

体-桿体ジストロフィーの一種CORD7の原因として、RIM1の884番目のアルギニン残基からリジン残基への変異が報告された¹⁵⁾。この患者は視神経に存在するCa²⁺チャンネル(α_{1F})の変異と類似した症状を示す。また、興味深いことに、このCORD7患者は健常人に比べて認知能力が高いことが報告された¹⁶⁾。そこで、我々はこのRIM1変異がCa²⁺チャンネル活性に及ぼす影響について評価した。すると、変異を導入したRIM1は野生型のRIM1と比較して、視神経型Ca²⁺チャンネル(α_{1F})に対してはCa²⁺チャンネル活性を抑制し、中枢型Ca²⁺チャンネル(α_{1A})に対してはCa²⁺流入をより持続させた¹⁷⁾。Ca²⁺チャンネル活性だけが病状と連結しているとは断言できないが、症状とチャンネル活性が一致するため、その関連については非常に興味深い。

8. おわりに

Ca²⁺チャンネルとシナプス小胞の距離の重要性は以前から指摘され続けていたが、その分子メカニズムは未解明な状態であった。我々が発見したRIM1とCa²⁺チャンネル β サブユニットの相互作用は、この距離を規定する分子メカニズムであると考えられる。今後は、実際のプレシナプスでRIM1- β サブユニット相互作用及びその効果を実証すること、その他のCa²⁺チャンネル相互作用タンパク質も含めたCa²⁺チャンネルに対する動的な制御機構を解明することが望まれる。また、Ca²⁺チャンネルを中心とするタンパク質複合体の機能解明が進む中で、足場タンパク質としての β サブユニットの重要性も今後さらに明らかにされると期待される。

- 1) Adler, E.M., Augustine, G.J., Duffy, S.N., & Charlton, M.P. (1991) *J. Neurosci.*, **11**, 1496-1507.
- 2) Wadel, K., Neher, E., & Sakaba, T. (2007) *Neuron*, **53**, 563-575.
- 3) Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D.A., Pawlu, C., Kellner, R.R., Willig, K.I., Hell, S.W., Buchner, E., Heckmann, M., & Sigrist, S.J. (2006) *Science*, **312**, 1051-1054.
- 4) 大塚稔久 (2006) 生化学, **78**, 979-986.
- 5) 高森茂雄, Reinhard Jahn (2007) 生化学, **79**, 879-882.
- 6) Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Kuwahara, R., Ito, T., & Takahashi, M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24925-24928.
- 7) Bezprozvanny, I., Scheller, R.H., & Tsien, R.W. (1995) *Nature*, **378**, 623-626.
- 8) Sheng, Z.H., Rettig, J., Cook, T., & Catterall, W.A. (1996) *Nature*, **379**, 451-454.
- 9) Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T., & Numa, S. (1991) *Nature*, **350**, 398-402.

- 10) Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., & De Waard, M. (2000) *Neuron*, **25**, 177-190.
- 11) Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K.P., & Mori, Y. (2007) *Nature Neurosci.*, **10**, 691-701.
- 12) Vendel, A.C., Terry, M.D., Striegel, A.R., Iverson, N.M., Leu-ranguer, V., Rithner, C.D., Lyons, B.A., Pickard, G.E., Tobet, S.A., & Home, W.A. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 2635-2644.
- 13) Schoch, S., Mittelstaedt, T., Kaeser, P.S., Padgett, D., Feldmann, N., Chevaleyre, V., Castillo, P.E., Hammer, R.E., Han, W., Schmitz, F., Lin, W., & Südhof, T.C. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5852-5863.
- 14) Weimer, R.M., Gracheva, E.O., Meyrignac, O., Miller, K.G., Richmond, J.E., & Bessereau, J.L. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 8040-8047.
- 15) Johnson, S., Halford, S., Morris, A.G., Patel, R.J., Wilkie, S.E., Hardcastle, A.J., Moore, A.T., Zhang, K., & Hunt, D.M. (2003) *Genomics*, **81**, 304-314.
- 16) Sisodiya, S., Thompson, P., Need, A., Harris, S., Weale, M., Wilkie, S., Michaelides, M., Free, S., Walley, N., Gumb, C., Gerrelli, D., Ruddle, P., Whalley, L., Starr, J., Hunt, D., David, G., Deary, I., & Moore, A. (2007) *J. Med. Genet.*, **44**, 373-380.
- 17) Miki, T., Kiyonaka, S., Uriu, Y., De Waard, M., Wakamori, M., Campbell, K.P., & Mori, Y. (2007) *Channels*, **1**, 144-147.

