

新規土壌微生物集積法の開発とメタゲノムスクリーニングの効率化

Development of a Novel Approach for Metagenome Screening Using an Arrowhead-Shaped Trap System

吉本 拓矢¹, 三ツ橋恭平¹, 茂野 俊也², 野村 暢彦¹, 内山 裕夫¹, 中島 敏明^{1*}
TAKUYA YOSHIMOTO, KYOHEI MITSUHASHI, TOSHIYA SHIGENO, NOBUHIKO NOMURA, HIROO UCHIYAMA and TOSHIAKI NAKAJIMA-KAMBE

¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

² つくば環境微生物研究所 〒300-2647 つくば市手子生 1108-2

* TEL/FAX: 029-853-4619

* E-mail: nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Tsukuba Environmental Microorganism Institute, Tegomaru 1108-2, Tsukuba, Ibaraki 300-2647, Japan

キーワード: メタゲノミクス, 土壌微生物, 有用遺伝子

Key words: metagenomics, soil-microbes, useful genes

(原稿受付 2010 年 10 月 15 日 / 原稿受理 2010 年 11 月 3 日)

1. はじめに

地球上の多種多様な環境において、細菌を始めとする微生物もまた幅広い多様性をもつ。彼らの作り出す酵素や二次代謝産物は我々の生活に無くてはならないものであり、現在使用されている産業用酵素の大部分は微生物起源となっている。

通常、目的とする酵素等の有用物質を得るには、生産菌を単離・培養をすることが必要である。しかしながら、環境中の 99% 以上の微生物は現在の技術で培養することはできない¹⁾。つまり、現在の成果は環境中の 1% 未満の微生物から得られたものであり、培養できない残り 99% を有効利用できれば、有用物質の収集量ははるかに増大すると考えられる。この 99% 以上の環境微生物が難培養性であるという事実は、我々に膨大な未発掘微生物資源への期待感を募らせ、これらにアクセス可能な技術の開発を促した。

その手段として開発された技術がメタゲノムスクリーニングである。本稿では、メタゲノムスクリーニングの問題の一つである、「スクリーニング効率の低下」という問題に着目し、その効率化を目指す新規アプローチ法の開発を報告する。

2. メタゲノムスクリーニングとは

メタゲノムとは、Wisconsin 大学の Jo Handelsman により最初に用いられた用語で「さまざまな複合微生物ゲノムの集合体」を意味する²⁾。すなわち土壌・海水といった環境サンプル全体から抽出された微生物ゲノムのこと

を示す。

メタゲノムスクリーニングとは、このメタゲノムを元にライブラリーを構築し、遺伝子配列や機能に基づいたスクリーニングから、目的とする遺伝子を取得するというものである(図 1)。この手法では従来不可欠であった「培養」操作が必要でないため、環境中の 99% 以上を占めるといわれる難培養性微生物へのアプローチが可能である。現在までに、さまざまな新規有用遺伝子やそこから生じる有用酵素が数多く得られており、今後産業分野への応用が広く期待されている³⁻⁵⁾。

実際のスクリーニング法としては、遺伝子配列を元にした方法と活性を指標とした方法の 2 つに大別される⁵⁾。遺伝子配列を元とした方法では、メタゲノムに対し PCR やハイブリダイゼーションを利用しスクリーニングを行う。この方法は比較的簡便にスクリーニングを行えるが、既知の遺伝子配列に依存したスクリーニングのため、新規の遺伝子が獲得される確率が低い、PCR では全長配列を取得することができないなどの欠点がある。一方、活性を指標とした方法はメタゲノムを適当なサイズに切断した後、フォスミドや BAC といったベクターにクローニング、大腸菌等の宿主細胞内でメタゲノム遺伝子を発現させ、その機能を検出する。この手法では既知の遺伝子情報を利用しないため、新規な遺伝子を獲得できる可能性が高く、実際に本研究室においても、新規ポリ乳酸分解酵素遺伝子の取得に成功している⁶⁾。しかし、宿主細胞内で目的遺伝子が発現しなければならぬという問題がある。また近年これらの問題を解決する新技術として、遺伝子の発現活性を指標とした SIGEX 法⁷⁾や、シークエンサーを用いたパイオインフォ

