

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18668

研究課題名(和文) 液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の確立とその実践

研究課題名(英文) Development of a culture-independent method for the identification of microbial enzyme-encoding genes using water-in-oil microdroplets and its application

研究代表者

飯塚 怜 (Iizuka, Ryo)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：90541954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の99%以上の微生物は、現在の技術では培養が困難な微生物(難培養性微生物)とされている。難培養性微生物が産生する酵素は、新たな酵素資源として大きな可能性を秘めている。そこで研究代表者は、環境中に豊富に存在する酵素資源への効率的にアクセスする方法として「液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法」を考案した。本研究を通じて、「液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法」を確立し、その実用性・有用性を実証することに成功した。今後、本法の実践・応用により、産業上有用な酵素をコードする遺伝子が多数取得され、それが新たな酵素産業の創出に結実すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Environmental microbes are a great source of industrially valuable enzymes with potent and unique catalytic activities. Unfortunately, the majority of microbes remain unculturable and thus are not accessible by culture-based methods. Then, I envisioned a culture-independent method for the identification of microbial enzyme-encoding genes using water-in-oil microdroplets. In this study, I established the method and demonstrated its practicality and usefulness. This method will facilitate the identification of genes encoding industrially valuable enzymes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：液滴 微生物 酵素 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

現在産業利用されている酵素の大部分は微生物由来であり、産業上有用な酵素は新規の微生物から発見されることが多い。これまで酵素遺伝子の取得は、環境中に生息する微生物群集の中から、標的とする酵素を産生する微生物を単離・培養することから行われてきた（以下この手法を、培養法と呼ぶ）。しかし環境中の 99% 以上の微生物は、現在の技術では培養が困難な微生物（難培養性微生物）とされている。難培養性微生物が産生する酵素は、新たな酵素資源として非常に大きな可能性を秘めているが、培養法ではそれらにアクセスすることができない。近年、培養法に代わる方法として、メタゲノム法が利用され始めている。メタゲノム法は、微生物の分離・培養を行わずに、環境中に存在する微生物群集のゲノムを抽出し、その中から標的とする酵素遺伝子を取得する方法である。この手法は、培養法では得られない新規の酵素遺伝子が取得できるという利点を有している。しかし、多大な時間・労力・コストを要することに加え、それに見合うだけ成果が得られないことが大きな問題となっている。以上より、従来とは異なるアプローチで、酵素遺伝子を取得する手法が必要であると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は、環境中に豊富に存在する酵素資源への効率的なアクセスを実現する手法として、「液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法」を考案した。本法ではまず、環境中の微生物を一細胞単位で Water-in-oil (W/O) 型液滴（油中に分散した水滴）に封入し、標的とする酵素活性を示す微生物をスクリーニングする。次に、活性を示す微生物を回収してその全ゲノムを増幅、得られたゲノム情報を利用して標的酵素遺伝子を取得する。これにより、培養を介することなく、標的の酵素活性を発現する微生物のスクリーニング・回収が可能となり、「難培養性微生物にアクセスできない」という培養法の最大の問題点を解決する。また、取得するゲノムを標的の酵素活性を発現する微生物に限定することで、メタゲノム法よりもはるかに少ない時間・労力・コストで酵素遺伝子の探索が可能となる。本研究では、「液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法」を確立するとともに、この手法を利用して環境中に生息する微生物に由来する新規酵素遺伝子を取得することを目指した。

3. 研究の方法

液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の概要を、**図 1** および以下に示す。

- (1) 十字型流路を有するマイクロ流体デバイスを用いて、標的とする酵素に対する発蛍光性基質（それ自身は無蛍光性であるが、酵素反応の結果、蛍光を発するようになる基質）とともに環境サンプル中の微生物を、W/O 型液滴内に一細胞単位で封入する。
- (2) 標的酵素を発現する微生物が存在すれば、微生物あるいは W/O 型液滴内部が蛍光を放つようになる。
- (3) 蛍光顕微鏡下でマイクロマニピュレータを用い、蛍光性の微生物が封入された W/O 型液滴、あるいは蛍光性の W/O 型液滴を回収する。遠心により W/O 型液滴を破壊し、微生物を回収する。
- (4) 微生物を溶菌させた後、Multiple displacement amplification (MDA) 法により、その全ゲノムを増幅する。
- (5) 次世代シーケンサーを利用してゲノム配列を決定し、標的酵素をコードする遺伝子を取得する。

