

メタゲノムからの新規遺伝子探索

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者	森本, 晶 藤井, 毅
巻/号	65巻1号
掲載ページ	p. 66-72
発行年月	2011年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



メタゲノムからの新規遺伝子探索
— PCR を用いた様々なアプローチ —森本 晶^{1*}・藤井 毅²¹東北農業研究センター, 〒960-2156 福島県福島市荒井原宿南50²農業環境技術研究所, 〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

Exploring novel genes from metagenomes: Various approaches relying on PCR

Sho Morimoto^{1*} and Takeshi Fujii²¹National Agricultural Research Center for Tohoku Region, 50 Harajukuminami,
Arai, Fukushima city, Fukushima 960-2156, Japan²National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3 Kamondai,
Tsukuba city, Ibaraki 305-8604, Japan

Key words : PCR, metagenome walking, PCR - DGGE

1. はじめに

人類は様々な微生物の機能を医薬や産業上有用な酵素の生産、廃棄物処理、エネルギー生産等に利用している。従来、そうした有用な機能を持った微生物の探索には培養技術が中心的な役割を果たしてきた。しかし、環境中に生息する微生物のうち一般的な培養技術で扱えるものはほんの一部に過ぎない¹⁾。例えば、直接検鏡法では1gの土壌から 10^{10} もの原核生物が見出されるが、そのうち一般的な培養法で検出されるのは1%にも満たないことが知られている³⁶⁾。これは培養技術のみに依存しては、環境中に存在する微生物資源の大部分を見逃してしまうことを意味する。

1990年代半ばから、こうした培養技術の限界を乗り越えるために、環境試料から直接抽出したDNAを分子生物学的手法で解析する研究が盛んに行われるようになった。環境試料由来のDNA (eDNA, environmental DNA) は、そこに生息する多種多様な生物のゲノムの集合体であり、一般に「メタゲノム」と呼ばれる⁸⁾。当初、土壌のように核酸が吸着されやすく多量の夾雑物を含む試料については、DNAの抽出そのものが困難であったが、技術の進歩によってそうした抽出操作に伴うハードルはかなり低くなった。現在では試料のタイプ毎に最適化されたキットも市販されており、誰もが比較的容易にメタゲノムを手に行うことができる。メタゲノムを用いるアプローチは、我々を培養に伴う制約から解放し、環境中の微生物資源にアクセスする扉を大きく開いた。その結果、これまでに土壌、活性汚泥、海水等の様々な環境試料から新規性を持った酵素や抗生物質をコードする遺伝子が取得されており、こうした報告例は現

在も増え続けている^{30,37)}。

メタゲノムから有用遺伝子をスクリーニングする方法は、酵素活性に基づく方法と配列情報に基づく方法に大別される。それぞれの方法に長所・短所があるが、本稿では特に配列情報に基づくメタゲノムスクリーニング法に焦点を当てていく。配列情報に基づくメタゲノムスクリーニングでは、主に、酵素遺伝子の保存領域を認識するプライマーによるPCRが用いられる。こうしたPCRは、特定のグループの酵素遺伝子を簡便且つ効率的に探索するうえで非常に有効であるが、プライマーを設計できる部位が保存領域に限られるため、完全長の酵素遺伝子を得にくいという弱点があった。近年、この弱点を克服するための様々な方策が提案されており、本稿では具体的な研究例を通じて個々の手法の特徴を解説していく。また、微生物群集の解析法として広く用いられているPCR-DGGE法²¹⁾を、新たにメタゲノムスクリーニングに応用した筆者らの最近の研究²¹⁾についても紹介する。

2. 主なメタゲノムスクリーニング法

上述したように、メタゲノムから有用遺伝子をスクリーニングする手法には主に2つのタイプがある(表1)。ここではまず、それぞれのタイプのメタゲノムスクリーニング法について概説する。

1) 酵素活性に基づくスクリーニング法

酵素活性に基づくスクリーニング法では、適当なサイズに断片化したメタゲノムを、大腸菌などの宿主細胞に導入してライブラリを構築する。続いて、導入された遺伝子によって目的の酵素活性を示したクローンがスクリーニングされる。この方法の最大の利点は、得られたポジティブクローンは標的機能を発現するために必要な遺伝子全体を含んでいるという点である。また、全く新規の構造を持った酵素

表1 メタゲノムスクリーニング法の大別

タイプ	中心となる技術	主な特徴
酵素活性に基づく手法	・メタゲノムライブラリの構築 &活性スクリーニング	○目的酵素遺伝子の全長を得ることが可能 ○全く新規の構造を持つ酵素が得られる可能性がある ✓膨大な数のクローンを検定する必要があるため、高効率のスクリーニング系が必須 ✓導入遺伝子が宿主細胞中で期待通り機能を発現するとは限らない
配列情報に基づく手法	・PCR ・ハイブリダイゼーション ・シーケンシング	○特定のグループの酵素遺伝子を効率よくスクリーニングできる ○宿主細胞中での発現可否に左右されない ✓既知遺伝子に似通ったものしかとれない ✓完全長の遺伝子を得にくい

