

コンポストメタゲノムライブラリーの作製と セルラーゼ活性を有するクローンの検索

Construction of Compost-Metagenome Library and Screening of Functional Gene Encoding Cellulase

矢部 修平*, 関山 佳治, 進藤 斉, 小泉 武夫
SHUHEI YABE, YOSHIHARU SEKIYAMA, HITOSHI SHINDO and TAKEO KOIZUMI

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

* TEL: 03-5477-2379 FAX: 03-5477-2379

* E-mail: 60040003@nodai.ac.jp

Department of Fermentation, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku Tokyo 156-8502, Japan

(原稿受付 2006年12月14日/原稿受理 2007年1月8日)

Using DNA obtained from the metagenome of compost, we constructed a gene library. The percentage of plasmid with insert was approximately 96%. Approximately 5,000 clones in the library were screened for carboxymethylcellulase (CMCase) activity on the plate. One clone showed CMCase activity. Gene walking and DNA sequence analysis found one open reading frame (ORF) of 1,125 bp in the cloned fragment and ORF was designated ORF-1. Putative product of ORF-1 was not similar with any cellulase genes, but showed 46% similarity to DNA modification methylase from *Simbiobacterium thermophilum*. The ORF-1 product possesses glycosyl hydrolase family 16 sequence motif which is thought to be involved in endo-1,3(4)- β -glucanase activity. This motif was not detected in the proteins showing similarity to the ORF-1 product. These results suggest that ORF-1 is a novel CMCase gene.

Key words: Compost, metagenome, CMCase, uncultured bacterium, Congo Red assay

キーワード: コンポスト, メタゲノム, CMCase, 未培養細菌, コンゴレッドアッセイ

1. 緒 言

環境細菌中で平板培養などの方法を用いて容易に培養できるものは約1%未満とされており¹⁾, 既知の酵素遺伝子の他に自然界には未知酵素遺伝子が多々存在することが予想される。近年, 環境中の遺伝子を非培養的に直接抽出してそのDNAライブラリーを作製するメタゲノムライブラリー法により新規機能遺伝子が取得されている。特に土壌を遺伝子源とした報告が多く¹⁰⁾, 新規のプロテアーゼやアミラーゼなどが獲得されている^{4,9)}。

土壌中では糞尿, 枯草や死骸などの有機物が長年かけて分解されるが, コンポスターでは有機性廃棄物が短期間で分解されるため, 有機物分解に必要な酵素遺伝子が豊富に含まれていると予想される。しかし, フミン酸などの酵素反応阻害物質が土壌よりも多量に含まれているため²⁾ メタゲノムライブラリーの作製はほとんど報告されていない。そこで本研究では, まず第一にコンポストのメタゲノムライブラリー作製を目的とした。

一方, 著者ら¹²⁾ は, これまでスクープ式コンポスター(ハザカプラント社製)中で, 発酵初期に完熟コンポストを一部回分的に添加するとその発酵熱で品温が80°C以上に達し, その結果原料由来の大腸菌群などが死滅, 構成細菌群が安定し, 衛生的なコンポストを半連続かつ

継続的に約25日間隔で生産可能にしていることを報告した。

また同コンポスターは, 難分解性糖類であるセルロース類も熱によって膨張軟化することで発酵初期から急速に分解される特徴を有することを明らかにするとともに, 品温の変化や水分含有量の低下, pHの上昇, 有機物含量の低下, また有機物組成の変化に伴って優占菌が遷移し, 発酵初期, 中期, 後期とも *Firmicutes* 門の分子系統的に異なる *nonculturable bacteria* が優占することを見出した(投稿中)。

これらのことから半連続操作により様々な有機物処理に馴養されたこの完熟コンポストは特に安全であり, かつ *nonculturable bacteria* 由来の難分解性糖類加水分解遺伝子資源として有効であると思われる。

そこで本研究ではコンポストメタゲノムライブラリーの作製に次いでセルラーゼ活性を有するクローンを検索し, 新規セルラーゼ遺伝子の獲得を試み, 作製ライブラリーの妥当性の評価を行った。

2. 材料および方法

2.1. DNA抽出と限定分解条件の検討

完熟コンポスト0.5gのDNAをISOIL(ニッポンジー

ン社製)を用い抽出し, 0.25% Agarose H (ニッポンジーン社製)を用いたアガロースゲル電気泳動にて高分子 DNA を取得した。次に抽出した高分子 DNA 1 µg に対して *Sau3AI* を 1/8-2 U まで段階的に変化させて限定分解した 5 µl 反応液のパイロット実験で, 1つの酵素をコードするのに必要十分な長さである 2~10 kbp 付近にバンドが強く検出される条件を検討した。