まず、各工程の要素技術を確立・統合し、液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を確立することに努めた。次に、確立した手法を利用して酵素遺伝子の取得を試みた。

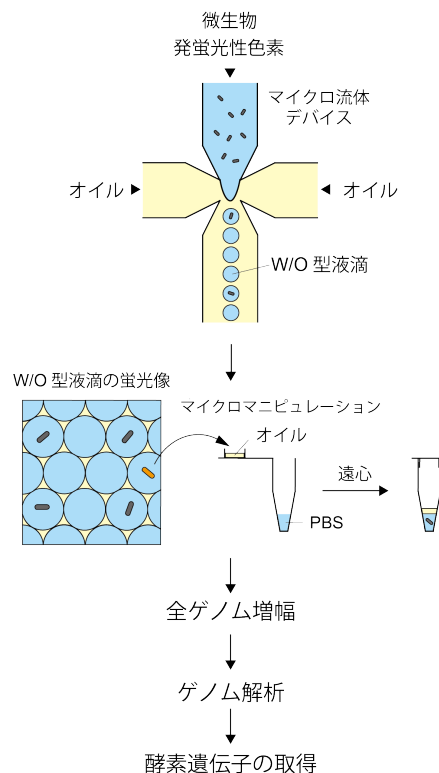


図 1 液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の概要

4. 研究成果

(1) 液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の要素技術の確立

「発蛍光基質を用いて標的とする酵素活性を示す微生物を一細胞単位でスクリーニングする」、「W/O 型液滴から回収した微生物のゲノムを MDA 法により増幅する」などの要素技術を確立・統合し、液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を確立した。

(2) 液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の実践

液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を利用して、海水中の微生物由来 β-グルコシダーゼ (BGL) 遺伝子の取得を試みた。表層および深海の海水を BGL の発蛍光基質 (Fluorescein di-β-D-glucopyranoside) とともに液滴に封入した。蛍光性の微生物 (図 2) を、表層の海水より 4 種、深海の海水より 5 種回収し、そのゲノムを増幅した。このうち 6 種 (表層海水: 2 種, 深海海水: 4 種) のゲノム増幅産物から, small subunit rRNA (16S rRNA) 遺伝子を増幅することに成功した (図 3)。それぞれの配列をもとに分類学的帰属を行ったところ, いずれも海洋性バクテリアに由来すると推定された。またこのうちの 3 種は, これまでに単離されていないバクテリアであると考えられた (表 1)。

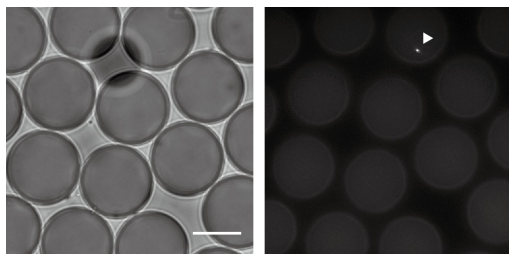


図 2 BGL 活性を示す微生物の検出

左は明視野像, 右は蛍光像。矢頭で示した輝点が BGL 活性を示す微生物。スケールバーは, 20 μm。

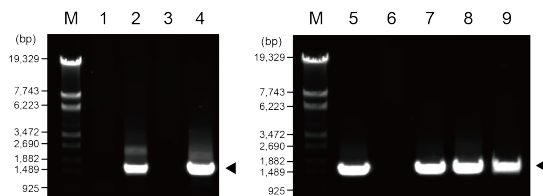


図 3 ゲノム産物を鋳型にした 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

Lane M, 分子量マーカー (*λEcoT141*); lane 1-4, 表層海水から得られたゲノム増幅産物; lane 5-9, 深海海水から得られたゲノム増幅産物。表層海水からは 2 種, 深海海水からは 4 種の 16S rRNA 遺伝子が増幅した。