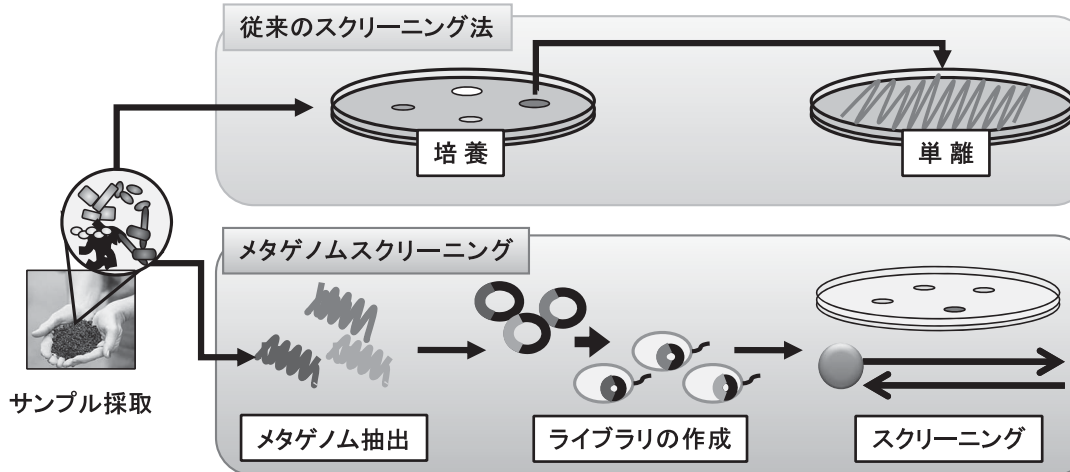


図1. メタゲノムスクリーニングの概略

マティックなスクリーニングなども行われているが、高価な機器が必要であるなど、誰もが手軽に行える方法ではない。

これらの手法にいずれも一長一短があるように、メタゲノムスクリーニングには改善する余地のある問題が多く存在する。その中で、本研究ではスクリーニング効率の問題に着目した。

3. メタゲノムスクリーニングの問題点と新規土壌微生物集積法の開発

メタゲノムスクリーニングの登場により、我々は難培養性微生物の世界に足を踏み入れることが可能となった。しかし、メタゲノムスクリーニングは、対象が環境中の全ての微生物に拡大したことによるスクリーニング効率の問題を抱えている。これまでの報告によると、活性を指標にしたスクリーニングにおいて、その多くは数千から数十万クローンについてスクリーニングを行ったが、得られたポジティブクローンは数個から数十個という効率であった。取得することができなかったというネガティブデータが表れていないことを考えると、本手法は明らかに非効率的であり、スクリーニング効率の向上こそが最大の課題である⁸⁾。

そのため、多くの研究者によって、「目的遺伝子の効果的な集積法⁹⁾」、「宿主・ベクター系の改良^{10,11)}」、「スクリーニングシステムの改良¹²⁻¹⁴⁾」、といった技術開発・改良が成されてきた。

本研究では、「目的遺伝子の効果的な集積」を目的に、土壌環境をターゲットとした、「新規土壌微生物集積法」を開発した。この手法では、多孔質構造素材で作成した鏝（やじり）を用いる。この鏝を土壌に埋設し、試料を添加することにより、鏝表面及びその周囲のみに試料特異的な微生物を集積できる（図2）。イメージとしては、童話ヘンゼルとグレーテルにおけるお菓子の家と想像いただきたい。そこから抽出したメタゲノム中には目的遺伝子が多く含まれていると考えられ、スクリーニング効率の向上が見込まれる。