2.2. コンポストメタゲノムライブラリーの作製

パイロット実験によって決定した限定分解最適条件で 25 倍スケールにて限定分解を行い, 電気泳動後, ゲルから GENEPURE (ニッポンジーン社製)を用いて 2~10 kbp の DNA 断片を抽出・精製した。その精製産物を λ ファージ系ベクターである ZAP Express (*Bam*HI) Vector (ストラタジーン社製)にライゲーションさせ, ZAP Express Gigapack Gold Cloning Kit (ストラタジーン社製)を用い *in vitro* Packaging を行った。そのタイターチェックをブルー・ホワイトセレクションと同時にを行った。このライブラリーの増幅を行い, ファージライブラリー液から ZAP Express Vector の pBK-CMV Phagemid Vector を *mass in vivo excision* により切り出した。なお, ライゲーションから以上までの操作はすべてキット付属のプロトコールに従った。切り出した phagemid 溶液 1 µl と 200 µl の *Escherichia coli* XL0LR 株 培養液 (10 mM MgSO₄ に OD₆₀₀=1.0 に懸濁)に混合し, 37°C にて 15 min アタッチメントさせた後, 40 µl の 5×NZY broth を加え, 37°C で 45 min 培養した。次に 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム塩 (以下 CMC) およびカナマイシンを含む Luria-Bertan 寒天培地に発現誘導物質である 0.5 M イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) 溶液 15 µl を塗抹し, 培養液 100 µl を塗布した。これを 37°C で 1 晩培養し, インサート DNA の平均サイズを求めるため, 無作為に選択した 20 クローンのプラスミドを QIA prep Spin Miniprep Kit を用いて抽出し, それを *Bam*HI にて切断後, 0.8%アガロースゲル電気泳動にて挿入断片のサイズを測定した。

2.3. CMCCase 活性を有するクローンの検索

1,4-(1,3;1,4)-β-D-グルカン 4-グルカノヒドロラーゼ (E.C. No. 3.2.1.4.) 活性を有するクローンは, カルボキシメチルセルラーゼ (CMCase) 活性を指標にスクリーニングした。スクリーニング手法は以下のとおりである。0.7% (w/v) アガロース溶液を形質転換株のコロニーが形成した寒天プレートに約 10 ml 重層した。15 min 室温で静置後, 0.1%コンゴレッド溶液を用いて染色, 1 M NaCl 溶液で 30 min 洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。CMCase 活性によりコロニー周辺に薄黄色のクリアゾーンを形成したコロニーをスクリーニングした。

2.4. インサート DNA 配列の解読及び解析

クリアゾーン形成クローンのプラスミドを抽出し, ベクター固有の pBK-CMV M13 プライマーと pBK-CMV BK リバースプライマーを用い BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製)でシーケンシング反応を行った。そして, ABI PRIZM310 AUTO SEQUENCE ANALYZER にて挿入断片の DNA

塩基配列を解読した。

2.5. ジーンウォーキングによる 3' 末端の解読

完全長の CMCCase 活性を有していると推察される ORF (ORF-1) を取得するため, TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit (タカラバイオ社製)を用いて 3' 領域のジーンウォーキングを行った。即ち, 完熟コンポストから抽出した高分子 DNA 5 µg を *Bam*HI (50 U) で処理後, キット付属の *Bam*HI サイトが付加されたオリゴヌクレオチド (*Bam*HI カセット) とライゲーションさせ, そのライゲーション溶液を鋳型にカセット配列に特異的なキット付属のプライマー C1 と ORF-1 配列中の 173-196 bp (5'-ATGGTCGAGGTGTTCCGGGAAGTG-3') のプライマー S1 を用いて一次 PCR を行った。その一次 PCR 溶液を鋳型にカセット配列中でプライマー C1 より下流に位置するキット付属のプライマー C2 と ORF-1 配列中の 390-419 bp (5'-TCGCGTTACAAGCCGACGGCTGG-TATCTGC-3') のプライマー S2 を用いて二次 PCR を行った。更に, プライマー S2 と ORF-1 配列中の 997-1021 bp (5'-AGGAATCGTCTCGACCCGTTTTT-3') のプライマー S3 を用いて二次 PCR 溶液を鋳型に三次 PCR を行い, それぞれの PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。すべての PCR 条件は最初の変性 94°C, 2 min 保持した後, 変性 95°C:30 sec, アニール 60°C:30 sec, エクステンション 72°C:2.5 min の処理を 30 サイクル行い, 最後に 72°C, 5 min 反応させた。三次 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後, ゲルから特異的バンドを QIAEXII Gel Extraction Kit (キアゲン社製)にて抽出・精製し, その DNA 溶液を pGEM-T Easy Vector (プロメガ社製)をベクター *Escherichia coli* DH5α を宿主として TA クローニングした。そしてクローニング断片の配列を解読した。

