

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年6月1日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780081

研究課題名（和文） 微生物センサーを利用した新規スクリーニング法の開発

研究課題名（英文） A new method for high-throughput screening of enzymes using microbial sensor

研究代表者

内山 拓 (UCHIYAMA TAKU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：70450658

研究成果の概要（和文）：PIGEX 法にフローサイトメーターによるソーティングとゲルマイクロドロップ法を組み合わせた、新規スクリーニング法の開発をおこなった。当該手法を用いて、大腸菌を宿主に用いたライブラリーから、任意の酵素活性を発現する陽性クローンをスクリーニングすることに成功した。一方自然環境中の微生物細胞群から、任意細胞をスクリーニングするためには、ある程度集積培養が必要であることを示唆するような結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The study developed a new method for high-throughput screening of enzyme activity in bacteria by combing PIGEX method, flow cytometry and gel micro droplet. The method which allows viable microbial cells to be sorted on the basis of the expressed enzyme activity. The potential of the method was demonstrated by selecting benzoamidase positive cells from an artificial mixture of benzoamidase positive and negative E. coli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：メタゲノム、バイオテクノロジー、微生物センサー、ゲルマイクロドロップ、酵素

1. 研究開始当初の背景

自然界には多様な代謝活性を有した微生物が存在しているが、その大部分は未だ分離・培養されたことがなく、また今後も分離・培養は難しいと考えられている。しかしながらこれら難培養性微生物は、従来得るこ

とのできなかった産業上有用な新規酵素の宝庫であると考えられ、その有効利用法が様々なアプローチにより試みられている。とくに環境中から微生物の分離・培養のステップを経ずに直接 DNA を抽出・ライブラリー化し、これをスクリーニングする方法（メタゲ

ノムライブラリースクリーニング)は、難培養性微生物資源へのアプローチ法として世界的に注目を集めている。従来メタゲノムライブラリーより有用酵素遺伝子を獲得する方法として、遺伝子配列に基づくスクリーニング法や酵素活性に依存したスクリーニング法がおこなわれてきた。これに対して研究提案者は遺伝子の発現に依存して目的酵素のクローニングを試みる方法、SIGEX (Substrate-Induced Gene Expression)法を考案した。この方法は以下の知見に基づいている。すなわち、1. 原核生物の代謝系酵素遺伝子は、その基質や反応生成物などにより誘導的に発現する。そして、2. 原核生物の代謝系酵素遺伝子の多くがオペロンを形成しており、その発現制御因子は代謝系酵素遺伝子の近傍にあることが多い。SIGEX 法では予め、ベクターのクローニングサイト下流にマーカー遺伝子〔蛍光緑色タンパク質 (GFP)〕を配置し、クローン化されたメタゲノム遺伝子断片とマーカー遺伝子があたかも一つのオペロンを構成するようなライブラリーを構築する。そして任意の化合物をライブラリー培養液中に添加し、その結果活性化するオペロンが存在した場合、オペロン下流に位置する GFP が協調的に発現するようになる。SIGEX 法は、GFP の蛍光シグナルを検出することで、添加物の代謝に関わる酵素遺伝子を、酵素活性をスクリーニングすることなく高感度に取得可能である。またフローサイトメーター (FACS) を用いることで、他のスクリーニング系とは比較にならないほど大規模なハイスループット化も容易に実現できる。

研究提案者は本 SIGEX 法により、芳香族化合物により誘導される多様なオペロンを獲得することに成功した。いくつかのクローンには、添加化合物に応答する転写制御因子とともに芳香族化合物の代謝に関わる酵素遺伝子も含まれており、SIGEX 法により新規酵素スクリーニングが可能であることを実証した。一方で SIGEX がターゲットとしているのは実際には代謝系酵素遺伝子そのものではなく、添加化合物に応答する転写制御因子等の遺伝子制御モジュールである。この為、目的とする酵素遺伝子以外にも、薬剤排出ポンプなどがクローン化されてくることがあった。そのため提案者は、SIGEX の利点を生かしつつも、こうした“ノイズ”を軽減する方法を模索した。

提案者は SIGEX 法の基本原理を生かしつつ、これに「酵素活性」をスクリーニングする要素を付加することで、目的酵素を確実に取得する方法を検討した結果、以下に述べる PIGEX (Product Induced Gene Expression) 法を考案した。本研究課題は PIGEX 法の確立と汎用化のための技術開発の方向性を明確にし、実際に産業用酵素スクリーニングへの

