

Hideo Nishitani (Laboratory of Biological Signaling, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Kouto 3-2-1, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan)

酵素スクリーニングの新技术 —メタゲノム解析の意義と課題—

はじめに

地球上の多種多様な環境に適応進化してきた微生物は、多種多様な酵素の宝庫でもある。現在使用されている工業用酵素の大部分が微生物起源であることを考慮すると、高効率な微生物酵素取得法の開発は、環境調和型物質生産体系を構築する上で今後より一層重要な課題となる。通常、目的とする微生物酵素を得るには、まず生産菌を探し当てることから始める。しかしながら、環境中に生存する99%以上の微生物は純粋培養できないことが知られている¹⁾。従来は、その1%未満から有用酵素を取得する努力をしていたわけだが、未使用の99%を有効利用できれば、有用酵素の収集量ははるかに増大するに違いない。そして

この夢を実現するのがメタゲノム技術 (metagenomics) である。メタゲノムとは、「多種多様な微生物が共存する複合微生物系の含有するゲノムの混合体」を意味する用語で、Wisconsin 大学の Jo Handelsman により最初に用いられた²⁾。メタゲノム技術は、概念の形成から実験技法の開発までがこの10年程度の間飛躍的に進展してきた。本稿ではメタゲノム技術開発の紹介と意義、今後の課題と展望を示したい。

1. メタゲノムライブラリーの構築

図1にメタゲノム解析の流れを示した。まず土壌や海水等の環境試料から直接DNAを抽出し(これを「環境DNA」ということもある)、それらを適当なサイズに切断、分画した後、ベクターにクローニングしてメタゲノムライブラリーが完成する。ただし、通常のゲノムライブラリーの作製と異なり、汎用化されているわけではない。環境試料からのDNA調製ひとつにしても容易ではなく、高純度DNAの取得のために様々な手法が検討されている³⁾。ベクターもプラスミドからファージ、コスミド、フォスミド、BACと種類は豊富だが、それぞれに一長一短あり、挿入断片長、コピー数、発現能力、そして標的遺伝子の特徴を基準に選ぶ必要がある⁴⁾。宿主は通常大腸菌が使われるが、

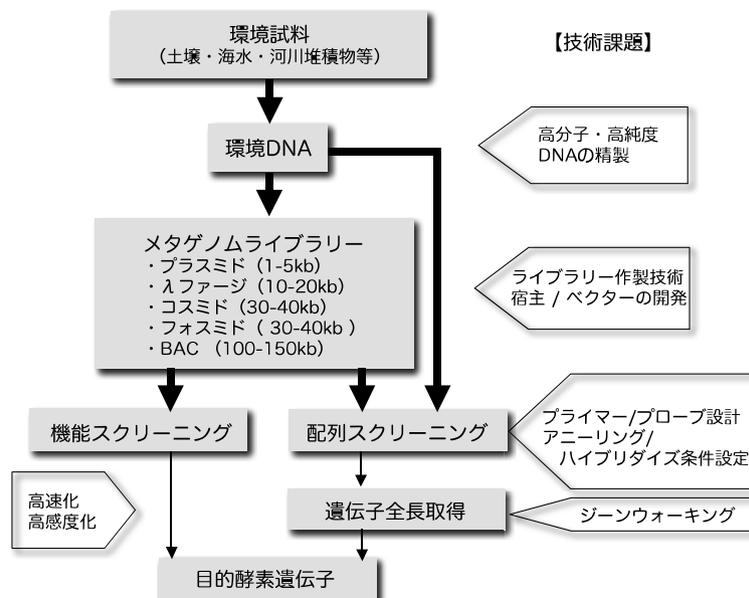


図1 メタゲノム解析の流れと各ステップにおける技術課題

環境試料中には膨大な数の標的遺伝子が含まれているはずであるが、スクリーニングの過程でその大半を失ってしまう(矢印の太さは標的遺伝子の存在割合を表す)。

遺伝子発現にバイアスがかかることも懸念され、他の宿主の利用も試みられている⁵⁾。このようにライブラリー作製時点から確立した技術体系がないままスタートを切ることになるが、実はさらに悩ましいのが次のスクリーニングの過程である。