清中 茂樹, 瓜生 幸嗣, 三木 崇史, 森 泰生
(京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻)

Physiological roles of presynaptic Ca²⁺ channel complexes on neurotransmitter release
Shigeki Kiyonaka, Yoshitsugu Uriu, Takafumi Miki, and Yasuo Mori (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura campus, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

染色体複製の制御：細胞周期に一度だけ複製されるしくみ

はじめに

染色体は、細胞周期に一度だけ複製される。どうして、何度も複製されることはないのか？ 1970年 Raoらの細胞融合の実験により、S期の細胞と融合したG₁期の細胞は素早く複製を開始するが、G₂期の細胞は複製を行わず、一度複製された染色体が新たに複製されるためには、M期を経なければならないことが示された。1988年に

Blow と Laskey は、ライセンス化因子 (licensing factor) という複製の開始に必要な因子を提唱した¹⁾。彼らは、この因子は M 期が終わったのち染色体に結合するが、一度複製が始まると消費されてしまうので、同じ細胞周期において、染色体は再度複製されることはないかと仮定した。このライセンス化因子の概念は、その後の分子レベルでの研究の指針となった。今日いくつかの因子が、複製の‘ライセンス化’に関わる分子として同定されている。‘ライセンス化’は、染色体上の複製起点に MCM2-7 が結合して、複製開始可能な複合体 (後述の複製開始前複合体 pre-RC) が構築されることを意味する。複製の開始と進行には二重らせんを巻き戻す DNA ヘリカーゼが必須で、MCM2-7 がこの機能を担っている。これまでの研究により、再複製を抑制するため、MCM2-7 の複製起点へのローディングが、細胞周期において巧妙に且つ厳密に制御されていることが明らかとなってきた。

1. 複製起点のライセンス化—複製開始前複合体 (pre-RC) の形成

真核生物の染色体複製開始因子の分子レベルでの研究

は、1991 年 Stillman のグループによる出芽酵母からの ORC (origin recognition complex) 複合体の精製に始まる。これは、Orc1 から Orc6 の六分子からなる複合体で、出芽酵母の複製起点に存在する共通な配列に結合する。ORC のサブユニット Orc1, 4 と 5 は、大腸菌の複製開始点 OriC に結合する DnaA と同様に、ATP 結合部位を持ち AAA⁺ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーの ATP アーゼに属する。しかし、大腸菌で ATP 結合型 DnaA の複製起点への集積が、複製開始をもたらすのと異なり、ORC の結合だけでは複製を開始できない。細胞周期の G₁ 期の複製起点には、ORC に加えて別の因子が結合していることが示され、分離されたのが MCM2-7 (Mcm2 から Mcm7 よりなる六量体) である。MCM は、ミニ染色体の維持に必要な遺伝子 (mini chromosome maintenance) として出芽酵母で同定されていたものである。MCM の各サブユニットも AAA⁺ ファミリー ATP アーゼに属し、ヘリカーゼとしての活性を持つことが Ishimi により、初めて示された²⁾。MCM2-7 の複製起点への結合は、単独では起こらず、Cdc6 と Cdt1 の二つのローダータンパク質を必要とする。Cdc6 も AAA⁺ ファミリー ATP アーゼ