表 1 16S rRNA 配列に基づく SAG の分類学的帰属

Lane	SAG	Taxonomy	Sequence identity to the closest relatives (%)
2	A	<i>Planctomycetaceae bacterium D2</i>	96
4	B	<i>OM182 bacterium D4</i>	96
5	C	<i>Colwellia</i> sp. D5	99
7	D	<i>Colwellia</i> sp. D7	99
8	E	<i>Colwelliaceae bacterium D8</i>	96
9	F	<i>Flavobacteriaceae bacterium D9</i>	98

分類学的帰属は, SILVA を用いて行った。

6 種類のゲノム増幅産物 (それぞれを SAG_A, SAG_B, SAG_C, SAG_D, SAG_E, SAG_F と呼ぶ) のシーケンス解析を行い, 14 種類の BGL 遺伝子を同定することに成功した (表 2)。このうち 12 種類は既存の BGL 配列との同一性が 52-74% であり, 本手法の利用により新規性の高い遺伝子配列の取得が可能であることが示された。

表 2 BGL 遺伝子産物の特徴

BGL	Origin	Most homologous protein	Identity (%)
BGL1B1	SAG_B	BGL from <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> *	56
BGL3B1	SAG_B	BGL from <i>Caulobacter</i> sp. URHA0033	52
BGL1C1	SAG_C	BGL from <i>Colwellia psychrerythraea</i>	74
BGL3C1	SAG_C	BGL from <i>Pseudoalteromonas rubra</i>	63
BGL3C2	SAG_C	BGL from <i>Colwellia psychrerythraea</i>	67
BGL1D1	SAG_D	BGL from <i>Colwellia psychrerythraea</i>	74
BGL3D1	SAG_D	BGL from <i>Colwellia psychrerythraea</i>	68
BGL1E1	SAG_E	BGL from <i>Colwellia piezophila</i>	70
BGL1E2	SAG_E	BGL from <i>Pseudoalteromonas marina</i>	72
BGL3E1	SAG_E	BGL from <i>Colwellia psychrerythraea</i>	68
BGL3F1	SAG_F	BGL from <i>Polaribacter</i> sp. Hel1_33_49	95
BGL3F2	SAG_F	BGL from <i>Polaribacter</i> sp. Hel1_33_49	99
BGL3F3	SAG_F	BGL from <i>Phaeodactylobacter xiamenensis</i>	63
BGL3F4	SAG_F	BGL from <i>Polaribacter</i> sp. Hel1_33_49	73

相同性解析は、BLASTP を利用して行った。
*Functionally characterized

(3) 液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の深化

難培養性バクテリアである Chloroflexi 門の CL500-11 系統バクテリアは、稀有な酵素遺伝子を多数有しているとされている。そこで Fluorescence in situ hybridization 法により染色した CL500-11 系統バクテリアを、先と同様の方法で回収し、そのゲノム情報から様々な酵素遺伝子を得ることを試みた。その結果、新規性の高い制限・修飾酵素、ペプチダーゼ、非リボソーム型ペプチド合成酵素などの酵素遺伝子の部分配列が見出された。

液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を、高分子分解酵素のように発蛍光性基質が存在しない酵素の探索にも適用できるように、液滴の物性を指標にした酵素活性の検出法を開発した。

本研究を通じて、液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を確立し、その実用性・有用性を実証することに成功した。また、液滴を利用した微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法を深化させ、その適用範囲を拡大させることに成功した。今後、本法の実践・応用により、産業上有用な酵素をコードする遺伝子が多数取得され、それが新たな酵素産業の創出に結実すると考えられる。