これまで行われてきた目的遺伝子の集積法の多くは、

環境サンプルに基質となる化合物を添加して培養するといった古典的な集積培養であり、対象はその培養条件に適した微生物に限定される。また、いわゆる「生き残りゲーム」となるため、培養中に特定の微生物の優先化が起り、サンプル内の多様性を失わせる。すなわち、目的とする微生物全が集積される訳ではなく、目的微生物のうち、ごく一部の微生物のみが増殖すると考えられる。

しかし本手法は、実環境中で利用でき、鏝の細孔それぞれに微生物が住み着くので、サンプルの多様性を失わせることなく、その環境中でターゲットとなる微生物を効果的に集積できる。さらに、添加試料の拡散も鏝表面までに抑えられると考えられ、試料が引き起こす環境負荷も最低限に抑えられるなど、数多くのメリットを有している。

土壌環境にはたった1gの中に $10^3 \sim 10^4$ 「種」の微生物が生息していると言われており²⁾、メタゲノムスクリーニングを行うには最適である。

4. 鏝の作成

本研究により開発された鏝は、土壌微生物をターゲットとしたものである。まず、土壌微生物を対象とすることから、使用する素材による微生物への影響がないということが前提となる。そのため、素材には余計な有機物を含まない、かつ土壌に近い組成・物理構造を持つことが望ましい。さらに、土壌に埋設する前に乾熱滅菌を行うことが可能ならば、素材由来の微生物による影響も取り除くことができる。

そこで本研究では、陶磁器などの作製に用いられる土壌由来の粘土を素材の原料として使用することにした。形状は土壌に埋設する際に、容易に埋め込められるよう、円錐状の鏝型に成形し、より多くの微生物を回収するために、成形した素材表面に溝をいれることで土壌と接する表面積を広げた。さらに、その素材に染み込ませた試料を資化する微生物の集積を可能とするために、鏝型の内部を空洞にすることで試料の添加を可能にした（図3左）。

