

微生物培養を経ない酵素探索系の確立

藤井 克彦 [室蘭工業大学応用化学科/助手]

背景・目的

最近になって「科学者が今までに分離し、解析を行ってきた微生物は、環境中に生息する全微生物種の1%にも満たない」という事実が明らかになった。99%以上を占める未知微生物群集は「そこに生息してはいるが、現在の実験技術では培養できない」という性質からVBNC(Viable but Non-Culturable)微生物と呼ばれ、微生物生態学分野において最も競争の激しいテーマになりつつある。しかし、微生物利用の現状を見てみると、1%にも満たない「培養が容易である微生物」のみの利用に限定されているわけであり、VBNC微生物およびその酵素が利用できれば、環境浄化や産業の場で山積している多くの諸問題を解決できると期待される。

そこで本研究では環境微生物の大多数を占めるVBNC微生物から環境浄化や産業に有用な酵素を探索できる研究系を確立する。

内容・方法

探索系の確立には、ラッカーゼをモデル酵素遺伝子として用いる。ラッカーゼはベンゼン環を分解する酵素として知られており、環境汚染物質の分解という用途が期待できる。まず、推定ラッカーゼ遺伝子を持つと考えられる既存微生物*Bacillus subtilis*、*Xanthomonas campestris*、および*Streptomyces griseus*を用い、これらからラッカーゼ遺伝子を増幅できるプライマーを設計、PCR産物を得る。次に、得られた産物を大腸菌発現プラスミドに組込み、JM109大腸菌株に導入することでタンパク質発現試験を行う。さらに、海洋、河川、温泉、積雪地、下水など様々な水環境から土砂や水試料を採集し、試料中に生息する微生物のラッカーゼ酵素遺伝子をPCRで簡易に増幅できる実験系を確立する。

結果・成果

●プライマーの設計と増幅条件の検討

まず、*Bacillus subtilis*、*Xanthomonas campestris*および*Streptomyces griseus*から見出されている推定ラッカーゼ遺伝子の配列を基に約30塩基のプライマーBCOTF、BCOTRC、XC1F、XC1RC、SGL1FそしてSGL1RCを設計した。次に*Bacillus subtilis*、*Xanthomonas campestris*および*Streptomyces griseus*のゲノム遺伝子を精製、これらを用いて上記プライマーで酵素遺伝子を増幅できるPCR最適稼働条件を検討した。このステップでは、各菌種の鋳型DNA量、最適アニーリング温度、伸長反応時間、DMSO添加の有無の4点について細かくドーズを振って検討し、最適条件の確立を行った。

●eDNAの精製

次に、自然環境から土試料を採集し、e-DNAの調製を行った。具体的手法であるが、まず、金型ふるいにかけて砂利や植

物根を取り除いた土壌30gを500mL容フラスコに入れ、これにExtraction Buffer(100 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM EDTA, 100 mM Na₃PO₄, 1.5 M NaCl, 1% CTAB)を81 mLを注ぎ入れ、10 mg/mL Proteinase-K溶液を0.6 mL加え、37℃で30分間振とうを行った。振とう終了後、20% SDSを9 mL加えてさらに65℃で2時間振とうし、6000 rpm, 10分, 20℃で遠心分離を行った。遠心分離で得られた上清はをビーカーに回収し、クロロホルム144 mL、イソアミルアルコール6 mLを添加しておだやかに混和、2500 rpm, 10分, 25℃で遠心分離し、水相を回収した。そして、イソプロパノールを回収した水相の0.6倍容加えて混和し、10000 rpm, 30分, 4℃で遠心分離することでe-DNA粗精製試料を得た。さらに、得られた粗精製試料はDNA Clean Up Resin (Promega)を用いてフミン質を除去し、低融点アガロース電気泳動によるサイズ分画を経て最終的な精製品として調製した。各試料(30g)ともmgオーダーの精製eDNAが得られた。

●eDNAからの酵素遺伝子の探索

上記実験項目で確立した条件を基に、eDNAを鋳型として酵素遺伝子の増幅を試みたところ、海浜土壌由来のeDNAから900 bpおよび500 bpの増幅遺伝子を検出できた。プライマー長は30 bであり、他のポイントでは遺伝子の増幅は認められなかったことからいわゆるartifactではなくラッカーゼ様類似遺伝子が増幅されてきたことがわかり、PCRを手法としたeDNAからの酵素遺伝子探索系の有用性に期待が持てることがわかった。

●推定ラッカーゼをモデル遺伝子とした有用酵素遺伝子発現系の解析

有用酵素遺伝子の候補が得られた場合、これを大腸菌株などの『培養可能な』微生物宿主に導入することが必要である。そこで*S.griseus*の推定ラッカーゼ遺伝子を用いて大腸菌で安定して発現できる系の確立を行った。Tliポリメラーゼにより増幅した平滑末端の推定ラッカーゼ遺伝子を発現ベクターpBADgIIIに挿入、これをJM109 大腸菌株に導入した。得られた陽性クローンを分析したところ正しい読み枠で目的遺伝子が挿入され、発現試験でも酵素遺伝子の発現が認められた。しかし、発現した酵素は大腸菌体内の封入体に局在し、酵素活性を確認するまでには至らなかった。今後酵素の可溶化などについて検討を行っていく必要がある。

今後の展望

今後、環境試料から増幅が確認されたPCR産物をシーケンシングし、確立した手法の実用性を評価する。また、これまでの研究で確立された方法を用いて様々な環境からeDNAを精製するとともに、これを鋳型として環境浄化のみならず産業の場においても有用な酵素遺伝子を実際にPCR増幅し、得られた産物の有用性について遺伝学および酵素学的側面から解析していく。得られた遺伝子に有用性が認められた場合は特許出願可能性についても調査し、成果の社会還元について前向きに検討する。