2.6. ORF-1 の高発現

解読した完全長 ORF を高発現ベクターである pGEX4T-1 へ導入した。まず, コンポストから抽出した高分子 DNA を鋳型にクローニングのための *Bam*HI サイトを付加したプライマーにて完全長 ORF-1 を PCR により増幅させた。プライマー配列は 5'-CGTGGATCC-GTGAAAAACGTAATACTCCAGGGTGA-3' フォワードプライマー)と 5'-CGTGGATCCTCATTTTTCCCGCCTC-CAATCTCTTTT-3' (リバースプライマー)であり, *Bam*HI サイトをアンダーラインで示した。アガロースゲル電気泳動で分画・抽出精製した 1.2 kb の PCR 増幅産物と pGEX4T-1 ベクターを *Bam*HI で処理し, ライゲーションした。そのライゲーション溶液により XJb Autolysis *E. coli* 株 (ザイモリサーチ社製)を形質転換し, 100 µg/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗抹した。ポジティブクローンのプラスミドを抽出し, インサート DNA を解読して読み枠が正常であることと配列が ORF-1 と一致していることを確認した。ここで得られた組み換えプラスミドを pGEX orf-1 と命名した。XJb Autolysis *E. coli* (pGEX orf-1) を 100 µg/ml アンピシリンと 1.5 µM アラビノースを含む LB 液体培地 2 ml に接種し, 37°C, 150 rpm で 1 晩前培養後, 同培地 200 ml に培養液全量を添加し, 同様に培養後, OD₆₀₀ が 0.6 に

なった時点で終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加し、引き続き 3 時間培養した。培養液を 7,000×g, 4°C で 10 min 遠心分離して集菌後、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) にて 2 回洗浄して、同緩衝液 4 ml に懸濁した。その菌体懸濁液を -80°C と 37°C にて凍結、融解を 3 回繰り返し、18,000×g, 4°C で 10 min 遠心分離して、その上清 (菌体抽出液) を得た。なお、宿主の XJb Autolysis *E. coli* 株はアラビノースオペロンのプロモーター直下の *araB* が λ -ライソザイム遺伝子に置換されているため、アラビノース存在下でライソザイムが誘導され、凍結融解によって自己融解が起こる。

2.7. 発現タンパク質の精製及び SDS-PAGE

得られた菌体抽出液を MicroSpin GST Purification Module (アマシャムバイオサイエンス社製) によりグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)-ORF-1 融合タンパク質を精製した。実験操作は付属のプロトコールに従った。次に得られた精製 GST-ORF-1 融合タンパク質と菌体抽出液を 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を Laemmli⁷⁾ の方法に従って行った。ゲルはクーマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。また、コントロールとして、pGEX4T-1 ベクターのみを XJb Autolysis *E. coli* 株に形質転換したものについても同様の操作を行った。

2.8. CMCCase 活性の測定

CMCase 活性は菌体抽出液および精製 GST-ORF-1 溶液 50 μ l をそれぞれ 0.5% CMC を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) 200 μ l に添加し、37°C で 30 min 反応させ生成された還元糖をジニトロサリチル酸法⁸⁾ にて測定することにより算出した。なお 1 μ mol の還元糖を生成する酵素量を 1 unit とした。また、タンパク質含量は Protein Assay Rapid Kit (和光社製) を用いて測定した。コントロールについても同様の操作を行った。

2.9. ORF-1 遺伝子産物の相同性検索及びマルチアライメント解析

ORF-1 遺伝子産物のアミノ酸配列の相同性検索を BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にて行った。また相同タンパク質とのマルチアライメント解析を CLUSTALW analyzing system (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) で行った。またモチーフ検索を MOTIF search (<http://motif.genome.jp/>) で行った。

3. 結果と考察

3.1. DNA の最適限定分解条件

限定分解のパイロット実験の結果、Fig. 1 に示したように *Sau3AI* の濃度依存的に限定分解度合いが増加した。このことから、本キットを用いることによって夾雑物が多く含まれるコンポスト中からでも抽出後に別の精製過程を経ずに制限酵素反応が可能であることが示唆された。本キットはこれまで困難とされてきたフミン酸を多量に含む火山灰土壌からの DNA 抽出が可能なることを特徴としており、付属の抽出液は組成及び pH が、効率よくフミン酸を除去し DNA を抽出できるように調整さ