また、微生物の住処として定着しやすくするため、さ

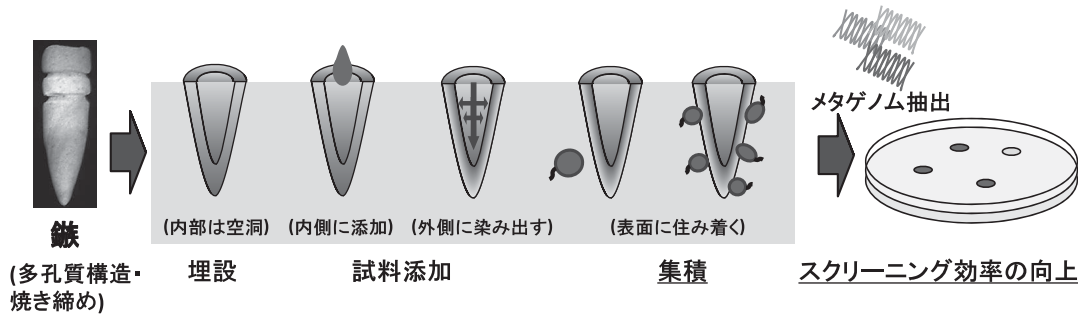


図2. 新規土壌微生物集積法

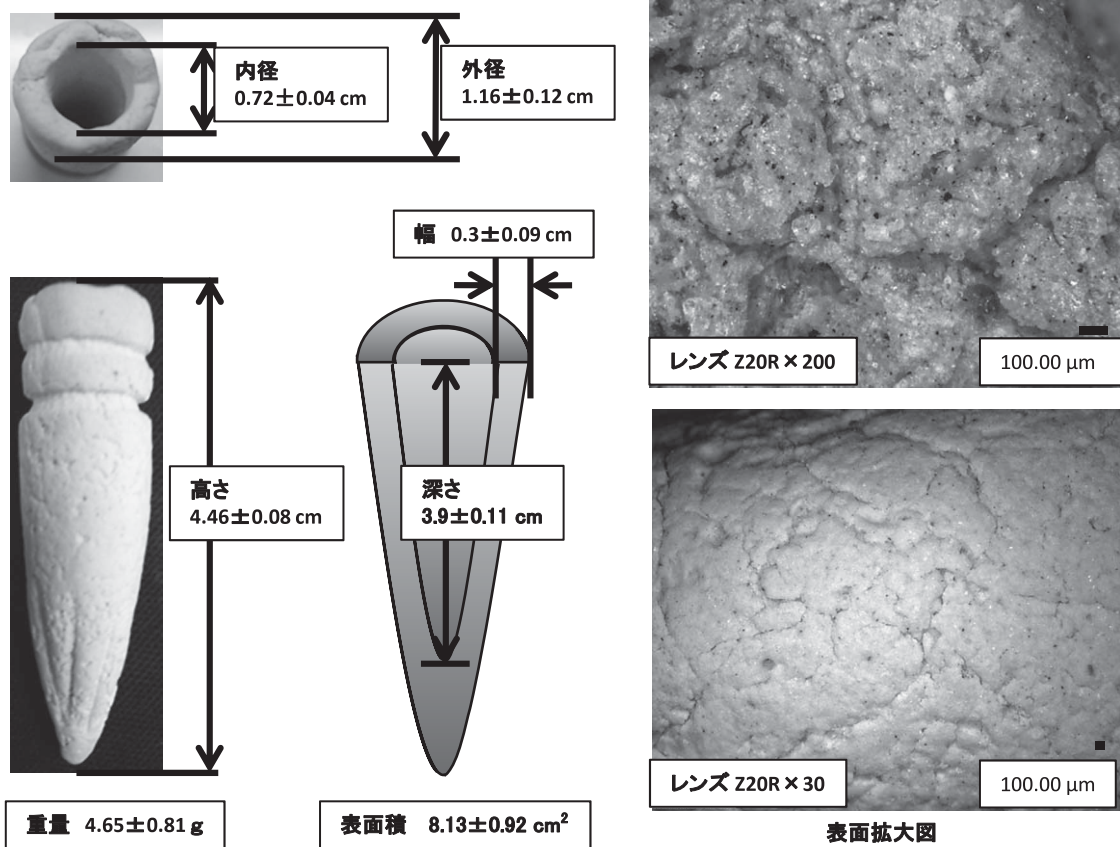


図3. 鍍の詳細

らには、添加した試料の土壌への拡散を最小限に抑えるために、「焼き締め」という手法で焼き上げた。通常、陶磁器の作製には作品の素地に釉薬を掛けて表面を覆うガラス質の層を形成させる。しかし、本手法では釉薬を掛けずに固く焼き上げるため、素材表面の多孔質構造化を図ることができる。

作製された鍍の中から無作為に5本の鍍を選び、それぞれのサイズ（高さ・外径・内径・深さ・幅）および重量を測定した。その結果より鍍の表面積（細孔を含まない）を求め、1g当たりの表面積を算出した。また、デジタルマイクロスコープ（KEYENCE）を用いて鍍表面の拡大写真を撮影した（図3右）。

鍍はひとつひとつが手造りであるため、各鍍には多少のバラつきが存在した。サイズのバラつきに比べると各鍍の間で重量と表面積の差が多少大きかった。鍍表面の

拡大写真から表面には細かい割れ目のような溝があり、非常に細かい凹凸が形成され、多孔質化が実現できたと示唆された。

5. 鍍による微生物集積効果の評価

はじめに、鍍が土壌生態系に与える影響を評価するため、土壌に鍍を埋設後、16s rRNA 遺伝子をターゲットとした T-RFLP 法¹⁵⁾により、土壌と鍍の微生物群集構造を比較した。その結果、鍍表面の微生物生態は土壌と同様のピークを示し、鍍自体が土壌に与える影響は限りなく少ないと考えられた（data not shown）。

