

高温環境中の新規色素依存性脱水素酵素探索のための メタゲノム解析法の開発

研究代表者： 里村 武範（工学系部門・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学系部門・教授）

概 要	
	産業上有用な酵素資源として注目されている未培養超好熱性アーキアを新たな酵素スクリーニング源とするために好熱性アーキアを宿主とするメタゲノム解析の手法を確立することとする。これまでに難培養微生物由来の新規酵素のスクリーニング方法としてメタゲノム解析が行われ、既存の酵素には無い新規な酵素が数多く見つかっている。しかし、これまでのメタゲノム解析に利用されてきた宿主は大腸菌などの細菌由来のもので、産業用酵素として有用性が高い超好熱性アーキア由来酵素の探索が困難であった。本申請では、この課題を解決するために好熱性アーキアを宿主とした遺伝子組換え系を構築し、この実験系を利用することによって、これまでのメタゲノム解析で利用されてきた細菌の遺伝子組換え系では得ることができなかった全く新しい酵素を得ることを目的として研究を行った。
関連キーワード	メタゲノム、極限環境生物、耐熱性酵素、酸化還元酵素

研究の背景および目的

色素依存性脱水素酵素（Dye-DH）は、他の酸化還元酵素と異なり、基質の電子を人工のメディエーターを通して電極へ導入することが可能であることから、バイオセンサやバイオ電池用素子などの酵素機能電極用素子への利用に期待されている。しかし、これまで見出されている多くの Dye-DH は常温性細菌由来の酵素で、精製すると酵素の安定性が極端に低下してしまうため、酵素機能電極用素子への応用利用は限られていた。

近年、高温、幅広い pH 領域にも高い耐性を示す Dye-DH が超好熱性アーキアから報告され、酵素機能電極用素子として高い有用性を有していることが明らかとなった。

しかしながら、これまでに見出されている多くの超好熱性アーキアは、厳密な嫌気状態を必要としたり、水素ガスや炭酸ガスを要求するなど複雑な培養条件が必要な難培養性微生物である。このことから、現在発見されている超好熱性アーキアの種類も限られており、新たな超好熱性アーキア由来 Dye-DH を探索するのは非常に困難であり、酵素機能電極用素子としての応用利用も進んでいない。

そこで、難培養性なため、これまで発見が困難であった未培養超好熱性アーキアから産業用酵素

として有用な Dye-DH を得る新しい手段として、申請者が開発した好熱性アーキア *S. acidocaldarius* 遺伝子組み換え系を用いたメタゲノム解析を行うという着想を得た。これまでも環境試料中からメタゲノムを抽出し、有用酵素のスクリーニングを行う研究は多くの研究室で進められているが、メタゲノムの発現宿主が大腸菌のような細菌由来のものであることから細菌由来のタンパク質しかスクリーニングできない欠点があった。そこで、本申請では、申請者のグループが開発した好熱性アーキア遺伝子組み換え系を用いて高温環境中のメタゲノムスクリーニングを行う手法の確立を目的として研究を進めた。これまでの細菌を宿主としたメタゲノム解析では不可能であった未培養超好熱性アーキア由来酵素をスクリーニングできるということが本申請の最大の特徴である。アーキアの遺伝子組み換え系の開発は海外を含めても数えるほどの研究室しか成功しておらず本申請の最大の特徴である。

研究の内容および成果

難培養超好熱性アーキアから新規酵素をスクリーニングするために、まず、最初に高温環境からのメタゲノムサンプルの抽出方法の検討を行った。高温環境サンプルは長崎県雲仙温泉郷の温泉水を含む土壌（80℃～95℃，pH2.0～3.0）を採取した（図1）。採取した温泉土壌サンプルをガラスフィルターで濃縮しゲノム抽出を行った。抽出したメタゲノムサンプルを電気泳動し、高感度に遺伝子を染色できる SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain を用いてゲノムを確認したところゲノムサイズの遺伝子を確認することができた（図2）。しかしながら、非常に濃度が低いため、このままではクローニングが困難であると考えられたため、GenomiPhi V2 DNA Amplification Kitを用いてメタゲノムサンプル全体の増幅を行った。その結果、メタゲノムの増幅に成功しクローニング可能なレベルのゲノムサンプルを得ることができた（図2）。この増幅したメタゲノムサンプルを制限酵素処理し、一つのオープンリーディングフレームを含む2000から6000 bpの遺伝子断片を抽出しpUC18ベクターにクローニングし、インサート部分の配列を解析した。その結果、クローニングした遺伝子断片は、好熱好酸性アーキア由来の遺伝子であった。このことからクローニングできた遺伝子サンプルは、高熱、酸性環境の雲仙温泉サンプル由来のものであることが明らかとなり、本実験条件で高温環境からメタゲノムサンプルを抽出、クローニング可能であることが明らかとなった。

次に、大腸菌用プラスミド pUC18 にクローニングしたメタゲノム遺伝子断片を好熱性アーキア用プラスミド pSAV2 に導入した。このアーキア用プラスミドにメタゲノム遺伝子断片を挿入したプラスミドを *Sulfolobus acidocaldarius* SK1 株にエレ

クトロポレーションによって形質転換を行った。その結果、高温環境メタゲノムを含んだプラスミドをアーキアに導入することに成功した。以上の結果より、高温環境から採取したメタゲノムサンプルを抽出し、メタゲノム遺伝子をアーキア導入する実験系を確立することができた。

今後は、この確立できた実験系を用いてメタゲノムライブラリーを構築し、新規酸化還元酵素の各種色素依存性脱水素酵素の網羅的な探索を進める予定である。



図1. 長崎県雲仙温泉八万地獄での土壌サンプル採取の様子

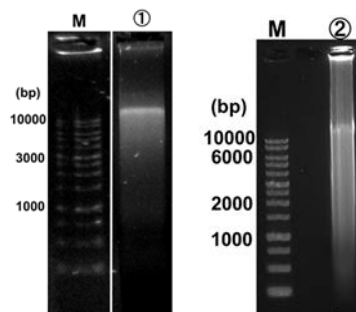


図2. 雲仙温泉サンプルより抽出したメタゲノム
①：土壌より直接抽出したメタゲノム
②：増幅したメタゲノム

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

本成果を極限環境生物学会で発表予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

長瀬科学技術振興財団研究助成に応募予定

「特記事項」

本研究資源で他大学との共同研究を行うこととなった。