

# メタゲノム法を用いた未利用遺伝子資源探索における集積培養の効果

分子生命科学講座 基礎環境微生物学分野

鈴木 綾

【背景と目的】自然環境中には数多くの微生物が存在しているが、既存の培養法によって培養可能な微生物はごくわずかである。そのため、ほとんどの微生物の遺伝的、機能的多様性の全容は解明されておらず、自然環境中には未知・未利用の微生物資源が数多く存在すると考えられている。これらの遺伝子資源へのアプローチとして開発されたメタゲノム法は、培養を介さずに有用な機能遺伝子を環境中から直接獲得できる手法である。しかし、標的遺伝子をメタゲノムライブラリから獲得できたとしても、既に培養されている微生物由来のものである場合が多く、未培養微生物が有する未利用遺伝子資源を獲得できる確率はきわめて低い。そこで本研究では、メタゲノム法による有用遺伝子資源獲得の効率化を図るため、標的遺伝子である脂質分解酵素に狙いを定めた集積培養を行い、陽性クローンの獲得効率や遺伝学的多様性、基質特異性などを比較することでその効果を検証した。

【方法】札幌市近郊の森林から採取した土壌と、その土壌にオリーブオイルを加えて2ヶ月間培養を行った集積土壌を用いてメタゲノムライブラリをそれぞれ構築し、脂質分解活性を有するクローンのスクリーニング、獲得した陽性クローンの遺伝子配列解析、および合成基質である *p*-nitrophenyl butyrate を用いた脂質分解活性測定を行った。

【結果と考察】森林土壌を用いて構築したライブラリ N から7個、集積土壌を用いて構築したライブラリ O から49個の陽性クローンを獲得した。遺伝子配列解析の結果、ライブラリ N から得たクローンはすべて異なる微生物由来の遺伝子であった。ライブラリ O から得たクローンのうち12クローンは、未培養微生物由来の *Lipase/esterase* と最も高い相同性を示した。系統解析の結果、これらのクローンは既知菌株とも過去にメタゲノムライブラリから獲得された未培養微生物由来の *Lipase/esterase* と異なるクラスターを形成しており、新規な未培養微生物由来の遺伝子と考えられた。脂質分解活性を測定した結果、*p*-nitrophenyl butyrate に対して最も高い分解活性を示したクローンは、ライブラリ N ではクローン N4 の7.4U、ライブラリ O ではクローン O12 の42.9Uであった。

以上の結果から、同じ土壌を用いて構築したメタゲノムライブラリであっても、集積の有無により獲得される遺伝子の獲得頻度や種類に大きな違いがあること、未集積土壌を用いて構築したメタゲノムライブラリからも新規性の高い遺伝子を獲得することは可能であるが、集積を行うことにより高活性かつ新規な遺伝子を獲得できることが示された。