の遺伝子を取得できる可能性を秘めていることも大きな魅力の一つである。実際、これまでもこのスクリーニング法によって様々な新規の有用遺伝子がメタゲノムから発見されている⁴⁾。

この手法を適用するためには、目的とする酵素活性を検定するための効率的なスクリーニング系の確立が必須である。通常、メタゲノムライブラリから目的とするクローンを得るためには、数千～数十万ものクローンをスクリーニングしなければならない³⁷⁾。それゆえ、このタイプのメタゲノムスクリーニングでは、平板培地上で容易に判定できる形質（例えば基質の利用に伴う発色やハローの形成等）がターゲットにされることが多い。また、薬剤耐性遺伝子のように特定条件下の生存に必須の遺伝子を標的とする場合には、標的遺伝子の導入によって機能が付与されたクローンだけが生育する選択培地を利用できるため、より効率的なスクリーニングが可能になる。

酵素活性に基づくメタゲノムスクリーニングにおける最大の難点は、宿主細胞中での遺伝子発現に伴う問題である。多くの場合、メタゲノムライブラリの宿主には大腸菌が用いられるが、メタゲノムに含まれる遺伝子の由来は多種多様であり、それらは大腸菌の転写・翻訳系に適合したものとは限らない。Gabor *et al.* (2004) の報告によると、大腸菌に異種微生物の遺伝子をランダムクローニングした場合、酵素活性を発現し得るのは40%程度と推定されている⁷⁾。これは、有用な遺伝子を含んでいても、活性を示さないために見逃されてしまうクローンが多数あることを意味する。この問題の解決策の一つは、活性スクリーニングに用いる宿主微生物のバリエーションを増やすことであり、これまでに *Streptomyces lividans*³⁹⁾, *Rhizobium leguminosarum*¹⁷⁾, *Pseudomonas putida*²⁸⁾ などの利用例がある。

2) 配列情報に基づくスクリーニング法

配列情報に基づくスクリーニングは、メタゲノムそのものあるいはメタゲノムライブラリーを鋳型とするPCRやコロニーハイブリダイゼーションによって行われる。ここで使用するプライマーやプローブは、特定のファミリーの酵素遺伝子に共通に保存されている領域から設計される。すなわち、そうした既知の情報が全くない酵素遺伝子に対してはこの手法は適用できない。また、既知の配列との相同性に基づいたスクリーニングである以上、得られる酵素遺伝子はある程度似通ったものに限られる。従って、このアプローチは、全く新規の遺伝子を探索するというよりも、

構造や機能に関する知見がある程度蓄積している酵素のバリエーションを効率よく増やす方法として有用である。また、前述した酵素活性に基づくスクリーニングに伴う宿主中での発現の問題を回避できるという点も、この方法の大きな利点である。このように、これら2つの手法は相互補完的な性格を持っており、目的に応じて使い分けられるべきものである。

PCRはその適用の容易さから、配列情報に基づくメタゲノムスクリーニングにおいて多用されている。特にメタゲノムを直接鋳型とするPCRは、最も省力的なメタゲノムスクリーニング法と言えるだろう。しかし、一般に保存配列から設計したプライマーで増幅される産物は、目的とする酵素遺伝子の部分断片であるため、そのままでは機能させることができない。この問題の解決がPCRによるメタゲノムスクリーニングを効果的に活用するための重要なポイントである。本稿では特にこの点に焦点を絞り、これまでに報告されている有効な方策を紹介していく。

3. PCRによるメタゲノムからの完全長遺伝子取得

メタゲノムから得られたPCR産物を元にして、完全長の酵素遺伝子を得る方法には、主に4つのアプローチがある(図1)。以下、事例を交えながら各アプローチの原理と特徴について述べる。

A. キメラ酵素の作出

このアプローチの原理は、メタゲノムから増幅した遺伝子の部分配列を既知の遺伝子と融合して、機能を持ったキメラ酵素を作出するというものである。他のアプローチが遺伝子全長をメタゲノムに求めるのに対し、ここでは酵素活性や基質特異性に関わる重要な部位のみをメタゲノムに依存し、既存の酵素の改変を図ることが目的になる。