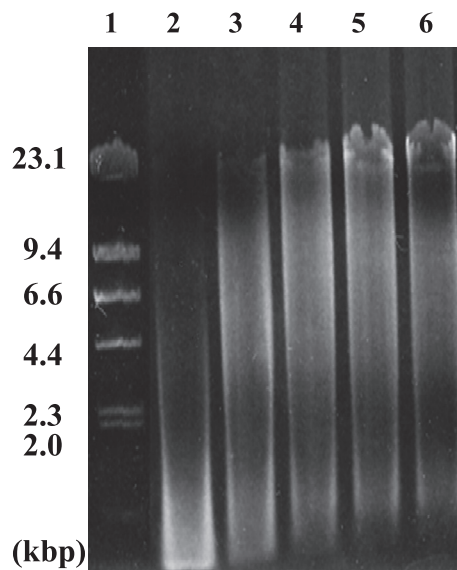


Fig. 1. Optimization of *Sau3AI*-partial digestion of compost-DNA.

Lane 1, λ *HindIII*-digested maker Compost-DNA was digested with *Sau3AI* at 2 unit (lane 2), 1 unit (lane 3), 1/2 unit (lane 4), 1/4 unit (lane 5) and 1/8 unit (lane 6) at 37°C for 1 h.

れている。よってコンポストからも酵素反応を阻害しない高分子 DNA が抽出可能であったものと推察した。なお、DNA 抽出時にビースによる攪拌工程が有る他のキットを使用した場合、DNA が物理的に切断されてしまい、制限酵素反応が進まなかった (未発表)。*Sau3AI* を 1 unit で 37°C, 1 h 反応させることによって 2–10 kbp 付近の限定分解 DNA が多くなることから、これを最適条件とした。

3.2. コンポストメタゲノムライブラリーの作製

作製したライブラリーのタイターは 6.8×10^6 pfu/ml、インサート効率は 96% であり、Gigapack Gold packaging extract (ストラタジーン社製) を用いた際の子組組換えプラーク数である 1.0×10^6 – 1.5×10^7 の範囲内に達した。よってコンポスト DNA からの良質なメタゲノムライブラリーの作製に成功したと考えられた。また、挿入断片の平均長は 7.0 kbp であった。メタゲノムからベクター由来プロモーターを用いて発現を期待する場合、インサートサイズは 5–10 kbp が効率的だと考えられている⁷⁾ ため、このライブラリーは機能遺伝子を探るのに適していると考えられた。

3.3. CMCCase 活性を有するクローンの検索

約 5,000 クローンから 1 クローンを得た。そのコロニー写真を Fig. 2 に示した。 λ ZAP システムを用いて作成した湖由来のメタゲノムライブラリーに対してコンゴレッドアッセイでスクリーニングした場合、36,000 クローン中 1 クローンがポジティブクローンであったと報告されている⁶⁾。この報告と比較すると、今回の研究では比較的高確率で CMCCase 活性を有するクローンが取得できたと考えられる。この原因は本コンポストの原料が牛糞、剪定屑や食品残渣など主要糖類がセルロースであるためと考えられた。



Fig. 2. Screening for cellulase activity using Congo red assay on agar plate.

(a) positive recombinant clone, (b) control strain (*E. coli* XL0LR [pBK-CMV]).

3.4. インサート DNA 配列の解釈と解析

得られた DNA 塩基配列について Open Reading Frame Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) により ORF を検索したところ、1,632 bp の挿入断片中に 1,125 bp の 3' 末端領域を欠いた読み取り枠 (ORF) が見いだされた (Fig. 3)。Shine-Dalgarno 配列の存在と相同タンパク質との位置関係から推察し、インサート塩基配列の開始から 508 番目の GTG が開始コドンであると推定した。この 375 アミノ酸残基の産物をコードする ORF を ORF-1 と命名した。ORF-1 は pBK-CMV の *lacZ'* 配列由来の終止コドンとフレームが一致している。おそらくその融合蛋白質が CMCCase 活性を発揮しているものと推察された。

3.5. ジーンウォーキングによる ORF-1 の 3' 末端の解釈

ジーンウォーキングの PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 4 に示した。これより一次、二次 PCR は明確なメインバンドが認められないが、三次 PCR 産物には約 200 bp にメインバンドが認められた。この遺伝子断片を解釈した結果、ORF-1 の配列と一致し、更に 32 bp 下流の解釈に成功した。終止コドンは ORF-1 の最後のコドンである Lys の次に認められた (Fig. 3)。これにより、完全な ORF-1 を得ることに成功した。