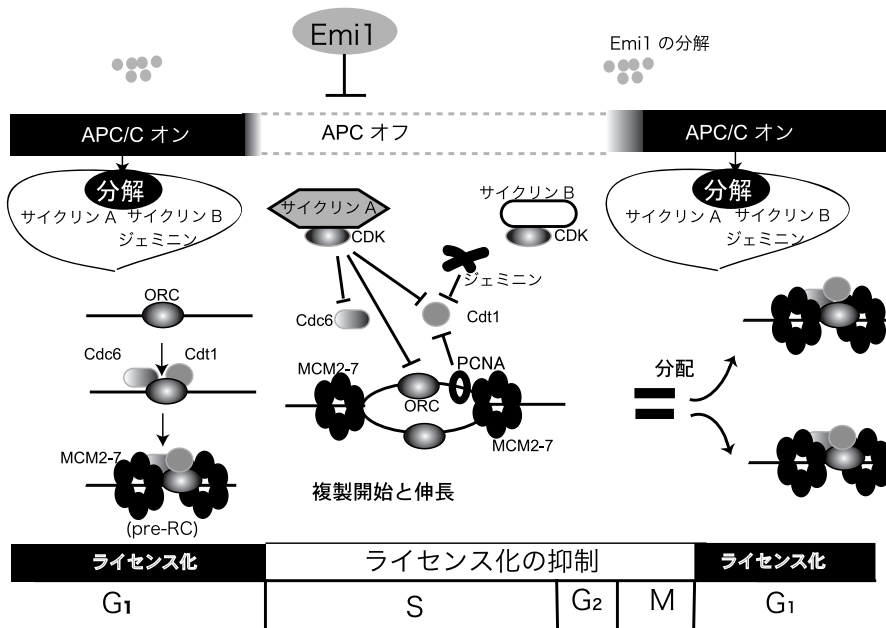


図1 細胞周期における複製のライセンス化制御

染色体複製のライセンス化は、M 期の終わりから G₁ 期のみ許される。S 期の開始とともに、CDK によるライセンス化諸因子を抑制する機能、ジェミニンの結合や分解による Cdt1 を抑制する機能が働き、一度複製された染色体は M 期が終わるまで再度ライセンス化されることはない。細胞周期において、ユビキチンリガーゼ APC/C によるサイクリンやジェミニンの周期的な分解制御が、ライセンス化制御のため重要な働きをしている。

である。Cdt1は、分裂酵母の転写因子Cdc10のターゲットの一つとしてクローニングされた遺伝子である(Cdc10 dependent transcript 1に由来する。後述のCdt2もその一つ)³⁾。このように複製起点上に形成されるORC-Cdc6-Cdt1-MCM複合体が、複製開始前複合体pre-RC (pre-replicative complex)であり、新たな染色体の複製が許可された、つまりライセンス化された(licensed for replication)状態である(図1)。

2. 複製開始と再複製の抑制

ほ乳類細胞では、ライセンス化は、M期が終了しG₁期に入ったころには確立している。それから、数時間経ったのち、CDKとDDKの二つのキナーゼが活性化されて、複製が開始される。このあいだ細胞は、増殖環境やDNAの損傷の具合などをチェックし、次の細胞周期を開始するための準備を行なう。CDK(cyclin dependent kinase)は、分裂酵母でCdc2として初めて同定されたキナーゼで、細胞周期のS期やM期の開始を制御するマスター因子である。一方DDKは、Dbf4-dependent kinaseで出芽酵母のCdc7にあたる。DDKは、MCM2-7をリン酸化し、その結果GINS(Sld5(go)-Psf1(ichi)-Psf2(ni)-Psf3(san))とCdc45が結合して、ヘリカーゼ活性が上昇するようである。一方、CDKのターゲットは長い間不明であったが、出芽酵母において、Sld2(synthetic lethal mutants of dpb11-1)とSld3がリン酸化されてDpb11(DNA polymerase beta)に結合することが複製の開始に必須であることがArakiらのグループにより初めて明らかにされた⁴⁾。このSld2-Dpb11-Sld3複合体が形成されると、MCMやDNAポリメラーゼがCdc45-GINSとも合わさってマルチ複合体を形成し複製が開始すると考えられている。

複製が開始したのち、一度複製された領域は、再度複製されないよう制御される。複製開始とともに、MCM2-7は、複製フォークにおいてヘリカーゼとして機能しながら、染色体上を移動する。この結果、複製された領域の複製起点は、非ライセンス化状態(post-RC, post-replicative complex)にもどり、この状態が、M期が終るまで維持される。つまり、ライセンス化が許される時期を、M期の終了時からG₁期にのみに限定することにより、細胞周期において再複製が抑制されるのである。では、細胞周期の進行過程でライセンス化はどのように制御されるのか？

3. CDKによる再複製の抑制制御

1991年、Nurseらは分裂酵母において、M期の開始に必

須なCdc2(分裂酵母のCdk1)がなくなると、G₂期の細胞が再びS期を繰り返すことを発見した⁵⁾。また、Cdc18(分裂酵母のCdc6オソログ)やCdt1を高発現すると、DNAが過剰に複製されることが示された⁶⁾。同様のことがほ乳類細胞でも見られる⁷⁾。これらのことから、CDKが再複製の抑制において重要な働きをすること、MCM2-7のローディングの制御が再複製の抑制において非常に重要であることが明らかとなった。S期が開始したのち、ORC, Cdc6, Cdt1, MCMのすべてのライセンス化因子がCDKによりリン酸化される。ほ乳類細胞では、サイクリンA-CDKによるリン酸化が、Cdt1のSCF^{Skp2}(Skp1-Cullin-F boxタンパク質; Skp2はF boxタンパク質の一つ)ユビキチンリガーゼによる分解、Cdc6の核外輸送をもたらす。Orc1も、SCF^{Skp2}依存的に分解されることが報告されている。また、酵母のCdc6は、出芽酵母ではF boxタンパク質Cdc4, 分裂酵母ではPop1を含むSCFによりユビキチン化を受け分解される。生物種によりライセンス化因子を抑制するしくみが少しずつ異なるが、CDKはS期の開始に必要であると同時に、ライセンス化を抑制する機能も併せ持っている。

