

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19880040
研究課題名（和文） メタゲノムライブラリーを利用した未知遺伝子スクリーニング法の開発
研究課題名（英文） Development of a new metagenomic library screening method
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・生物機能工学研究部門・研究員
研究者番号：70450658

研究成果の概要：

本研究は、メタゲノムライブラリーのハイスループットなスクリーニング系である SIGEX (Substrate Induced Gene Expression)法に用いる為の宿主を、大腸菌以外に拡張する事を目的として行い、大腸菌及び古草菌で使用可能なシャトルベクターの構築に成功した。また SIGEX 法で得られる陽性クローンをレポーターシステムとして利用する新規の酵素活性スクリーニング法、PIGEX (Product Induced Gene Expression)法の開発も併せて行い、当該法を用いて新規な安息香酸アミダーゼをメタゲノムライブラリーからスクリーニングする事に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,660,000	399,000	3,059,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：メタゲノム、メタゲノムライブラリー、スクリーニング法、SIGEX

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

自然環境中には多様な代謝活性を有した様々な微生物が存在しているが、その大部分は未だ分離・培養されておらず、また今後も分離・培養は難しいと考えられる。しかしながら、これら難培養微生物は、従来得る事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、その有効利用法が種々のアプローチにより試みられている。とくに環境から直接 DNA を抽出・ライブラリー化し、スクリーニングするようなメタゲノムを使用した手法は、分離・培養のステップを経ずに新規有用酵素遺伝子を獲得する方法として近年注目を集め続けている (Ferrer, M., Martinez-Abarca, F., and Golyshin, P. N. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol. 16, 588-593, 2005)。これに対し申請者は遺伝子の発現に依存した新しい代謝酵素遺伝子スクリーニング法である SIGEX (Substrate Induced Gene Expression) 法を考案した (Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., and Watanabe, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat. Biotechnol.* Vol. 23, 88-93, 2005)。この方法は以下の知見に基づいている。すなわち、原核生物の持つ多くの代謝系酵素は、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、原核生物の代謝系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 法ではスクリーニング対象となるメタゲノム遺伝子断片とマーカー遺伝子 (ここでは GFP; Green fluorescence protein を利用した) が一つのオペロンを構成するようにオペロントラップベクターを構築し、誘導基質でオペロンの発現を誘導した際に GFP が協調的に発現するように構築する。これによりメタゲノム由来インサートの酵素活性ではなく、GFP の蛍光シグナルをモニターする事で誘導基質に応答し、発現する遺伝子群を補足する。特に GFP の蛍光を利用する事で、フローサイトメーターを使用したハイスループットスクリーニングを行う事ができる事も、大きな特徴である。申請者は本 SIGEX 法により、芳香族化合物で誘導される多種多様なオペロンを獲得する事に成功した。一方、クローン化されたインサートの由来となる微生物種を、国立遺伝研の阿部らの開発した SOM 解析により推定すると、γプロテオバクテリア綱の遺伝子に偏って補足されている傾向が認められた。この現象は、我々の遺伝子補足システムに由来すると考えられた。すなわち、メタゲノム由来インサ

ートの発現が宿主内で誘導されるか否かは、ライブラリーの宿主である大腸菌の転写システムとの相性に大きく依存し、その為同綱である γプロテオバクテリア綱の遺伝子が優先的に選択されやすい傾向に有るのではないかと結論づけた。

2. 研究の目的

そこで今回申請者は、SIGEX の原理を活かしつつ、より多様な微生物種から遺伝子を取得するため、本研究において宿主範囲の拡張を試みる事とした。新たな宿主の候補として様々な微生物が考えられたが、産業有用微生物であり、またモデル生物としても研究が盛んな枯草菌を利用する系の構築を試みる事とした。この微生物は大腸菌とは異なる微生物系統群に属しており、またその遺伝子操作系 (宿主・ベクター系) も確立されている。また遺伝子組換え実験指針における認定宿主でもある。本研究では、SIGEX 法に用いる宿主を大腸菌以外にも拡張し、メタゲノムクローンから得られる微生物遺伝子資源の多様性拡大を目的とする。

また SIGEX 法で得られる特定基質で GFP の発現が誘導される陽性クローンを、レポーターシステムとして利用し、メタゲノムライブラリーからハイスループットに目的の酵素活性を保持する陽性クローンのスクリーニングをおこなう方法の開発も併せて試みる事とした。この様なスクリーニング法を開発する事により、SIGEX 法で得られてくる陽性クローンを有効活用し、当該方法の有効性を補完するのが目的である。

3. 研究の方法

モデル生物として研究が盛んな古草菌と大腸菌のそれぞれで使用可能なメタゲノムライブラリー構築用シャトルベクターの構築を行った。またシャトルベクターが SIGEX 法で使用可能なオペロントラップベクターとなるように構築を行った。シャトルベクターは市販の pHT01 を基に、*gfp* 遺伝子、マルチクローニングサイトを導入する事によって構築を試みた。オペロントラップシャトルベクターの構築後は、特定の環境中からメタゲノムを抽出し、これと当該ベクターを用いてメタゲノムライブラリーを構築する。メタゲノムライブラリー構築の際は、始めに大腸菌で構築し、これを枯草菌に移す事で異宿主間で同じライブラリー構築を構築する。このようなメタゲノムライブラリーが構築できれば、それぞれのライブラリーに同じ誘導基質を与えて SIGEX を行い、得られる陽性クローンの遺伝子資源に変化が生じるか否かを確認する事によって、ライブラリー構築の宿主を変える事の意義が確認できると考え