3.6. ORF-1 の高発現・精製及び CMCCase 活性

XJb Autolysis *E. coli* (pGEX orf-1) の菌体抽出液及び MicroSpin GST Purification Module 似て精製後の GST-ORF-1 融合タンパク質の SDS-PAGE を行ったところ、Fig. 5 に示したように GST (26 kDa) と ORF-1 (41.9 kDa) の融合タンパク質である 67.9 kDa 付近に単一バンドが確認できたため、正常に GST-ORF-1 融合タンパク質が発現し、精製されたことが確認された。

菌体抽出液及び精製 GST-ORF-1 融合タンパク質の CMCCase 活性を測定した結果、Table 1 に示したようにコントロールにはほとんど認められない CMCCase 活性が、精製後の GST-ORF-1 融合タンパク質に認められた。よって ORF-1 産物が CMCCase 活性を有することが証明

1	AGA ACT GGA GGA AGG AAT CCG AGA CAT TAT TAG GAG GGC TCA AGG	45
46	ATG AAG AAA AAA CGT CCG ATC TAT GTA CGC AAC GCG CCG GAT TTT	90
91	TAC CCG GCG CGA CCG ATC CCC TAT GAA TGC GAC TAT TGC GGG GAG	135
136	GAC CCG GCG CAT ATG TTC AAC TTC AAG GAC ACC GTT CGC TGC	180
181	AAA GTT TGT TGG GGG AAA GCT CCG GAG GTG AGC GAC CAA TGA TTT	225
226	TGC TCG GAG CCG TGG CCG TGT TGT TGT CCG GTA TGA TTA TCG GGG	270
271	CTT ACA AGT ATG ACG GAG GAG GTC GAG TGA TGA GCC TAG CCT GGC	315
316	TTC GAC GAA TAA TGG TTT TCG GGG CCG TGC TGT GGG TGG TCA CTC	360
361	TGA TTT TTG GCG ACG ACA CGC AGC TGG CCC GCG ATA TTC TCA ACA	405
406	TCT TGA ACT TTA TTG GTA TCG CGA TGA CCG TGC ATA TCC TCA CTA	450
451	ACA TCG TGA TCG AGG AGG ACG ATT AAC TTA TAA GAT GCT TGG GGA	495
496	<u>GGA GGC GGA GCA</u> <u>GTG</u> AAA AAC GTA ATA CTC CAG GGT GAC GTA ATC	540
1	V K N V I L Q G D V I	11
541	GAA GCC CTT CGT TCC CTG CCG GAT GGT TTT GTT CAT ACT GGC GTT	585
12	E A L R S L P D G F V H T C V	26
586	ACT TCG CCG CCG TAT TGG GGC CTT CCG GAT TAT GGT GTG GAG GGC	630
27	T S P P Y W G L R D Y G V E G	41
631	CAG ATT GGC CTC GAA CCG ACG CCG GAA GAA TAC ATC GAA AAG ATG	675
42	Q I G L E P T P E E I E K M	56
676	GTC GAG GTG TTC CCG GAA GTG CCG CCG GTG TTG CCG GAT GAT GGG	720
57	V E V F R E V R R V L R D D G	71
721	ACA TTA TGG TTG AAT TTA GGG GAT TCG TAT GTG GGG AGC GGA AAG	765
72	T L W L N L G D S Y V G S G K	86
766	GGA CCG AGC GGA AAA TCG GCG AAA GTT CAC GCC ACC AAA GAC GGG	810
87	G P S G K S A K V H A T K D G	101
811	CGG GAA ACA ATG AAT AAT CGA GTT GTT CCT TAC GGT CTC AAA CCA	855
102	R Q T M N N R V V P Y G L K P	116
856	AAA GAC CTT GTC GGA ATC CCT TGG CCG GTT GCG CTC GCG TTA CAA	900
117	K D L V G I P W R V A L A L Q	131
901	GCC GAC GGC TGG TAT CTG CCG TCT GAT ATT ATC TGG CAC AAG CCG	945
132	A D G W Y L R S D I I W H K P	146
946	AAC GCG ATG CCG GAA AGC GTA AAA GAC CCG CCG AAG GCG CAC	990
147	N A M P E S V K D R P T K A H	161
991	GAA TAT ATT TTC CTG TTG TCG AAG TCG CCG CGA TAT TAC TAC GAC	1035
162	E Y I F L L S K S P R Y Y D	176
1036	GCG GAC CCG ATA CCG GAG GAT CCG ATA TAT CAG GAA AAA AGA AAT	1080
177	A D A I R E D A I Y Q E K R N	191
1081	GGG CGT GTC GGG GCG TAC CAA AAT AGA GCG ATT TTC CAT AAG GGA	1125
192	G R V G A Y Q N R A I F H K G	206
1126	GAC GGG ACA ACG CCA ACG GGT GTA GCT ACT AGG GAT TTA AGC AAG	1170
207	D G T T P T G V A T R D L S K	221
1171	CGC AAC AAG CCG ACC GTC TGG TCC ATC CCG ACA AAA CCT TTT AAA	1215
222	R N K R T V W S I P T K P F K	236
1216	GGC GCG CAC TTC GCC GTG TTC CCG CCG GAC CTT ATC GAG CCA TGC	1260
237	G A H F A V F P P D L I E P C	251
1261	ATT TTG GCC GGG TCG CCG GAA AAG GCA TGC CCG CAT TGC GGT GCG	1305
252	I L A G S P E K A C P H C G A	266
1306	CCG TGG GAG CCG GTG ACG GGA AGA AAA ACG ATC AAT AAA GAA GGA	1350
267	P W E R V T G R K T I N K E G	281
1351	TGG GGG CCT TCT AAA AAG AAT CAC CCG GAG TAT CTG GGG GAA GAA	1395
282	W G P S K K N H R E Y L G E E	296
1396	ACA ATT TTC AAA AAC GGT TAC GGG CCG GCT GGT GAT CCG ATT GTT	1440
297	T I F K N G Y G A G D P I V	311
1441	TAT ACC ATC GGA TGG AAA CCG ACC TGC CAA TGC GAA GGC AAC GAC	1485
312	Y T I G W K P T C Q C E G N D	326
1446	GGA AGC GGG CGA GGA ATC GTC CTC GAC CCG TTT TTT GGC AGT GGT	1530
327	G S G R G I V L D P F F G S G	341
1531	ACG ACG GGT CTG GTG GCA CAA AAG CAC GCA CCG GAC TGG GTC GGA	1575
342	T T G L V A Q K H G R D W V G	356
1576	ATC GAA CTC AAT CCC GAA TAT ATC GAA ATC GGG AAA AAG AGA TTG	1620
357	I E L N P E Y I E I A K K R L	371
1621	GAG GCG GGA AAA <u>TGA</u> ATT CTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CCG	1665
372	E A G K *	375