2. 機能に基づくスクリーニング

まず最も一般的に行われるのが、酵素活性に準拠した方法である。宿主細胞内（通常は大腸菌）でメタゲノム遺伝子を発現させ、その機能を検出する。現在までに、プラスミドや入ファージをベクターとするライブラリーから各種加水分解酵素（プロテアーゼ、エステラーゼ、アミダーゼ、グリコシダーゼ等）や酸化還元酵素が、コスミドやBACライブラリーからは、抗生物質耐性や抗菌活性等の生理活性を示すクローンが見いだされている⁶⁾。中には新規な性質を保有する酵素も含まれているのだが、何分、取得効率が極めて低いのが難点である。成功事例として論文に発表されているものでも 10^4 - 10^6 クローンから僅か数個程度の陽性クローンの取得に留まり、一見して労力に見合った結果とは言い難い。自然環境中にこの程度の割合でしか存在していないはずもなく、また「一つも得られなかった」というネガティブデータが表面化していないことも考慮すると技術的欠陥は明らかで、取得効率の向上こそが最大の課題である⁷⁾。では如何にしてこの問題を克服するか？ 以下、スクリーニング技術の高度化を目指し我々が取り組んだ、エクストラジオールジオキシゲナーゼ (extradiol dioxygenase; EDO) のスクリーニングとその最適化の実験を例にとり説明したい⁸⁾。

微生物あるいは酵素の代表的なスクリーニング手法は、寒天培地に基質や指示薬を添加し、発色やクリアゾーンを指標として酵素活性を検出するものである。操作性は極めて簡便でかつハイスループット化が容易で、メタゲノムライブラリーにおいても最も頻繁に使用されている評価系である。しかし現実的にメタゲノムスクリーニングの非効率性を目の当たりにすると、実はこの寒天培地系の利用こそが敗因になっているのではないかと考えられた。この評価系の弱点は、培養から活性検出までのパラメーターが殆ど固定されてしまうことである。そこで我々は、至適化が可能な系を用いることで、この弱点を克服できないものかと考え、液体評価系を構築することにした。寒天培地系と比べると格段に煩雑化するが、省力化、迅速化、ハイスループット化の促進のために、コロニーピッカー、自動分注ロボット、プレートリーダーを利用し、全ての行程を96穴

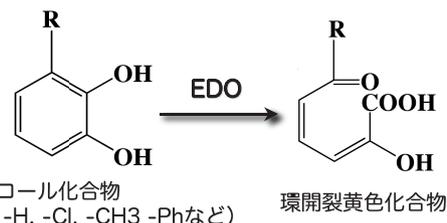


図2 Extradiol dioxygenase (EDO) によるカテコール化合物の開裂反応

EDOはカテコール化合物のメタ位を開裂し、黄色化合物を生成する酵素ファミリーである。置換基がHの化合物がカテコールである。

フォーマットで行った。

EDOはカテコールのメタ位を開裂する酵素で、開環化合物は黄色を呈する(図2)。そこで基質としてカテコールを用い、活性クローンが呈する黄色を指標として3.3 Gbサイズ(96,000フォスミドクローン)に及ぶメタゲノムライブラリーの機能スクリーニングを行った。培養、遺伝子発現誘導、活性検出条件等、様々なパラメーターを最適化した結果、徐々に陽性クローンの総数が向上し、最終的には91もの活性クローンが得られた。この91という数は、論文として公開されているメタゲノム研究成果としてはトップランクである⁷⁾。

次に我々の用いた液体評価系の感度を検証するために、得られた陽性クローンを寒天培地系でも評価してみた。強弱2種類の活性クローンを寒天培地上に生育させ、カテコールを与えてみると、液体評価系では強く黄色を呈したクローンですら、寒天培地上ではようやくそれと認識できる程度であった。一方、反応溶液中で弱い黄色しか示さなかったクローンに至っては、ネガティブクローンとの判別は困難であった。同じライブラリーをスクリーニングするにしても、寒天培地系を採用していた場合には陽性クローンの殆どをそれと気づかずに見過ごしていたに違いない。今回我々は、液体評価系を使い、至適化項目を徐々に突き詰めることで陽性クローンの大量取得につながった訳だが、当然この方法とて一般化できる訳ではなく、個々の酵素に応じて柔軟な対応をとる必要はある。メタゲノム本来の潜在性、多様性を無為にしないためにも、方法論の違いはあれ、最適化の努力の重要性は分かっていただけよう。

