

環境中に眠る有用遺伝子を探せ

戸田 弘

飼い犬に「ここ掘れワンワン」と促され地面を掘り返すと、お宝がザクザクと出てくる。有名な「花咲爺さん」の一幕である。なんとも景気の良い、うらやましい話ではあるが、もちろんそこいらの土中に金銀財宝が眠っているなどという都合のいい話はそうないだろう（それでも筆者は小さい頃にこの話を鵜呑みにし、庭中ほじくり返して叱られた記憶があるが）。しかし実際には、我々が考えている以上に土壌は「宝の山」なのかもしれない。

土壌をはじめとするさまざまな環境中には無数の微生物が生息し、実に多様な酵素遺伝子や代謝系を有している。それらは互いに連携、補完し合いながら、有機物や無機物の分解、各種化合物の合成、元素の濃縮蓄積など地球上における物質循環や生態系維持に大きな役割を果たしている。我々人間は以前より、こうした微生物が持つ有用な機能を利用すべく、さまざまなスクリーニング法を開発しその単離培養を試みてきた。しかしながら、土壌中の微生物の大部分（実に99%以上）は人為的に培養困難な難培養性微生物であることが近年明らかとなっている¹⁾。すなわち、これまでに我々が利用してきた微生物はほんのごく一部であり、環境中には未利用な有用微生物や酵素という膨大な量の「お宝」が眠っているかもしれないという、なんとももったいない話である。

こうした観点から、近年注目されているのがメタゲノム解析である。メタゲノムとは環境中の試料から直接抽出したDNAの呼称であり、その中には多種多様な微生物のゲノムDNAが雑多に混在している。培養過程を経ないので、培養が困難な微生物のゲノムDNAも取得可能であり、最近では土壌サンプルのみならず糞便や環境水といったさまざまな試料からメタゲノムDNAを抽出できるキットも販売されている。目的とする酵素やタンパク質の遺伝子をこうしたメタゲノムから直接的に取得することができれば、これまで培養困難であった微生物が持つ遺伝子も利用することが可能である。すなわち、利用可能な酵素遺伝子のレパートリーが飛躍的に増えるということの意味する。実際これまでに、メタゲノムからのさまざまな遺伝子の取得・利用が試みられており^{2,3)}、それにともないメタゲノム解析のむずかしさや抱えている問題点も明らかとなってきた。

メタゲノムからの有用遺伝子の探索方法として、断片化したメタゲノムDNAを大腸菌などの発現宿主用ベクターへ挿入・ライブラリー化し、酵素活性などを指標としてスクリーニングする手法が従来用いられてきた。この手法では、確実に目的の機能を持つ遺伝子を得られるという利点があるが、目的遺伝子を得られる確率が低く、

数千～数十万クローンをスクリーニングして数個得られればラッキーな方である。また、宿主細胞内で発現可能なタンパク質のみに限られるという制約もある。こうした問題を解決すべく、さまざまなスクリーニング法が考案されてきた。末永らは、メタゲノムライブラリーからのエクストラジオールオキシゲナーゼ (EDO) のスクリーニングにおいて、従来多用されてきた寒天培地評価系ではなく、液体培養評価系によるスクリーニングの効率化を試みている。96ウェルプレートを用いた2段階選抜により96,000クローンのライブラリーをスクリーニングし、新規なサブファミリーに属するEDOクローンを多数取得することに成功している⁴⁾。本手法では、培養条件、プラスミドコピー数のコントロール、遺伝子発現誘導、活性検出などの各種条件の最適化がカギとなっており、実際にこれらのポジティブクローンを寒天培地上で培養してもEDO活性は検出されないことから、スクリーニング方法の工夫や遺伝子発現条件の最適化の重要性がうかがわれる。

また近年、PCR技術を応用したメタゲノムスクリーニングの効率化も盛んに研究されている。既知酵素の塩基配列やアミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いてPCRを行い、増幅された遺伝子断片のライブラリー化とスクリーニングを行うことで、高い確率で目的遺伝子を得られる。このとき、既知の酵素遺伝子とキメラ化、異宿主発現させることにより、活性を指標とした直接的なスクリーニングが可能となる。伊藤らは上述の手法により、高温発酵堆肥からアルコール脱水素酵素を取得し、それらが多様な基質特異性や有機溶媒耐性を示すことを報告している⁵⁾。

こうした試みはメタゲノムスクリーニングの効率化の一例であり、上記以外にもさまざまな工夫が研究されている。また実際の産業利用酵素においてもこうしたスクリーニングが試みられており、それらの実用化も遠い話ではないだろう。“枯れ木に花を咲かせましょう”未利用遺伝子という土中のお宝が掘り起こされ、産業利用に大いなる花を咲かせることを願ってやまない。

- 1) Torsvik, V. *et al.*: *J. Ind. Microbiol.*, **17**, 170 (1996).
- 2) Henne, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3113 (2000).
- 3) Yun, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7229 (2004).
- 4) Suenaga, H. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **9**, 2289 (2007).
- 5) Itoh, N. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 6280 (2014).