Fig. 3. Nucleotide sequence of the inserted fragment in the recombinant plasmid from the CMCCase-positive clone. Number of the either side indicates nucleotide position. Single-letter abbreviations for amino acids are listed beneath the first base in each codon. Potential Shine-Dalgarno sequences are underlined. Gene walking sequences are doubly underlined. Start codon and stop codon are marked with open boxes. (Accession No. AB286874)

された。

ORF-1 遺伝子産物のアミノ酸配列の相同性検索の結果、セルラーゼ系の酵素の配列とは相同性を示さなかった。しかし面白いことに DNA メチラーゼと相同性があった (Table 2)。*Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 由来の putative DNA modification methylase M. SthI と最も高い相同性 (46%) を示した。*S. thermophilum* は堆肥から分離された好熱菌 *Geobacillus toebii* の共生細菌であり⁸⁾、単独での分離は困難である。相同性がそれほど高くないため、相同性から由来菌の特定はできないが、ORF-1 の産物が未知タンパク質であること

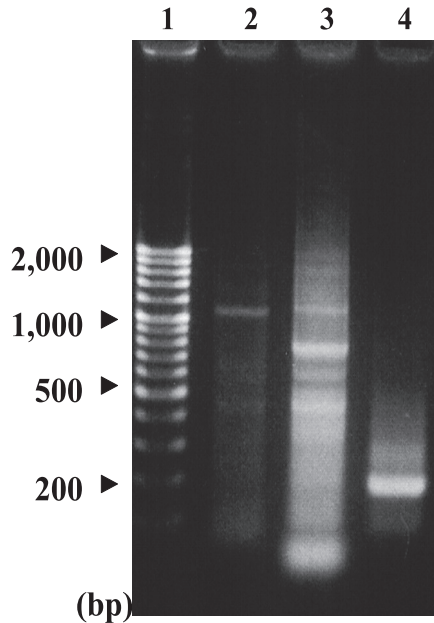


Fig. 4. PCR products from three nested PCR for obtaining the 3' end of ORF-1.

Lane 1, One step ladder 100 marker [Nippon gene]; lane 2, 1st PCR products amplified from compost direct extraction DNA/EcoRI cassette library with C1 and S1 primer; lane 3, 2nd nested PCR products amplified from 1st PCR products with C2 and S2 primer; lane 4, 3rd nested PCR products amplified from 2nd nested PCR product with C2 and S3 primer.