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) **Ryo Iizuka**, Takashi Funatsu “Chaperonin GroEL uses asymmetric and symmetric reaction cycles in response to the concentration of non-native substrate proteins” *Biophys. Physicobiol.* **13**, 63–69 (2016) (査読有) DOI: 10.2142/biophysico.13.0_63
- (2) Kazuki Nakamura, **Ryo Iizuka**, Shinro Nishi, Takao Yoshida, Yuji Hatada, Yoshihiro Takaki, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Culture-independent method for identification of microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform” *Sci. Rep.* **6**, 22259 (2016) (査読有) DOI: 10.1038/srep22259

[学会発表](計 22 件)

- (1) 鳴原 永之, **飯塚 怜**, 川久保 渉, 尹 棟 鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 船津 高志 “液滴を利用したバイオマス分解酵素産生微生物の探索法の開発” 第 6 回日本生

物物理学会関東支部会, 早稲田大学先端生命医科学センター(東京都新宿区), 2017 年 3 月 13–14 日(口頭発表)

- (2) **Ryo Iizuka**, Takashi Sakurai, Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “In vitro selection system to generate peptide agonists for G protein-coupled receptors using a water-in-oil microdroplet platform” 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017, 川崎市産業振興会館(神奈川県川崎市), 2017 年 2 月 27–28 日(ポスター発表)
- (3) **飯塚 怜**, 櫻井 貴志, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, 井口 彩香, 尹 棟 鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 船津 高志 “In vitro compartmentalization法を利用した G タンパク質共役型受容体作動性ペプチドリガンドの創出” 第八回光塾, 東京工業大学 すすかけ台キャンパス(神奈川県横浜市), 2016 年 12 月 17–18 日(ポスター発表)
- (4) Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “In vitro selection of novel peptide agonists for human somatostatin receptor subtype-2 using water-in-oil microdroplets” 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016 年 11 月 25–27 日(ポスター発表)
- (5) Takeya Masubuchi, Masayuki Endo, **Ryo Iizuka**, Ayaka Iguchi, Yoon Dong Hyun, Tetsushi Sekiguchi, Hao Qi, Ryosuke Inuma, Yuya Miyazono, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takuya Ueda, Hisashi Tadakuma “A single integrated gene nano-chip functioning in an artificial cell” 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016 年 11 月 25–27 日(ポスター発表)
- (6) Eiji Shigihara, **Ryo Iizuka**, Takashi Sakurai, Yuji Hatada, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Culture-independent identification of genes encoding agarase from environmental bacteria using agarose gel microdroplets” 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016 年 11 月 25–27 日(ポスター発表)
- (7) Takeya Masubuchi, Hisashi Tadakuma, Masayuki Endo, **Ryo Iizuka**, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takashi Funatsu, Takuya Ueda “Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNA hybrid nanomachine” 情報計算法学生物学会(CBI学会)2016年大会, タワーホ