Okuta *et al.* (1998) は、フェノールおよび原油の分解菌集積培養系から抽出したDNAを鋳型とし、カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ(C230)のコア領域をコードする遺伝子断片をPCRで増幅した。続いて、カセットPCRと呼ばれる手法を用いてこの産物を既知のC230遺伝子(*nahH*)の5'末端および3'末端と結合し、完全長のC230遺伝子を構築した。さらに、得られた完全長C230遺伝子が大腸菌にクローニングしてC230活性を調べ、90%のクローンがC230活性を示すことを確認している。この中には、元の既知C230よりも耐熱性が増したり基質特異性が変化し

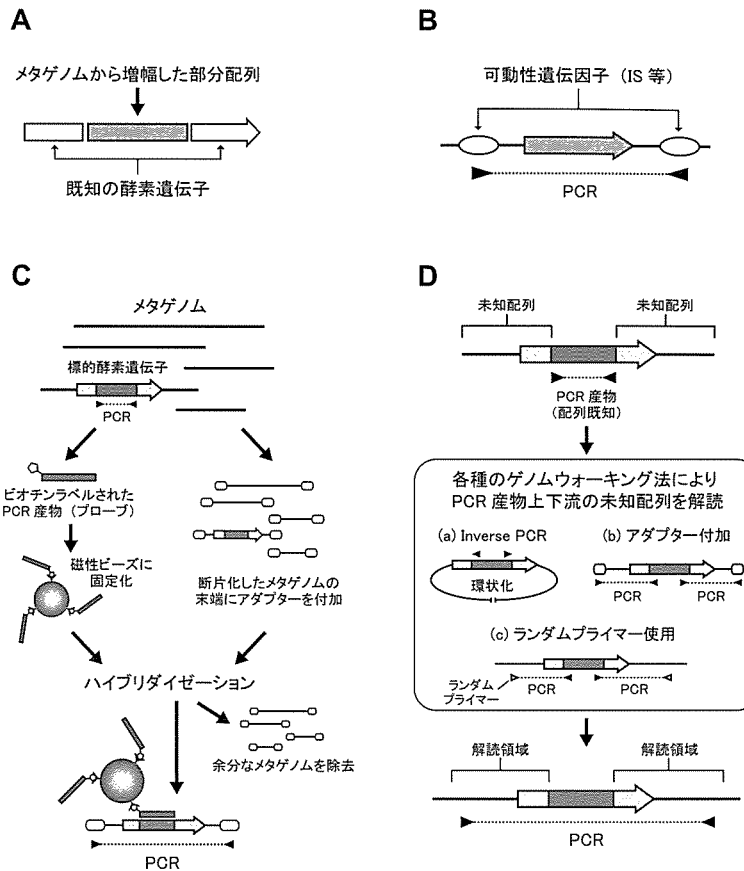


図 1 完全長酵素遺伝子を得るための 4 つのアプローチの概念図
A. キメラ酵素の作出 B. 可動性遺伝因子を標的とする方法
C. サブトラクティブハイブリダイゼーション D. メタゲノムウォーキング
図中のボックス矢印は酵素遺伝子の ORF, 黒三角は既知配列に基づく特異プライマーを表す。なお、図中では略しているが各 PCR には nested PCR が用いられる場合が多い。

たものが含まれており、このアプローチがメタゲノムから新たな性質をもった酵素を創製する手段として有効であることが実証された²⁷⁾。

Kubota *et al.* (2005) は、同じくカセット PCR を用い、石油汚染土壌等のメタゲノムから増幅したシトクロム P450 (CYP153 ファミリー) 遺伝子のコア領域を、*Alcanivorax borkumensis* SK2 株由来の同遺伝子両末端と融合してキメラ酵素を作出した。得られた 16 個のキメラ酵素を大腸菌で発現させたところ、半数に P450 活性が認められた。この際、SK2 株の遺伝子と系統的に近いコア領域を融合した場合ほど強い活性を示す傾向があり、逆に活性がみられなかったものの大半は系統的に遠いものであった¹⁵⁾。これは、互いにある程度親和性を持ったものでなければキメラ蛋白がうまく機能しない可能性が高いということを示唆しており、これがこのアプローチの一つの弱点とも言えるだろう。

石野らのグループは^{10,18)}、温泉土壌メタゲノムから DNA ポリメラーゼのコア領域を増幅し、キメラ DNA ポリメラーゼを作出した。彼らはカセット PCR ではなく、既知の DNA ポリメラーゼ遺伝子を組み込んだ発現ベクターから、そのコア領域を切出してメタゲノムから増幅した産物と置き換えるという方法をとった。この例においても、

ベースに用いた *Taq* DNA ポリメラーゼより優れた伸長性を示すキメラ酵素が取得されており、メタゲノムを材料にしてキメラを構築するアプローチは、様々な酵素の分子育種に適用できると考えられる。