応用をおこなうことで、国産の革新的酵素スクリーニング技術を世に送り出すことを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は微生物センサーを用いた新たな酵素スクリーニング法、PIGEX (Product Induced Gene Expression) 法の確立と拡張を目的とした。

以下に PIGEX 法の原理を説明する。はじめに、基質 X には反応しないが、その酵素反応分解生成物である Y に反応し、シグナルを発するセンサー細胞を構築する。並行してライブラリーの構築をおこない、その後ライブラリーとセンサー細胞を共培養する。培養液には予め基質 X を添加する。もし基質 X を分解し Y を生成させる活性を持つクローンが存在すれば、センサー細胞が Y を感知し、結果としてこのような陽性クローンは GFP 蛍光シグナルで同定できる。PIGEX 法とは X から Y の変換活性を求めつつも、検出するのは GFP 蛍光シグナルであり、基質/生成物の分光学的性質や化学的性質に左右されずに簡便にスクリーニングをおこなう方法である。

まとめると、PIGEX 法とは目的の酵素活性による生成物を検知する微生物センサーを用いて、ライブラリーから目的酵素をスクリーニングする方法である。

研究提案者は、この PIGEX 法をフローサイトメーターを利用したスクリーニング法と組み合わせる為、ゲルマイクロドロップ (GMD) のような微小コンパートメント中で PIGEX 法をおこない、当該方法をハイスループットな方法にすることを目標とした。スクリーニングの対象となる集団としては、メタゲノムライブラリー及び環境微生物群を想定した。

3. 研究の方法

PIGEX 法の確立と拡張の為、PIGEX 法に FACS と GMD を組み合わせたハイスループットスクリーニングの系の確立を試みた。はじめにモデル系として、センサー細胞と陽性クローンを準備し、これらを用いて実際に GMD 法、PIGEX 法、フローサイトメーターを組み合わせたハイスループットスクリーニングの系を立ち上げた。モデル系の完成の後、SIGEX 法によりクローン化したセンサー細胞を利用して、今回構築するハイスループット系を用いてメタゲノムライブラリーから任意酵素活性を示す陽性クローンのスクリーニングをおこなった。その後、複合微生物群から任意酵素活性を示す微生物のスクリーニングも当該方法でおこなった。

4. 研究成果

始めに PIGEX 法の系に GMD 法を適応するこ

とを試みた。モデル系として、センサー細胞として安息香酸に反応して GFP を発現させるクローンを用意し、陽性クローンとして安息香酸アミドを安息香酸に変換する活性（アミダーゼ活性）を有するクローンを用意した。これらを安息香酸アミドを含む LB 培地中で混合し、さらに溶解させたアガロースゲル中に混合した。この混合液を孔径 20 μm の多孔質ガラス膜を用いて Water/Oil エマルジョン化し、センサー細胞と陽性クローンを一緒に封じ込めた GMD を作成した。次に GMD 内で細胞を 37°C、14 時間培養し、その後 GMD を蛍光顕微鏡観察した。観察の結果、GMD 内でセンサー細胞が陽性クローンの持つ酵素活性によって生じた安息香酸を検知して GFP を発現しているところが確認された。これらの実験結果から、GMD は PIGEX 法の系に適応可能であることを確認した。

次に FACS を用いて、GFP を発現したセンサー細胞が含まれた GMD を回収することが可能か確認した。センサー細胞と陽性クローンを一緒に封じ込めた GMD を作成し、GMD 内で細胞を 37°C、14 時間培養した。その後 FACS を用いて GFP を発現したセンサー細胞が含まれる GMD の回収を試みた。実験の結果、GFP を発現したセンサー細胞を含む GMD の回収に成功した。しかしながら、GMD 内に細胞を閉じ込めたまま細胞培養をおこなうと、細胞の増殖効率が悪く、ほとんどが死滅してしまうことが明らかとなった。そこで GMD を回収後、アガラーゼ処理をおこなうことにより細胞を GMD 中から取り出す工夫をし、これにより細胞の培養効率を 10 倍以上、上げることに成功した。