- ール船堀 (東京都江戸川区), 2016年10月25-27日 (ポスター発表)
- (8) T. Sakurai, **R. Iizuka**, Y. Nakamura, J. Ishii, A. Kondo, A. Iguchi, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, T. Funatsu “*IN VITRO* SELECTION OF NOVEL PEPTIDE AGONISTS FOR HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR SUBTYPE-2 USING A WATER-IN-OIL MICRODROPLET PLATFORM” The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), Convention Center Dublin (Dublin, Ireland), 2016年10月9-13日 (ポスター発表)
- (9) **飯塚 怜** “油中水滴を利用した標的微生物のシングルセルゲノミクス” 生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム・研究発表会, 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区), 2016年9月6日 (ポスター発表)
- (10) **飯塚 怜** “マイクロ・ナノ空間を利用した糖質加水分解酵素の探索・機能解析” 第35回日本糖質学会年会, 高知市文化プラザ かるぽーと (高知県高知市), 2016年9月1-3日 (招待講演)
- (11) **飯塚 怜** “マイクロ液滴を利用した標的微生物のシングルセルゲノミクス” 次世代シーケンス解析テクニカルセミナー (第6回 一細胞解析と次世代シーケンス), 株式会社リバナス 知識創業研究センター (東京都新宿区), 2016年7月28日 (招待講演)
- (12) **飯塚 怜** “液滴を利用した標的微生物のシングルセルゲノミクス” 生命機能研究グループセミナー, 海洋研究開発機構 横須賀本部 (神奈川県横須賀市), 2016年6月14日 (招待講演)
- (13) **飯塚 怜**, 櫻井 貴志, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, 井口 彩香, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 船津 高志 “*In vitro* compartmentalization 法を利用した GPCR 作動性ペプチドリガンド創出法の開発” 第13回 GPCR 研究会, 日本科学未来館 未来CANホール (東京都江東区), 2016年5月13-14日 (ポスター発表)
- (14) **Ryo Iizuka**, Takashi Sakurai, Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Directed evolution system to generate peptide agonists for G protein-coupled receptors using water-in-oil droplets” The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences Biomolecule-Based Medicinal Science: Featuring Mid-Size Drugs, Center for Learning and Innovation, 武田薬品研修所 (大阪府吹田市), 2016年1月21-22日 (ポスター発表)
- (15) K. Nakamura, **R. Iizuka**, T. Yoshida, Y. Hatada, Y. Takaki, S. Nishi, A. Iguchi, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, T. Funatsu “CULTURE-INDEPENDENT METHOD FOR SCREENING AND IDENTIFYING MICROBIAL ENZYME-ENCODING GENES USING MICRODROPLET-BASED SINGLE CELL GENOMICS” The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015), Hwabaek International Convention Center (Gyeongju, Korea), 2015年10月25-29日
- (16) **飯塚 怜** “液滴を利用した機能分子創出およびオミックス研究に資する基盤技術開発とその実践” 第59回脳科学セミナー, 埼玉大学工学部 (埼玉県さいたま市), 2015年10月16日 (招待講演)
- (17) Takeya Masubuchi, Hisashi Tadokuma, **Ryo Iizuka**, Masayuki Endo, Takashi Funatsu, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takuya Ueda “Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami” 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市), 2015年9月13-15日 (ポスター発表)
- (18) Kazuki Nakamura, **Ryo Iizuka**, Takao Yoshida, Yuji Hatada, Yoshihiro Takaki, Shinro Nishi, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Culture-independent method for identifying microbial enzyme-encoding genes based on activity-driven single cell genomics” 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市), 2015年9月13-15日 (ポスター発表)
- (19) Kentaro Tahara, **Ryo Iizuka**, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “An attempt to improve the method for directed evolution by *in vitro* compartmentalization” 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市), 2015年9月13-15日 (ポスター発表)
- (20) Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Akihiko Kondo, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Directed evolution system to generate peptide agonists for G protein-coupled receptors using water-in-oil droplets” 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市), 2015年9月13-15日 (ポスター発表)
- (21) **飯塚 怜** “環境中の微生物を培養する

ことなく「見える化」し、酵素遺伝子を取得する方法の開発”第6回「光塾」、広島大学東広島キャンパス（広島県広島市）、2015年9月5-6日（招待講演）

(22) 飯塚 怜, 中村 和貴, 吉田 尊雄, 秦田 勇二, 高木 善弘, 西 真郎, 井口 彩香, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 船津 高志 “シングルセルゲノミクスを利用した微生物酵素遺伝子探索法” NGS現場の会 第四回研究会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2015年7月1-3日(ポスター発表)

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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〕

新聞報道

(1) 「微生物の酵素 培養せずに発見」, 日経産業新聞, 2016年8月26日

テレビ報道

(1) TBS テレビ「未来の起源」, 2016年11月6日

受賞

(1) 2016年度コスモ・バイオ学術論文賞 (Culture-independent method for identification of microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform), 2016年12月14日

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯塚 怜 (IIZUKA, Ryo)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 90541954