B. 可動性遺伝因子を標的とする方法

他のアプローチが、標的とする酵素遺伝子そのものをターゲットとするのに対し、この方法は可動性遺伝因子を標的とする PCR によって、そこに挟み込まれている遺伝子の回収を狙うものである。その原理は、薬剤耐性遺伝子や化学物質の分解酵素遺伝子等の様々な機能遺伝子が、トランスポゾンやインテグロンといった可動性遺伝因子を伴っているという多くの知見に基づいている。この手法の最大の利点は、既知の配列情報が無い遺伝子についてもその全長を回収することができるという点である。

このアプローチを最初にメタゲノムスクリーニングに適用したのは、Stokes *et al.* (2001) である。彼らは、インテグロンのジーンカセット構造に保存されている 59 塩基対エレメント (59-be) を標的としたプライマーを用い、土壌、底泥、海水などの様々な環境試料のメタゲノムについて PCR を行った (ジーンカセット PCR)。その結果、59-be に挟まれた構造をもつ多数のジーンカセットが取得され、それらには様々な遺伝子の ORF が含まれていた。そ

の中には、フォスフォトランスフェラーゼ、DNA グリコシラーゼ、RNA メチルトランスフェラーゼなど様々な酵素の遺伝子が見出されたが、多くの ORF は既知配列に対する相溶性が低い未知の遺伝子であった³¹⁾。彼らの研究は、インテグロンに支配された多様な遺伝子が環境中に存在していることを明らかにするとともに、そうした遺伝子資源にアクセスする手段としてジーンカセット PCR が有効であることを示した。

可動性遺伝因子の最も基本的な構造である挿入配列 (IS) を標的とした例も報告されている。Fuchu *et al.* (2008) は、既知の γ -HCH 分解酵素遺伝子群 (*lin*) がしばしば IS6100 に近接して見出されることに基づき、IS6100 を標的とする nested PCR によってこれらの遺伝子を取得することを試みた⁶⁾。その結果、 γ -HCH 汚染土壌のメタゲノムからサイズの異なる 4 種類の増幅産物が得られ、それらはいずれも 2 コピーの IS6100 に挟まれた複合トランスポソンの構造をとっていた。さらに、このうちの 3 つにはそれぞれ *linRED*, *linF* (部分配列), *linB* が含まれており、狙い通り *lin* 遺伝子群を取得することに成功した。これまでに、IS6100 は *lin* 以外にも様々な遺伝子に付随して見ついているため、この手法で得られる遺伝子は *lin* だけとは限らない。それでも高い確率で *lin* を得ることができた一因として、彼らは汚染土壌由来のメタゲノムを材料にしたことを挙げている。前述の Stokes *et al.*³¹⁾ の例からも明らかなように、可動性遺伝因子を標的とする PCR では原理上何が取れてくるかわからない。従って、目的とする酵素遺伝子が明確な場合には、Fuchu *et al.*⁶⁾ のようにターゲットがある程度集積されているメタゲノムを鋳型とするのが良策と考えられる。

C. サブトラクティブハイブリダイゼーション

この手法は、PCR 産物をプローブとして用い、メタゲノムから標的遺伝子の全長を回収するというものである。この手法の原理は、Jacobsen (1995) により報告された Magnetic Capture - Hybridization PCR (MCH-PCR) に基づいている。MCH-PCR は、元々は土壌 DNA に夾雑する腐植酸等の除去と微量の標的遺伝子を高感度に検出することを目的として開発された手法である¹¹⁾。Meyer *et al.* (2007) は、これを改変してメタゲノムから完全長遺伝子を取得するための手段として用いた²⁰⁾。以下、その手順を簡単に述べる。まず、PCR でメタゲノムから標的遺伝子の部分配列を増幅し、その片方の DNA 鎖をビオチンラベルしてプローブを作成する。これをストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズの表面に結合させる。一方、メタゲノムは予め適当なサイズに断片化して両末端にアダプター配列を付加しておく。この両者を混合してハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な配列をもつメタゲノム断片を選択的にトラップする。さらに、アダプター配列を認識するプライマーで PCR を行い、トラップされた遺伝子プールから標的遺伝子の全長を回収する。以上の一連の手順については、Meiring *et al.* (2010) による方法書に詳しく解説されている¹⁹⁾。

この手法では、異なるプローブを同時に使用することで、複数の遺伝子を一度にスクリーニングすることができる。

また、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを加減してやることで、プローブに一定の相溶性を持つ遺伝子を網羅的に回収するというのも可能だろう。そうした柔軟性がこのアプローチの一つの利点といえる。