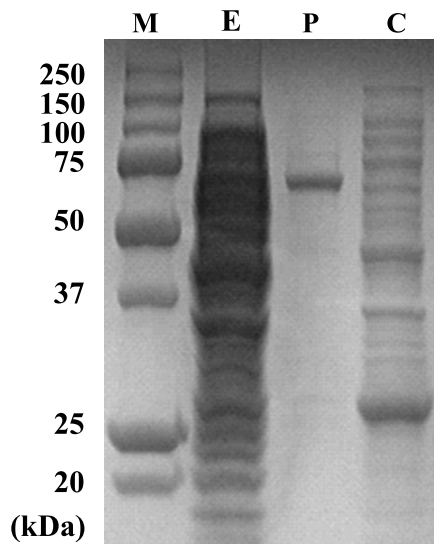


Fig. 5. Overexpression in XJb Autolysis *E. coli* (pGEXorf-1) and purification of GST-ORF-1 fusion protein.

Lane M, Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad); lane E, Crude soluble protein from XJb Autolysis *E. coli* (pGEXorf-1); lane P, Purified GST-ORF-1 fusion protein; lane C, Crude soluble protein from XJb Autolysis *E. coli* (pGEX 4T-1) (control).

が示唆された。

相同性が見いだされた *S. thermophilum* IAM 1486 M. SthI, *Desulfotomaculum reducens* MI-1 M. SthI および *Citrobacter freundii* シトシン-4-メチルトランスフェラー

Table 1. CMCase activities of GST-ORF-1 fusion protein produced in pGEX4T-1 *E. coli* expression system.

Sample	Protein (mg/ml)	CMCase specific activity (U/mg)
pGEX4T-1 control (induced, no insert)	1.179	0.004
Crude soluble protein from pGEX4T-1/GST-ORF-1	2.354	0.057
Purified GST-ORF-1 fusion protein	0.346	0.247

Table 2. Homology of the putative ORF among with other homological proteins.

Relative genes	Origin	Identity
Putative DNA modification methylase M. SthI	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM14863	171/370 (46%)
Putative DNA modification methylase M. SthI	<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	158/371 (42%)
Putative DNA (Cytosine-4)-Methyltransferase	<i>Citrobacter freundii</i>	156/369 (42%)

ゼとマルチアライメント解析の結果, Fig. 6 に示したように, ORF-1 産物のアミノ酸 258-329 番目までの配列は, 相同な DNA メチラーゼタンパク質では完全に欠失していた。DNA メチラーゼで欠失が見られた ORF-1 産物の領域についてモチーフ検索した結果, この配列中に糖質加水分解酵素に特有なモチーフ, ファミリー 37 と 16 が見いだされた。このファミリー 37 はトレハロース特有のモチーフであり, ファミリー 16 はエンド-1,3(4)-β-グルカナーゼやリケニナーゼ (licheninase) などのモチーフである。したがって, ファミリー 16 モチーフが ORF-1 産物の CMCase 活性に寄与しているのかもしれない。類似した例として, *Bacillus cereus* 由来リン脂質分解酵素に DNAaseI の触媒活性に関与する重要なアミノ酸残基だけが分子進化的に保存されていたため DNAaseI 活性も示したという報告もある¹¹⁾。一般的に, 長い年月の中で, ある酵素遺伝子に点突然変異が蓄積したり, 他の遺伝子との組み換えが起こるなどして, その遺伝子産物は異なった酵素特性や他の活性を持つようになると考えられている。コンポストは様々な微生物が存在し, その世代交代も激しいため, 分子進化速度もまた速いと考えられる。本研究で得られた ORF-1 の産物は, もしかすると, 本来 DNA メチラーゼであったものが, 難分解性糖質が多いコンポストの環境の中で急速に分子進化し, CMCase 活性を獲得していったのかもしれない。この考えを検証するためにも, ORF-1 産物中のファミリー 16 モチーフが CMCase 活性に必須であることや, また, DNA メチラーゼにこのモチーフを付加することにより CMCase 活性も付与できるかについて実験的に検討する必要がある。

以上より, 夾雑物の多く含まれるコンポストから良質なメタゲノムライブラリーの作製を可能とした。また, その中からプレート上で CMCase 活性を有し, 他のセルラーゼとの相同性が無い未知遺伝子の獲得に成功し,