次にセンサー細胞に自殺遺伝子を組み込み、センサーとしての役割を終えた後は自己消滅するように遺伝子改変をおこなった。その目的として、センサー細胞をウイルス由来のチミジンキナーゼ (hsvTK) で形質転換させた。このウイルス由来チミジンキナーゼはヌクレオシドアナログの 1 種である dP {6-(beta-D-2-Deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8H-pyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-one} をリン酸化する。リン酸化された dP はアデニン・グアニンの対塩基として DNA 合成の際に取り込まれ、その結果 DNA 変異が蓄積して形質転換体は細胞死に至る。センサー細胞である大腸菌 JM109 を hsvTK で形質転換させ、対数増殖期まで培養した。そして様々な濃度の dP を与えて、細胞死の起きる最少濃度を測定した。その結果、100 μM で 100,000,000 個の hsvTK 発現細胞を 100% 死滅させることができることを確認した。

次にハイスループットスクリーニングの系が作動するか調べた。陽性クローン 1,000,000 個に対し、陰性クローン 10,000,000,000 個、センサー細胞

10,000,000,000 個を準備し、これらを 2 cell/GMD となるように GMD を作製した。GMD 内で細胞を 37°C、14 時間培養し、その後 FACS を用いて GFP を発現したセンサー細胞を含む GMD を回収した。回収した GMD はアガラーゼと 100 μM dP で処理し、その後 LB 寒天培地上に塗布して、陽性クローンがいくつコロニーをつくるか調べた。期待値として 24 個の陽性クローンが得られるような条件で実験をおこなったところ、陽性クローンのコロニーを 5 個得ることに成功した。期待値の 1/5 の結果であったが、陰性クローンやセンサー細胞の混入は全く認められず、開発したスクリーニング法はおおむね期待通りの成果をあげられたと考えた。

次に環境中の微生物の中から、今回開発した方法を用いて任意活性（今回はアミダーゼ活性）をもつ微生物がスクリーニングできるか試みた。センサー細胞として、安息香酸に反応して GFP を発現させるクローンを用意し、また腐葉土から微生物の細胞を回収して、ここからアミダーゼ活性を示す細胞をスクリーニングすることを試みた。センサー細胞 5 cell に対し、微生物細胞 1 cell になるように GMD を作製し、GMD 内で細胞を 37°C、14 時間培養、その後 FACS を用いて GFP を発現したセンサー細胞を含む GMD を回収した。実験の結果、FACS による選別の時点で、GFP を発現したセンサー細胞を含む GMD が全く得られず、その後の操作でも微生物のコロニーを全く得ることができなかった。この実験結果は、アミダーゼ活性を持つ微生物が腐葉土という環境中には全くいないか、いたとしてもごく少量であったために、ハイスループットなスクリーニングである当該手法でも、目的の酵素活性を示す微生物細胞をスクリーニングできなかったのではないかと考えた。目的のアミダーゼ活性を保持する微生物を増加させるため、ある程度集積培養が必要になると結論づけた。

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 内山拓、メタゲノムからの未知遺伝子スクリーニング法、土と微生物、査読無、Vol. 65, 2011, pp. 73-77.
- ② 内山拓、宮崎健太郎、Product induced gene expression, a product responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme encoding genes. Applied and Environmental Microbiology、査読有、

[学会発表] (計6件)

- ① 内山拓、宮崎健太郎、PIGEX法のハイスループット化の検討、第63回日本生物工学会大会、2011.09.27、東京
- ② 内山拓、宮崎健太郎、PIGEX法のさらなるハイスループット化の検討、日本農芸化学会2011年度大会、2011.03.28、京都
- ③ 内山拓、メタゲノムからの有用遺伝子取得法の開発、LS-BT合同研究発表会、2011.02.01、つくば
- ④ 内山拓、メタゲノムからの未利用遺伝子資源の探索、第5回産業用酵素シンポジウム、2010.11.06、長浜
- ⑤ 内山拓、宮崎健太郎、PIGEX (Product Induced Gene Expression) : 微生物センサーを利用した酵素遺伝子スクリーニング法の開発、第62回日本生物工学会大会、2010.10.28、宮崎
- ⑥ 内山拓、メタゲノムを活用した有用酵素の開発、平成22年度産学官連携推進会議、2010.06.05、京都

[図書] (計2件)

- ① 内山拓、宮崎健太郎、Springer, Metagenomics; Methods in Molecular Biology, Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening; a method for high-throughput screening of metagenome libraries. Vol. 668, 2010, pp.153-168.
- ② 内山拓、シーエムシー出版、難培養微生物研究の最新技術IIーゲノム解析を中心とした最前線と将来展望ー、SIGEX : メタゲノムからのハイスループットな代謝系遺伝子スクリーニング法、2010, pp. 61-70

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 拓 (UCHIYAMA TAKU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号 : 70450658