D. メタゲノムウォーキング

PCR によってメタゲノムから完全長の遺伝子を取得する手段として、現在最も利用されているのがこの方法である。このアプローチは、標的遺伝子の部分配列に隣接する未知領域をゲノムウォーキングによって回収し、遺伝子全長を得ようとするものである。ゲノムウォーキング自体は、従来から単一ゲノムの遺伝子解析に用いられてきた技術であるが、複雑な組成をもつメタゲノムに対しては十分な特異性や感度を得ることが困難とされてきた。しかし、近年の技術的な進歩によってそうした難点が克服されつつあり、この数年メタゲノムへの適用が急速に進んでいる。ゲノムウォーキングには、Inverse PCR²⁶⁾ を用いる方法、アダプター配列を用いる方法^{2, 23)}、ランダムプライマーを用いる方法²⁹⁾ などいくつかの方法があり、それぞれについてメタゲノムへの適用例がある。

(a) Inverse PCR を用いる方法

Uchiyama and Watanabe (2006) は、Inverse PCR をベースにしたメタゲノムウォーキング法、IAN-PCR (Inverse Affinity Nested PCR) を開発した³⁸⁾。Inverse PCR は、制限酵素で断片化したゲノム DNA をセルフライゲーションによって環状化し、そこに含まれる既知領域から外向きに設計したプライマーセットで隣接領域を増幅する方法である。一般に、通常の Inverse PCR ではメタゲノム中のごくわずかな標的遺伝子を増幅することは難しい。そこで彼らは、ビオチンラベルした Inverse PCR 産物をストレプトアビジン被覆磁性ビーズで精製し、バックグラウンドとなる余分なメタゲノムを除去した後に nested PCR を行うという工夫を施した。この工夫により、通常の Inverse PCR と比べて検出感度が約 1 万倍向上し、実際にこの方法を用いて地下水メタゲノムから完全長のキチナーゼ遺伝子を得ることに成功した。

別の方法で Inverse PCR の検出感度を高めた例もある。Yamada *et al.* (2008) は、Phi29 DNA ポリメラーゼでメタゲノム中の標的遺伝子を予め選択的に増幅した後に Inverse PCR を行う PAI-PCR (Pre-Amplified Inverse PCR) 法を開発した⁴¹⁾。彼らは Phi29 DNA ポリメラーゼによる Rolling Cycle Amplification (RCA) の際に、Locked Nucleic Acid (LNA) を含むプライマーを使用した。LNA は DNA のアナログであり、フラノース環の化学的な固定によって相補核酸に対する結合力が高められている。よって、LNA を含むプライマーには、RCA の特異性と増幅効率を向上する作用がある。彼らはこの方法を用いて、ウマおよびシロアリ消化管由来のメタゲノムから新規のキシラーゼ遺伝子を取得した。さらに、Terahara *et al.* (2010) は、PAI-PCR で複数のメタゲノムからエステラーゼ遺伝子を取得して大腸菌内で発現させ、様々な特性を持ったエステラーゼを得ることに成功している³⁴⁾。

(b) アダプター配列を付加する方法

アダプター配列を用いるゲノムウォーキング PCR は、メタゲノムウォーキングにも度々利用されている方法である。これは、制限酵素消化したゲノム断片にアダプター配列を付加し、この配列を認識するプライマーと、標的遺伝子の既知領域を認識するプライマーとで nested PCR を行う方法である。この原理に基づく方法には多くのバリエーションがあり、特異性向上のための様々な工夫が考案されている。その詳細については Kotik (2009) の総説を参照されたい。

これまでにこのタイプのウォーキング法でメタゲノムから完全長の酵素遺伝子を取得した例としては、Bell *et al.* (2002) によるリパーゼ (オイルパーコレクター由来)、Sunna and Bergquist (2003) による耐熱性キシラナーゼ (温泉由来)、Jiang *et al.* (2006) によるリパーゼ (土壌由来)、Tang *et al.* (2006) によるアミラーゼ (温泉由来)、Kotik *et al.* (2009) によるエポキシドヒドロラーゼ (下水由来) があり、いずれの例においても得られた遺伝子産物の酵素活性が大腸菌等の宿主を用いて確認されている。

(c) ランダムプライマーを用いる方法

これは、制限酵素サイトなど数塩基程度の短い配列を認識するランダムプライマーと、標的遺伝子の既知領域から設計した特異プライマーとで nested PCR を行う方法である。前述のアダプター配列を用いる方法との違いは、ゲノム DNA の制限酵素消化とアダプターのライゲーションを行わないという点である。ただし、この方法でも nested PCR での特異性を高めるために、ランダムプライマーに予め何らかのアダプター配列が付加されることが多い。