前述のように出芽酵母では、CDKによるSld2とSld3のリン酸化が複製開始に必須である。遺伝学的操作により、CDKによるSld2とSld3のリン酸化をバイパスできるよう細工された株においては、G₁期の細胞が、CDKの活性化がなくてもDNA複製を行なうようになる。この場合、上述のCDKによるライセンス化の抑制制御が働かないので、この細胞では過剰複製が起こる⁴⁾。

4. CDKによらない再複製の抑制制御 —Cdt1を制御する多重な機構

酵母ではCDKによる抑制制御が基本となっているが、多細胞生物ではCDKによる抑制のみでは不十分で、CDKに直接依存しない抑制制御も獲得し、厳密に再複製を抑制している。これらの制御は、ライセンス化因子Cdt1をターゲットとする。Cdt1の機能を抑制する方法の一つはジェミニンの結合で、もう一つはDNA複製に依存したCul4-DDB1^{Cdt2}ユビキチンリガーゼによる分解系である。

1) ジェミニン

ジェミニンは、カエル卵抽出液を用いて、M期終了に関わるユビキチンリガーゼAPC/C(anaphase promoting complex/cyclosome)のターゲットの一つとしてクローニングされた。N末端にAPC/Cにより認識される破壊ボツ

クス (D (destruction) box) があり, M 期終了時にユビキチン化を受け分解される. 分解されない変異ジェミニンを抽出液に加えると DNA 合成が阻害されたが, これは, ライセンス化因子 Cdt1 の機能を阻害したことが明らかとなった. ジェミニンは中央部にあるコイルドコイル領域が相互作用して二量体を形成し, それが Cdt1 に結合して MCM2-7 のローディングを阻害する. ほ乳類細胞では, ジェミニンは細胞周期の S 期から出現し, M 期が終了するまで Cdt1 を抑制する. ある種のヒト細胞では, ジェミニンの発現を RNAi 法で抑制すると, 再複製が起こる⁸⁾.

2) Cdt1 の第 2 の分解系: 複製に依存した分解系

Cdt1 は, ジェミニンの結合以外に, 分解系によっても機能が抑制される. 前述のように CDK によりリン酸化された Cdt1 は, SCF^{Skp2} に認識されてユビキチン化される. ところが, Skp2 をサイレンシングした細胞でも, また CDK の認識部位 (Cy 部位) に変異を導入し SCF^{Skp2} に認識されない Cdt1 でも, S 期で問題なく分解されることが明らかになった. Cy 部位変異に加えて, N 末 10 アミノ酸領域にアミノ酸置換を導入した二重変異体を作製すると, 初めて Cdt1 が分解されなくなった. この N 末 10 アミノ

酸領域は種間で非常によく保存されており, PCNA 結合配列 (PIP-box: PCNA 結合タンパク質に共通に見られる配列) を含んでいた^{9,10)}. PIP-box に変異を導入したり, また PCNA の発現を押さえると Cdt1 の分解が抑制された. PCNA は, もともと DNA クランプと呼ばれるリング状の複合体で, そのリングに DNA を通すように染色体に結合し, DNA ポリメラーゼの機能を補助する因子として発見されたものである. PCNA の新しい機能として, 複製の開始とともに PCNA が染色体上にロードされると, Cdt1 の分解を引き起こすことが明らかとなった. この場合もユビキチン-プロテアソーム系が働く. これまでに, 線虫では, Cul4 をサイレンシングすると Cdt1 が安定化し再複製が起こること, また, ほ乳類細胞では UV などの DNA 傷害があると, Cdt1 は Cul4-DDB1 系によりユビキチン化されて分解されることが分かっていた. その後の研究により, Cdt2 と結合した Cul4-DDB1 ユビキチンリガーゼが, PCNA 依存性の複製とリンクした Cdt1 の分解に関わることが示された^{11,12)}. また, DNA 傷害後の分解にも関わる. PCNA が, Cdt1 と Cul4-DDB1^{Cdt2} を結びつける足場を作っているようである. このように, ほ乳類細胞において Cdt1 の MCM ローディング機能は, ジェミニンの結合に