られた。

新規な酵素活性スクリーニング法の開発では、SIGEX 法で得られた陽性クローンをレポーターとして利用する PIGEX (Product Induced Gene Expression)法の開発を試みる。申請者は SIGEX 法を用いて、安息香酸・キシレン・ナフタレンを誘導基質として GFP の発現が誘導される陽性クローンのクローン化に成功している。これらの陽性クローンをレポーターシステムとして利用する事で、メタゲノムライブラリーからの新規の酵素活性スクリーニング法の開発を試みる。今回は、安息香酸誘導型クローンをを用いて、安息香酸アミダーゼ活性を保持するクローンのスクリーニングを試みた。

4. 研究成果

大腸菌と枯草菌両方の宿主で使用可能な SIGEX 用オペロントラップシャトルベクターの、pHT01GFP の構築に成功した。また当該ベクターと、温泉由来メタゲノムを用いたメタゲノムライブラリーの構築に成功した。このメタゲノムライブラリーは、大腸菌と枯草菌の異宿主間で同じライブラリーの構築に成功している。これらのメタゲノムライブラリーへ様々な誘導基質を与え、SIGEX を行うところまで研究は進捗した。

また SIGEX 法を拡張する目的で、当該法を用いて得られる陽性クローンをレポーターシステムとして利用する PIGEX 法の開発にも成功した。PIGEX 法とはレポーターシステムを用いて、クローンライブラリーから目的の酵素活性を保持する陽性クローンのスクリーニングを行う方法である。今回は SIGEX 法で得られた安息香酸に反応するクローンをレポーターとして利用し、メタゲノムライブラリーから安息香酸アミダーゼ活性を保持する陽性クローンのスクリーニングを試みた。スクリーニングの対象としたメタゲノムライブラリーは、芳香族化合物分解活性汚泥から抽出したメタゲノムと、フォスミドベクターを用いて作製されたものを使用した。その結果、96000個の独立したクローンからなるメタゲノムライブラリー中に、少なくとも104個の陽性クローンが存在している事を明らかにした。そして最終的にここから4つの新規な安息香酸アミダーゼ遺伝子のクローン化に成功し、これらが個々に特徴的な基質特異性を保持している事を明らかにする事に成功した。この成果は、PIGEX 法が目的酵素のハイスループットなスクリーニング系として使用可能である事を示唆しており、また SIGEX 法によって得た陽性クローンをレポーターシステムとして利用する様なスクリーニング系を構築する事によって、SIGEX 法の補完を行う事に成功した。

今後の展望としては、大腸菌と枯草菌両方の宿主で使用可能な SIGEX 用オペロントラップシャトルベクター、pHT01GFP を用いて作製した、異宿主メタゲノムライブラリーから得られる遺伝子資源の相違を確認する研究を進める必要が有る。また、PIGEX 法に関しては、あらたなレポーターシステムを構築して、産業上有用な酵素遺伝子(例えばセルラーゼ等)のクローン化を試みて行きたい。

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、宮崎健太郎、メタゲノムを利用した新規酵素のスクリーニング、バイオサイエンスとバイオインダストリー、66巻、234-239、2008年、査読なし
- ② 内山拓、渡邊一哉、Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries, Nat. Protoc., Vol. 3, 1202-1212, 2008, 査読あり

[学会発表] (計 7件)

- ① 内山拓、他、微生物センサーを利用した酵素開発スクリーニング法の開発、日本農芸化学会2009年度大会、2009/3/28、福岡
- ② 内山拓、他、微生物センサーを利用した酵素活性スクリーニング法の開発、平成20年度ライフサイエンス分野合同会議、2009/1/29、つくば市
- ③ 内山拓、他、メタゲノムからの有用遺伝子の探索、農業環境技術研究所公開セミナー「農業分野におけるメタゲノム解析技術の応用の可能性」、2008/12/17、つくば市
- ④ 内山拓、他、The SIGEX scheme: High throughput screening of metagenomes for isolation of novel catabolic genes, ISSM サテライトシンポジウム、2008/11/15、Tokyo
- ⑤ 内山拓、他、PIGEX: A fluorescence-based novel activity-independent screening technology for enzymes, The 12th International Symposium on Microbial Ecology, 2008/8/19, Australia
- ⑥ 内山拓、他、メタゲノムスクリーニングを指向した宿主・ベクター系の開発、日本農芸化学会2008年度大会、2008/3/28、名古屋
- ⑦ 内山拓、他、メタゲノムからの未知有用遺伝子スクリーニング法の開発、第2回日本ゲノム微生物学会年会、2008/3/6、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：酵素遺伝子スクリーニング法

発明者：内山拓、宮崎健太郎

権利者：同上

種類：特許権

番号：2008-200172

出願年月日：2008/8/1

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ情報

<http://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/index.html>

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・生物機能

工学研究部門・研究員

研究者番号：70450658

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者