このタイプの方法を用いてメタゲノムウォーキングを行った例としては、Eschenfeldt *et al.* (2001) による 2,5-ジケト-D-グルコン酸リダクターゼ (土壌、池由来)、Hayashi *et al.* (2005) によるキシラナーゼ (ヒト腸内由来)、Labes *et al.* (2008) によるネオプルーナーゼ、シクロデキストリナーゼ (温泉由来) の取得が挙げられる。これらの例でも取得した遺伝子産物の活性が調べられており、Eschenfeldt *et al.* (2001) の例では既知のものよりも耐熱性や基質親和性に優れた酵素が得られている⁵⁾。

4. メタゲノムウォーキングと PCR-DGGE の併用

上述のとおり、PCR によるメタゲノムからの完全長遺伝子の取得法として現在最も実績があるのはメタゲノムウォーキングである。メタゲノムウォーキングを行う場合、PCR で増幅した標的遺伝子断片の中から、どの断片について全長取得を目指すのかをまず決定する必要がある。通常、保存配列の PCR によってメタゲノムから得られる増幅産物には、様々な種に由来する多様な断片が含まれている。これまでの研究例では、PCR 産物をクローニングして塩基配列を解読し、配列の新規性やクローンの分離頻度等に基づいてターゲットが決定されている場合が多い。しかし、その選定基準は個々の研究者の主観に拠るところが大きく、作業効率的にもよいとは言い難い。

こうした状況をふまえ、最近筆者らは PCR-DGGE 法をメタゲノムウォーキングのターゲット選定に利用することを試みた²⁾。PCR-DGGE 法は、環境微生物の群集構成や動態を解析するツールとして現在広く用いられている²⁴⁾。一般的な用途では系統マーカーとして有用な 16S rRNA 遺伝子等が用いられる場合が多いが、最近では特定の機能群の解析を目的として様々な酵素遺伝子が PCR-DGGE の標的遺伝子として利用されている^{22, 25, 35, 40)}。筆者らは、3-クロロ安息香酸 (3CB) の分解に関わる安息香酸 1,2-ジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*benA*) を標的として、図 2 のようなスクリーニングストラテジを実践した。このストラテジの最大の特長は、メタゲノム中の標的遺伝子のバリエーションを PCR-DGGE によって効率的に検出することができ、基質の添加にもなって環境中で優占するようなユニークな遺伝子を容易に見出せるという点にある。実際に筆者らは、3CB の添加により土壌中で優占する *benA* を PCR-DGGE で検出し、メタゲノムウォーキングによってその全長を回収することに成功した。さらに、このストラテジを別の酵素遺伝子 (クロロカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ遺伝子; *tfdC*) のスクリーニングにも適用し、その有効性を確認している²⁾。

ここに示したストラテジは、特定の条件のもとで優占す

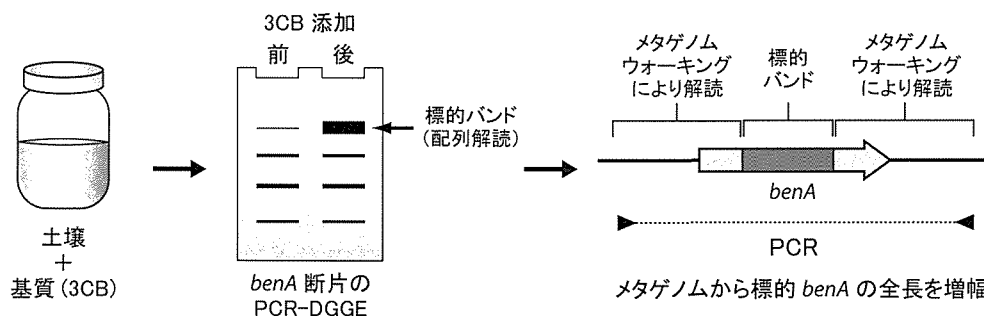


図 2 PCR-DGGE とメタゲノムウォーキングを用いたストラテジ

3-クロロ安息香酸 (3CB) の添加に伴って土壌中で優占する安息香酸 1,2-ジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*benA*) をターゲットとした筆者らの事例²⁾。PCR-DGGE によって、土壌中の多様な *benA* 断片の中から 3CB の添加に伴って増強するものを効率的に選び出すことができる。なお、メタゲノムウォーキングにはランダムプライマーベースの市販キット (DNA Walking SpeedUp™ premix kit, Seegene 社) を使用している。

る酵素遺伝子をスクリーニングする方法として特に有用である。むしろ、PCR-DGGEで優占的に検出されたからといって、単純にその遺伝子がコードする酵素がその環境で優れた機能を発揮するとは限らない。それでも、ターゲットの選定にあたって「環境中における遺伝子の挙動」という判断材料を加えられる点はこの方法ならではの利点と言えるだろう。また、分子生態学的な研究に既に広く用いられているPCR-DGGEとメタゲノムウォーキングの組み合わせは、単に有用遺伝子の探索にとどまらず、環境微生物の生態研究にも大いに役立つものと期待される。