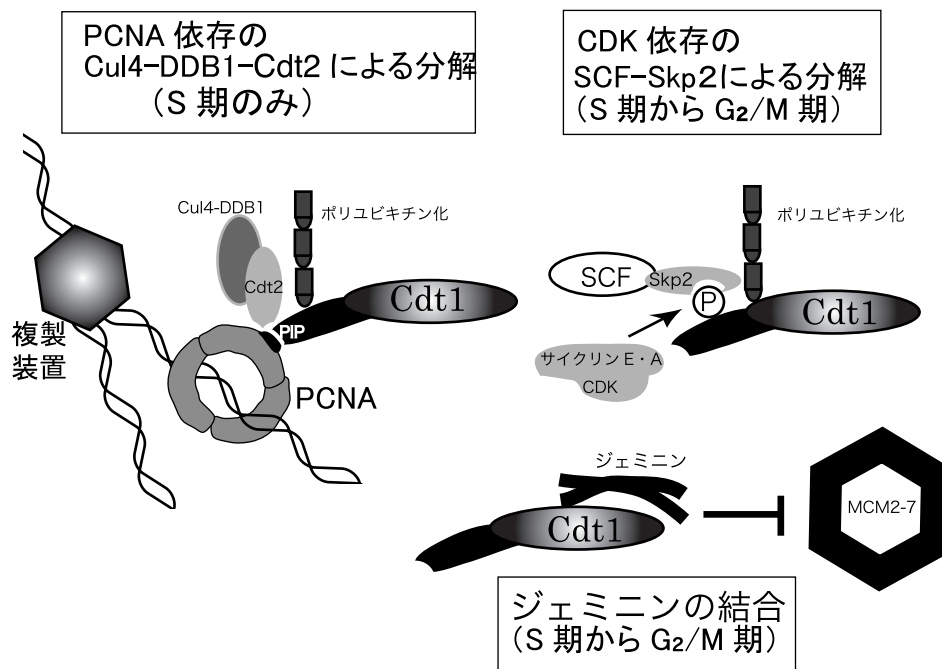


図 2 Cdt1 を抑制する三つの系

細胞周期において, 二つのユビキチン-プロテアソームによる分解系とジェミニンの結合による MCM のローディング阻害系が, それぞれ独立に働いて, Cdt1 は厳密に制御される. Cul4-DDB1^{Cdt2} は, UV 照射などを受けた場合にも Cdt1 の分解に関わる.

よる抑制と、独立して機能する2種類のユビキチンリガーゼ SCF^{Skp2} と Cul4-DDB1^{Cdt2} による分解により、多重な方法で厳密に制御されている (図2)。

5. ライセンス化の細胞周期制御

以上述べたようにライセンス化は、CDKによる抑制に加えて、ジェミニンの結合および複製とリンクした分解による Cdt1 の抑制により制御される。これらの制御は、細胞周期の進行とどのように相関しているのだろうか？細胞周期における染色体の複製と分配は、S-CDK と M-CDK の活性制御により正確に遂行する。これを可能にしているのは、タンパク質分解系である。APC/C は、M 期～G₁ 期において機能するユビキチンリガーゼで、サイクリン A およびサイクリン B を分解することで M 期を終了させる。また、同時にジェミニンも分解する。APC/C は、G₁ 期も働いているので、M 期の終了から G₁ 期においてライセンス化の抑制作用がなくなり、この時期のみライセンス化が可能となる (図1)。G₁/S 期になると、APC/C 自身が不活性化され、さらに、APC/C の作用を抑制する Emi1 (early mitotic inhibitor) と呼ばれる分子が出現する。その結果、サイクリン A やジェミニンが蓄積することが可能となり、ライセンス化が抑制される。また、複製の開始に伴い、PCNA 依存の分解系も作動する。複製が終了し M 期が開始すると Emi1 は分解され、APC/C も再び活性化される。サイクリンやジェミニンが分解されて抑制が解除され、次の周期のための複製の準備が始まる。実際、Emi1 の発現をサイレンシングすると、APC/C によるサイクリンおよびジェミニンの分解が通常の時期より早く起こり、その結果ライセンス化の抑制ができず再複製が誘導される^{13,14)}。