次に、鍍による微生物集積効果を示すため、つくば市畑土壌に鍍を埋設し、試料としてラードを添加した。コントロールとして、土壌に直接ラードを添加した区、試

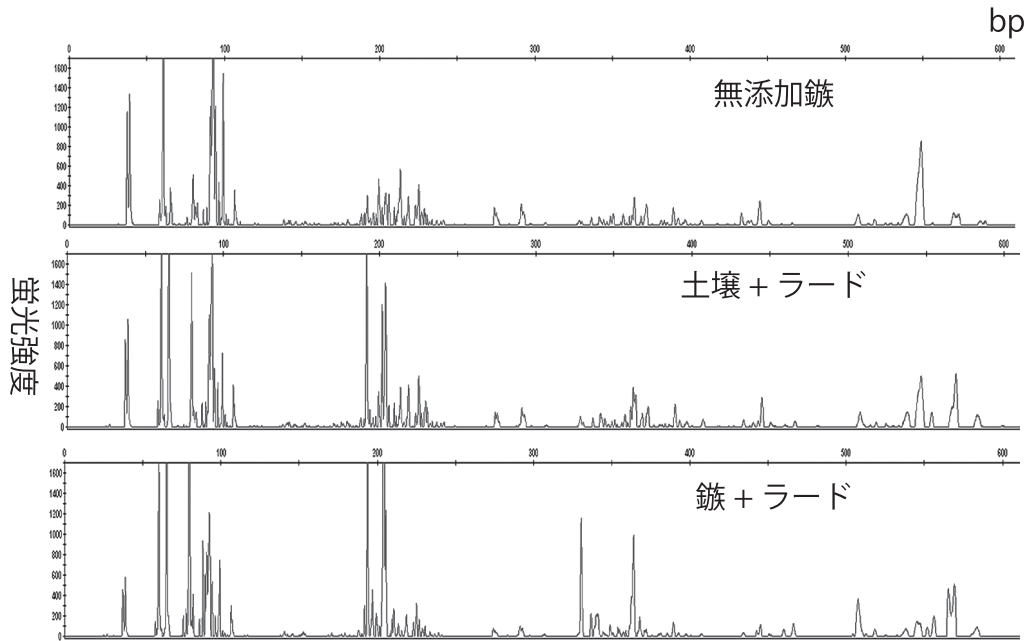


図4. 各サンプルにおける微生物群集構造解析

ラード添加後10日目、16srRNA遺伝子をターゲットとしたT-RFLPプロファイル。鍍+ラードの区では他の2区より多種類、高蛍光強度のピークが確認できた。

料無添加の鍍区を作成した。10日後、鍍、土壌を回収し、同様に微生物群集構造解析を行った(図4)。図4に示すように鍍区において、目的微生物と思われるピークが多く確認でき、鍍中でラード分解能を持つ微生物が優先していることが示唆された。土壌にラードを直接添加した系に比べ鍍を用いることで数多くのピークが確認できた理由としては、土壌環境にラードを直接添加することで、ラードは速やかに拡散・分解されてしまうためであると考えている。一方鍍区では試料は毛細管現象により徐々に内側から鍍表面に染み出していくため、長期的に目的微生物を集積できるのではないかと考えた。

そこで、それぞれのサンプルをNB+ラードエマルジョン重層培地に散布し、培養法によるラード分解菌の割合を比較した(図5)。図5から、鍍にラードを添加した区では土壌に直接ラードを添加した区、試料無添加の鍍区と比較して強く優位差が示された。これは、上記の理由に加え、土壌中にラードを直接添加した系ではラードが染み出した土壌のみを回収するのは非常に困難であるため、通常の土壌も多量に混ざってしまった為であると考えられる。一方鍍区では、試料の拡散は鍍表面で抑えられるため、確実に目的微生物を含むサンプルを回収することができる。

これらの結果から、本研究で作成した鍍を用いることで、メタゲノムスクリーニングの前段階として効果的な微生物ゲノム集積が可能であることが示唆された。

6. 終わりに

本研究ではメタゲノムスクリーニングの効率化を目指し、鍍を作成した。その微生物集積効果はまだはっきりと示されたわけではないが、今後、本手法の有効性を示すとともに、新規有用遺伝子の取得を行っていきたい。