5. まとめ

本稿では、配列情報に基づくメタゲノムスクリーニングのうち、特にPCRを用いて完全長の酵素遺伝子を取得する様々な手法を紹介してきた。酵素活性に基づくスクリーニングと比べ、PCRによってメタゲノムから活性を備えた酵素を得ることに成功した事例はまだ少ないのが現状である。しかし、遺伝子全長の取得という大きな課題が様々な工夫によって克服されつつある現在、PCRベースのメタゲノムスクリーニングの意義が再認識されてきている。本稿で紹介した研究例のうち、いくつかの事例では取得した遺伝子の産物が不溶性タンパクを形成したり宿主細胞に毒性を示すなどして、容易には酵素活性を検出できないケースがあったことが報告されている^{3,33,34)}。これらの例では、宿主の変更や発現制御系の工夫などにより最終的には酵素活性を確認しているが、こうした酵素は活性ベースのメタゲノムスクリーニングでは見落とされる可能性が高い。このように、遺伝子を取得した後で適切な発現条件を検討できるという点は、配列情報に基づくメタゲノムスクリーニングの大きな利点である。

本稿で紹介した研究例の中には、今後PCRによるメタゲノムスクリーニングの実用性をさらに高めていくためのヒントがいくつか示されている。特に重要なのは、メタゲノム中にほんの少ししか含まれていない標的遺伝子をいかに高感度に増幅するかという点に関するものである。ピオチン-ストレプトアビジン結合による精製や、RCAによる選択的増幅は、特定の事例にとどまらず様々な場面で柔軟に取り入れることのできる効果的な工夫といえるだろう。また、次々と新たなバリエーションが生まれているゲノムウォーキング技術の進歩は、メタゲノムウォーキングの成功率を高める直接的な駆動力になる。さらに、基質の添加によって標的遺伝子の集積を図ったり、目的とする酵素の性質に応じて適切な環境サンプルを選んだりすることは、基本的な工夫ではあるが成否を左右する重要な要素である。

メタゲノムスクリーニングの歴史はまだ浅いがその進歩は実に目覚ましい。近年のシーケンシング技術の劇的な進歩などによって、その速度はますます加速していきだろう。その意味では、本稿で紹介した様々な手法がこの先何十年も普遍的に用いられていくとは考えにくい。しかし、少なくとも現時点においては、PCRベースのメタゲノムスクリーニングは多くのラボで比較的容易に実践し得る「こなれた」手法であ

り、今後も多くの発見をもたらす可能性を秘めている。

引用文献

- 1) Amann R, Ludwig W and Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169
- 2) Arnold C and Hodgson IJ (1991) Vectors PCR: a novel approach to genomic walking. *PCR Methods Appl.*, **1**, 39-42
- 3) Bell P, Sunna A, Gibbs MD, Curach NC, Nevalainen H and Bergquist PL (2002) Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, **148**, 2283-2291
- 4) Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 470-478
- 5) Eschenfeldt WH, Stols L, Rosenbaum H, Khambatta ZS, Quate-Randall E, Wu S, Kilgore DC, Trent JD and Donnelly MI (2001) DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4206-4214
- 6) Fuchu G, Ohtsubo Y, Ito M, Miyazaki R, Ono A, Nagata Y and Tsuda M (2008) Insertion sequence-based cassette PCR: cultivation-independent isolation of gamma-hexachlorocyclohexane-degrading genes from soil DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 627-632
- 7) Gabor EM, Alkema WBL and Janssen DB (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.*, **6**, 879-886
- 8) Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J and Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, **5**, R245-249
- 9) Hayashi H, Abe T, Sakamoto M, Ohara H, Ikemura T, Sakka K and Benno Y (2005) Direct cloning of genes encoding novel xylanases from the human gut. *Can. J. Microbiol.*, **51**, 251-259
- 10) 石野良純・山上 健・松川博昭・鬼塚尚子・鍋 健吾・興 栢聖哉 (2007) メタゲノムを利用した新規 DNA 合成酵素の創製, 環境バイオテクノロジー学会誌, **7**, 87-92
- 11) Jacobsen CS (1995) Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3347-3352
- 12) Jiang Z, Wang H, Ma Y and Wei D (2006) Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 327-332
- 13) Kotik M (2009) Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: current genome-walking techniques for future metagenome applications. *J. Biotechnol.*, **144**, 75-82
- 14) Kotik M, Stepanek V, Maresova H, Kyslik P and Archelas A (2009) Environmental DNA as a source of a novel epoxide hydrolase reacting with aliphatic terminal epoxides. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **56**, 288-293
- 15) Kubota M, Nodate M, Yasumoto H, Hirose M, Uchiyama T, Kagami O, Shizuri Y and Misawa N (2005) Isolation and functional analysis

