全体像の解明が望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0602100418
Tachibana, A., Y. Yano, S. Otani, N. Nomura, Y. Sako, and M. Taniguchi. Novel prenyltransferase gene encoding farnesylgeranyl diphosphate synthase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*: Molecular evolution with the alteration on product specificity. *European Journal of Biochemistry*, 267(2), 321-328 (2000)
2. 0602100435
Sako, Y., and N. Nomura. Genus II. *Aeropyrum* Sako, Nomura, Uchida, Ishida, Morii, Koga, Hoaki and Maruyama 1996, 1075VP In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition) Volume One, The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, pp.183-184, Springer-Verlag (2001)
3. 0602100425
野村紀通, 左子芳彦. 海洋性超好熱菌: ゲノム研究からその生命像を探る. 月刊海洋No.23号外(特集「海洋微生物」) pp.45-51 (2000)
4. 0403231501
Nomura, N., Morinaga, Y., Kogishi, T., Kim, E., Sako, Y., and Uchida, A. Heterogeneous yet similar introns reside identical positions of the rRNA genes in natural isolates of the archaeon *Aeropyrum pernix*. *Gene* 295(1), 43-50 (2002)