STM	—RNRRSVWHINTQPNKEAHFAVFPPTLVEPCI LAGSKP—	232
CFM	—RNRRTVWVNTKPFAGAHFATFPTTELIRPCILASTKP—	245
DRM	—RNKRTVWVNTQGFKAHFATFPPELIVPCI KAGSKV—	241
<i>cel-meta</i>	DLSKRNRKRTVWSIPTKPFKAHFVFPDDLIEPCILAGSPEKACPHCGAPWERVTGRKTI	277
	*** ** * **** * ** *	
STM	-----GDYVLDPF	240
CFM	-----GDYVLDPF	253
DRM	-----NDFVLDPF	249
<i>cel-meta</i>	<u>NKEGWGSPSKNHREYLGEETIFKNGYGRAGDPIVYTI GWKPTCQCEGNDGSGRGIVLDPF</u>	337
	A B *****	
STM	LGS GTTAVVCQNLDRKYVGI ELNPEYIQI AVKRLTSILTEAPQVTKVVI-	289
CFM	FGSGTVGVVCCQEDRQYVGI ELNPEYVDI AVNRLQGEDTNVIRIAAA--	300
DRM	FGSGTVGVVCCNELSRRYIGIEISQEYIEMATORIINTEYAEEEGRKCNEL	299
<i>cel-meta</i>	FGSGTTGLVAQKHGRDWVGI ELNPEYIEIAKKRLEAGK-----	375
	**** * * *** ** * *	

Fig. 6. Comparison of amino acid sequences between the ORF-1 product and putative DNA methylases from *Pseudomonas syringae* (STM), *Citrobacter freundii* (CFM) and *Desulfotomaculum reducens* (DRM).

Number of the light side indicates amino acid position. Identical amino acid residues are indicated by asterisks. Underline (A) is glycosyl hydrolase family 37 and under line (B) is glycosyl hydrolase family 16.

作製ライブラリーは高温コンポストに特徴的な未知機能遺伝子を獲得できることを明らかにした。

4. 要 約

フミン酸などの夾雑物が多量に含まれるコンポストを遺伝子資源として、メタゲノムライブラリー作製を試みた結果、組換えプラーク数が理論値に達したため良質なライブラリーの作製に成功した。よって本方法を用いて他のコンポストからでもライブラリー作製が可能であることが示唆された。

また、Mass *in vivo* Excision 後の *E. coli* XLOLR 株形質転換ライブラリーより、5,000 クローンをスクリーニングした結果プレート上で CMCase 活性を有するコロニーを1クローン獲得した。そのインサート配列を解読した結果、375 aa の ORF-1 が存在した。これは不完全長であったためジーンウォーキング法にて完全長 ORF-1 を取得した。最も高い相同性を示すタンパク質は *Symbiobacterium thermophilum* IAM14863 由来 putative DNA modification methylase M. SthI であり、相同性は46%の未知酵素タンパク質であることが示唆された。この ORF-1 のみを高発現ベクター pGEX 4T-1 に連結後、XJb Autolysis *E. coli* 株に形質転換され IPTG による誘導によって ORF-1-GST 融合タンパク質を発現させ、精製した。この精製 ORF-1-GST 融合タンパク質に CMCase 活性が認められたため、ORF-1 が CMCase 活性を示すことを証明した。この1次構造中にはセルラーゼに関与する糖質加水分解酵素ファミリー16が存在し、相同タンパク質中にはこのモチーフが完全に欠失していたため、この存在によって CMCase 活性を有した可能性が考えられた。以上より作製ライブラリーは高温コンポストに特徴的な未知機能遺伝子を獲得できることを明らかにした。

文 献

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- Fabrizio, A., G. Pierluigi, T. Fulvia, and M. Enzo. 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65: 1414–1418.
- Helen, C.R., G. Susan, J. Brian, D.G. William, and H. Shaun. 2003. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* 7: 415–421.
- Yun, J., S. Kang, S. Park, H. Yoon, M.-J. Kim, S. Heu, and S. Ryu. 2004. Characterization of a novel amyolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7229–7235.
- Lammler, M.L. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426–428.
- 永田祐二, 津田雅孝. 2005. メタゲノムの発想に基づいた新規環境汚染物質分解酵素遺伝子へのアプローチ. *化学と生物.* 43: 33–42.
- Ohno, M., H. Shiratori, M.J. Park, and Y. Saitoh. 2000. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *J. Sys. Evol. Microbiol.* 50: 1829–1832.
- Santosa, D.A. 2001. Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies. *Mol. Biotechnol.* 17: 59–64.
- 竹山春子, 横内裕子, 松永 是. 2005. 未開発遺伝子資源へのアプローチ: 可能性と限界, *化学と生物.* 43: 199–208.
- Tamura, H., K. Tameishi, A. Yamada, M. Tomita, Y. Matsuo, K. Nishikawa, and H. Ikezawa. 1995. Mutation in aspartic acid residues modifies catalytic and haemolytic activities of *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochem J.* 309: 757–764.
- 矢部修平, 吉田直人, 進藤 斉, 角田潔和, 葉坂 勝, 小泉武夫. 2006. 高温コンポストにおける発酵初期の品温変化とマイクロフロー解析. *土と微生物.* 60: 109–115.