- of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2421-2430
- 16) Labes A, Karlsson EN, Fridjonsson OH, Turner P, Hreggvidson GO, Kristjansson JK, Holst O and Schoeneheit P (2008) Novel members of glycoside hydrolase family 13 derived from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1914-1921
 - 17) Li Y, Wexler M, Richardson DJ, Bond PL and Johnston AWB (2005) Screening a wide host - range, waste - water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environ. Microbiol.*, **7**, 1927-1936
 - 18) Matsukawa H, Yamagami T, Kawarabayasi Y, Miyashita Y, Takahashi M and Ishino Y (2009) A useful strategy to construct DNA polymerases with different properties by using genetic resources from environmental DNA. *Genes Genet. Syst.*, **84**, 3-13
 - 19) Meiring T, Mulako I, Tuffin MI, Meyer Q and Cowan DA (2010) Retrieval of full - length functional genes using subtractive hybridization magnetic bead capture. *Methods Mol. Biol.*, **668**, 287-297
 - 20) Meyer QC, Burton SG and Cowan DA (2007) Subtractive hybridization magnetic bead capture: a new technique for the recovery of full - length ORFs from the metagenome. *Biotechnol. J.*, **2**, 36-40
 - 21) Morimoto S and Fujii T (2009) A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR - DGGE and metagenome walking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 389-396
 - 22) Morimoto S, Togami K, Ogawa N, Hasebe A and Fujii T (2005) Analysis of a bacterial community in 3-chlorobenzoate - contaminated soil by PCR - DGGE targeting the 16S rRNA gene and benzoate 1,2-dioxygenase gene (*benA*). *Microbes Environ.*, **20**, 151-159
 - 23) Morris DD, Reeves RA, Gibbs MD, Saul DJ and Bergquist PL (1995) Correction of the beta - mannanase domain of the *celC* pseudogene from *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* and activity of the gene product on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2262-2269
 - 24) Muyzer G and Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 127-141
 - 25) Nicolaisen MH and Ramsing NB (2002) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia - oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **50**, 189-203
 - 26) Ochman H, Gerber AS and Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, **120**, 621-623
 - 27) Okuta A, Ohnishi K and Harayama S (1998) PCR isolation of catechol 2,3-dioxygenase gene fragments from environmental samples and their assembly into functional genes. *Gene*, **212**, 221-228
 - 28) Ono A, Miyazaki R, Sota M, Ohtsubo Y, Nagata Y and Tsuda M (2007) Isolation and characterization of naphthalene - catabolic genes and plasmids from oil - contaminated soil by using two cultivation - independent approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 501-510
 - 29) Sarkar G, Turner RT and Bolander ME (1993) Restriction - site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers. *PCR Methods Appl.*, **2**, 318-322
 - 30) Simon C and Daniel R (2009) Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 265-276
 - 31) Stokes HW, Holmes AJ, Nield BS, Holley MP, Nevalainen KM, Mabbutt BC and Gillings MR (2001) Gene cassette PCR: sequence - independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5240-5246
 - 32) Sunna A and Bergquist P (2003) A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4- beta - xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. *Extremophiles*, **7**, 63-70
 - 33) Tang K, Utairungsee T, Kanokratana P, Sriprang R, Champreda V, Eurwilaichitr L and Tanapongpipat S (2006) Characterization of a novel cyclomaltodextrinase expressed from environmental DNA isolated from Bor Khleung hot spring in Thailand. *FEMS Microbiol. Lett.*, **260**, 91-99
 - 34) Terahara T, Yamada K, Kurata S, Yokomaku T, Tsuneda S and Harayama S (2010) Direct cloning and expression of putative esterase genes from environmental DNA. *Enzyme Microb. Tech.*, **47**, 17-23
 - 35) Throckmole I, Enwall K, Jarvis A and Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, 401-417
 - 36) Torsvik V, Goksøyr J and Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782-787
 - 37) Uchiyama T and Miyazaki K (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 616-622
 - 38) Uchiyama T and Watanabe K (2006) Improved inverse PCR scheme for metagenome walking. *BioTechniques*, **41**, 183-188
 - 39) Wang GY, Graziani E, Waters B, Pan W, Li X, McDermott J, Meurer G, Saxena G, Andersen RJ and Davies J (2000) Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org. Lett.*, **2**, 2401-2404
 - 40) Williamson N, Brian P and Wellington EM (2000) Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 315-321
 - 41) Yamada K, Terahara T, Kurata S, Yokomaku T, Tsuneda S and Harayama S (2008) Retrieval of entire genes from environmental DNA by inverse PCR with pre - amplification of target genes using primers containing locked nucleic acids. *Environ. Microbiol.*, **10**, 978-987