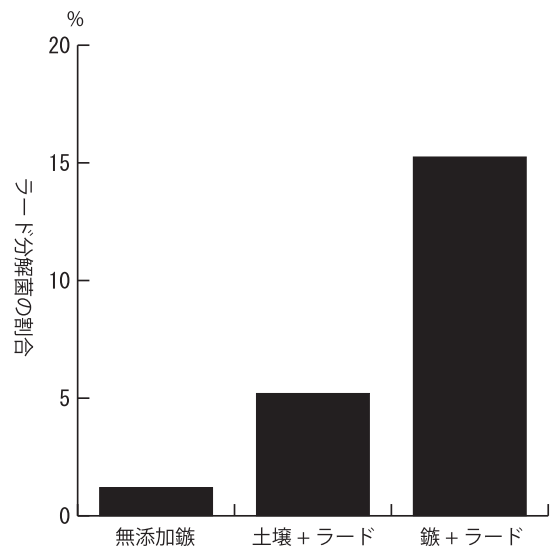


図5. 培養法によるラード分解菌割合

各サンプル希釈液をNB+ラードエマルジョン重層培地に植菌。30°C, 72時間培養し、培地上にラードを分解したクリアゾーンが形成されたものを分解菌とした。

また、鍍の応用方法として、通常の微生物スクリーニングや、実環境中で化学物質や石油などが土壌生態系に与える影響を解析する手法としても用いることができるのではないかと考えている。

メタゲノム技術は環境微生物学の最先端であるが故に、その技術開発は高価な機器や大規模な研究組織、機材を必要とする方向に向かいやすく、本手法のような単純な手法には目が行かないきらいがある。しかし、この分野の発展のためにも、若手や個人研究者が独創的な発想を手軽に実行に移せる環境が必要であるのではない

か。今後、本手法のような安価かつ手軽なメタゲノム技術が開発されることを期待している。

文 献

- 1) Amann, R.L., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- 2) Handelsman, J., M.R. Rondon, S.F. Brady, J. Clardy, and R.M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245–249.
- 3) Kimura, N. 2006. Metagenomics: Access to Unculturable. *Microb. Environ.* 21: 201–215.
- 4) Schmeisser, C., H. Steele, and W.R. Streit. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 955–962.
- 5) Uchiyama, T. and K. Miyazaki. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Cur. Opi. Biotech.* 20: 616–622.
- 6) Mayumi, D., Y. Akutsu-Shigeno, H. Uchiyama, N. Nomura, and T. Nakajima-Kambe. 2008. Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 743–750.
- 7) Uchiyama, T. and K. Watanabe. 2008. Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. *Nat. Protoc.* 3: 1202–1212.
- 8) Lorenz, P. and J. Eck. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 510–516.
- 9) Chen, Y., M.G. Dumont, J.D. Neufeld, L. Bodrossy, N. Stralis-Pavese, N.P. McNamara, N. Ostle, M.J.I. Briones, and J.C. Murrell. 2008. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. *Environ. Microbiol.* 10: 2609–2622.
- 10) Schloss, P.D. and J. Handelsman. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Cur. Opi. Biotech.* 14: 303–310.
- 11) Martinez, A., S.J. Kolvek, C.L.T. Yip, J. Hopke, K.A. Brown, I.A. MacNeil, and M.S. Osburne. 2004. Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors for Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Expression Hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2452–2463.
- 12) Suenaga, H., T. Ohnuki, and K. Miyazaki. 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ. Microbiol.* 9: 2289–2297.
- 13) Yamada, K., T. Terahara, S. Kurata, T. Yokomaku, S. Tsuneda, and S. Harayama. 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.
- 14) Williamson, L.L., B.R. Borlee, P.D. Schloss, C. Guan, H.K. Allen, and J. Handelsman. 2005. Intracellular Screen To Identify Metagenomic Clones That Induce or Inhibit a Quorum-Sensing Biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6335–6344.
- 15) Liu, W.-T., T. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516–4522.