3. 配列に基づくスクリーニング

機能スクリーニング以外の方法で代表的なものは、遺伝子配列の相同性に準拠した方法である。目的とする酵素遺伝子の有する保存配列を利用したPCRやハイブリダイ

ゼーション法により、スクリーニングを行うものである。得られる遺伝子断片は、当然ながら既知の遺伝子配列に類似したものになり、新たな機能をどこまで期待できるかは未知数であるが、比較的操作が容易で取り組みやすい方法ではある。その一方、PCRによって増幅された断片は部分配列となり、全長取得のために次なるステップ（ジーンウォーキング）が必要となる。しかしながら、機能スクリーニングに対する優位性がないわけではない。Kniettschらは、デヒドラターゼを標的として、同一のメタゲノムライブラリーを、保存配列をDNAプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションと酵素活性検出の二つの方法でスクリーニングした。その結果、配列スクリーニングの方が5~7倍取得効率が高いという結果を得た⁹⁾。機能スクリーニングと比べて、全く新規な酵素を取得することは難しいとされている配列スクリーニングではあるが、反応特異性が異なる酵素を取得できた例もある⁶⁾。効率的なジーンウォーキング法（IAN-PCR法）の開発¹⁰⁾やPCR増幅断片を既存酵素遺伝子の相同部分と差し替えたキメラ酵素とする方法も開発され¹¹⁾、標的遺伝子によっては有効である。

4. メタゲノムにより明らかにされること

先に述べたように、我々はメタゲノムライブラリーから多くのEDO遺伝子を得ることに成功した。では、「メタゲノムらしい結果」とはどういうものであろうか？多くのクローンを得たことで何が明らかになったのか？このメタゲノム研究の根源的問いに答えるべく、まず獲得した91のEDO活性フォスミドクローンについて、カテコールをはじめメチル基やフェニル基などで置換された各種誘導体に対する分解活性を測定した（図2）。その結果、各々のクローンは様々な基質特異性を有しており、多種多様なEDO遺伝子の存在が示唆された。そこで、活性測定結果に基づき38のフォスミドクローンを選別し、ショットガン解析、続いて遺伝子のアノテーションを行った。一つのフォスミドインサート上に2種のEDO遺伝子が存在しているクローンもあり、合計で三つの部分配列を含む43のEDO遺伝子を同定した。アミノ酸配列を基にEDO酵素の分類を行った結果、これらの中には、培養に基づく方法で高頻度に得られるサブファミリーに属する遺伝子がいくつか含まれるのと同時に、既存のサブファミリーに分類されないEDO遺伝子が半数以上存在した。これを受け四つの新規なサブファミリーを提唱した（表1）。なかでも特に多数を占めたのがI.2.Gサブファミリーに属するEDO群であり、なおかつ、既存の酵素に比べカテコールに対し非

表1 メタゲノムスクリーニングにより取得したEDO遺伝子

サブファミリー	クローン数
I.1.C	2
I.2.A	7
I.2.B	4
I.2.C	6
I.2.G	18
I.3.M	2
I.3.N	1

EDO酵素は配列相同性によりさらにサブファミリーに分類される。今回新たに提唱したサブファミリーを下線で示した。今回のスクリーニングにより取得した43種のEDO遺伝子については、既存のサブファミリーに分類されるものもあったが、半数以上のものは新規サブファミリーに分類された。中でもI.2.Gサブファミリー遺伝子は環境中で大きな割合を占めた（文献7）。

常に高い親和性を有することが明らかとなった。カテコールは微生物による様々な芳香環代謝において共通の中間代謝産物であり、EDO酵素は生物（特に微生物）を利用した汚染環境の浄化、即ちバイオレメディエーションにおけるキーエンザイムとして研究歴も長い。にもかかわらず、今回一度のスクリーニングで多くの新規遺伝子を獲得できたこと、さらにはこれら新規遺伝子のうちI.2.Gサブファミリー酵素群が環境中のメインプレーヤーである可能性が示唆されたことは、微生物培養に依存してきた我々の知識、経験が根底から覆されかねないことを意味する。