おわりに

細胞周期の基本は、親と全く同一の遺伝情報を持った二つの娘細胞を生み出すことである。そのための必要条件である細胞周期に染色体が一度だけ正確に複製される分子機構が、本稿で述べたようになり明らかになってきた。なかでも、Cdt1 の制御機構の解析により、ジェミニンによる抑制制御や複製とカップルした分解機構が明らかとなったことが注目される。この分解システムは、PCNA に依存しており、大腸菌で報告された RIDA と呼ばれる複製開始因子 DnaA の抑制機構と類似している点は興味深い¹⁵⁾。この系では、PCNA に対応する β クランプが、DnaA に結合した ATP の加水分解を促進することにより、DnaA が不活

性型となり再複製が抑制される。両システムで共通な点は、複製の開始とともに、開始に必須であった因子をフィードバック阻害することにより再複製を抑制する点で、非常に合理的な制御システムである。一方、PCNA は、染色体の複製やそれと連係したクロマチン形成に関わる多くのタンパク質と結合するが、なぜ Cdt1 のみ分解されるのかは未知のままである。また、UV などの DNA 傷害が起こったときに Cdt1 が分解される生物学的意義も分かっていない。ほ乳類細胞では、がん抑制因子 p53 や Rb タンパク質が再複製の抑制に関わっていることが報告されており^{7,16)}、これらの因子の変異と再複製による染色体不安定性の観点から、細胞のがん化との関わり合いが注目される。

- 1) Blow, J. & Laskey, R. (1988) *Nature*, 332, 546-548.
- 2) Ishimi, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 24508-24513.
- 3) Blow, J. & Dutta, A. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 476-486.
- 4) Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2007) *Nature*, 445, 328-332.
- 5) Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K., & Nurse, P. (1991) *Nature*, 349, 388-393.
- 6) Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., Nurse, P. (2000) *Nature*, 404, 625-628.
- 7) Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D.S., & Dutta, A. (2003) *Mol. Cell*, 11, 997-1008.
- 8) Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J., & Helin, K. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 473-482.
- 9) Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z., & Nishimoto, T. (2006) *EMBO J.*, 25, 1126-1136.
- 10) Arias, E.E. & Walter, J.C. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 84-90.
- 11) Jin, J., Arias, E.E., Chen, J., Harper, J.W., & Walter, J.C. (2006) *Mol. Cell*, 23, 709-721.
- 12) Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., Zhang, H. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 1277-1283.
- 13) Di Fiore, B. & Pines, J. (2007) *J. Cell Biol.*, 177, 425-437.
- 14) Machida, Y.A. & Dutta, A. (2007) *Genes Dev.*, 184-194.
- 15) Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., & Sekimizu, K. (1998) *Cell*, 94, 61-71.
- 16) Liu, E., Lee, A.Y., Chiba, T., Olson, E., Sun, P., & Wu, X. (2007) *J. Cell Biol.*, 179, 643-657.

西谷 秀男

(兵庫県立大学大学院生命理学研究科
生体情報Ⅱ)

Control of DNA replication: how to limit replication once in a cell cycle

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、

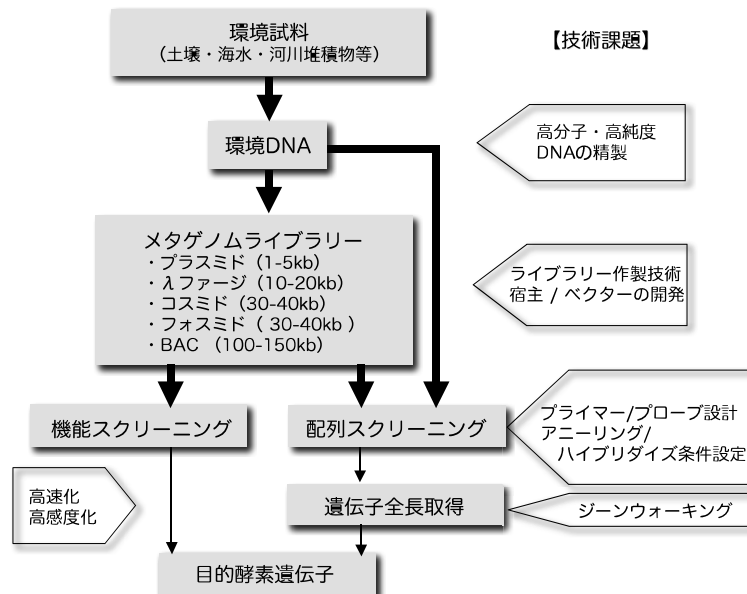


図1 メタゲノム解析の流れと各ステップにおける技術課題

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)。