メタゲノム手法の有効性を示すもう一つの事例を挙げておこう。メタゲノム技術のリーディングカンパニー、米国Diversa社（現Verenium社）の成果である¹²⁾。ニトリラーゼはニトリル化合物の変換に関与する酵素であり、光学活性なマンデル酸の製造など産業上の有用性が高い。これまでに報告されているバクテリア由来のニトリラーゼは20に満たず、自然界では希少な酵素と考えられていた。Diversa社はメタゲノムライブラリーの活性スクリーニングにより、なんと300以上のニトリラーゼの取得に成功し、この結果、ニトリラーゼに関する知見が劇的に向上した。一連の研究により獲得されたニトリラーゼの数は既知のもの10倍以上に及び、産業利用への道が大幅に拡大したばかりでなく、これまで不明な点が多かったニトリラーゼの生態学的な意義や進化的関係の考察に大きく貢献した。従来の微生物スクリーニング法では、これほど多くの遺伝子を獲得するためには途方もない時間と労力を要したことであろう。ひょっとすると進化的側面の解析ができるほどに多様性に富んだ遺伝子ファミリーの獲得にはたどり着かなかったかもしれない。

以上、EDOとニトリラーゼの例を挙げてメタゲノム手法の有用性を明らかにした。メタゲノム手法は「微生物の培養」という微生物学のはじめの一步を飛ばすという全く新たな発想で、逆に真実に近づくことを可能にする技術である。二つの事例はこのことを明確に示すとともに、今後の研究に弾みをつけるものである。

おわりに

現時点ではメタゲノム技術は未だ発展途上であり、成果の産業利用もまだ端緒に付いたばかりである。が、海外のバイオテクノロジー企業の動向を見ても、早晚バイオテクノロジー産業の中でも大きな位置を占めてくるのは間違いない¹³⁾。我が国においては、技術論以外に「未同定DNA実験」に対する規制法的枠組みや、由来生物が不明な遺伝子を産業的に利用することへの社会受容など、メタゲノム特有の問題も存在するが、普及を急ぐばかりに根拠なく安全性を強調するのではなく、メタゲノム解析により得られる結果を元に危険性を正しく評価することで、メタゲノム産業が一気に開花する可能性はある。本稿では生物資源としてのメタゲノムあるいは環境中における遺伝子の多様性と進化にのみ言及したが、その影響力は純粋生物学の枠に留まらず、生物と環境、また物質循環との関わりなど生態系の考察にまで及んできている¹⁴⁾。メタゲノムから生まれる新たな発想、世界観が強力な推進力となり、微生物研究の新たなそして大きなうねりが来ようとしている。

- 1) Amann, R.I., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. (1995) *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- 2) Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., & Goodman, R.M. (1998) *Chem. Biol.*, **5**, R245-R249.
- 3) Gabor, E.M., de Vries, E.J. & Janssen, D.B. (2003) *FEMS Mi-*

- crobiol. Ecol.*, **44**, 153-163.
- 4) Daniel, R. (2004) *Curr. Opin. Biotech.*, **15**, 199-204.
- 5) Courtois, S., et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 49-55.
- 6) Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W.R. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 955-962.
- 7) Lorenz, P. & Eck, J. (2005) *Nature Rev. Microbiol.*, **3**, 510-516.
- 8) Suenaga, H., Ohnuki, T., & Miyazaki, K. (2007) *Environ. Microbiol.*, **9**, 2289-2297.
- 9) Knietzsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, & Daniel, R. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3048-3060.
- 10) Uchiyama, T. & Watanabe, K. (2006) *Biotechniques*, **41**, 183-188.
- 11) Okuta, A., Ohnishi, K., & Harayama, S. (1998) *Gene*, **212**, 221-228.
- 12) Robertson, D.E., et al. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2429-2436.
- 13) Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., & Wittwe, P. (2005) *Trends Biotechnol.*, **23**, 321-329.
- 14) Strous, M., et al. (2006) *Nature*, **440**, 790-794.

末永 光¹, 宮崎 健太郎^{1,2}

(¹産業技術総合研究所生物機能工学研究部門,

²東京大学大学院新領域創成科学研究科

メデイカルゲノム専攻)

Screening for novel enzymes: accessing the metagenome as an unexploited genetic resource

Hikaru Suenaga¹ and Kentaro Miyazaki^{1,2} (¹Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan, ²Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)