

# 未知微生物資源の探索における ファンクショナルメタゲノム法の可能性

木村 信忠

## はじめに

近代微生物学において、ルイ・パスツールと並んで「近代細菌学の開祖」と称されているロベルト・コッホの大きな業績の一つは、純粋培養や染色の方法を改善し、細菌培養法の基礎を確立したことである。寒天培地やペトリ皿(シャーレ)が彼の研究室で発明されて以来、現在に至るまで微生物研究に使用されている。

地球上には約 $5 \times 10^{30}$ 個の微生物が生息しており、地球上のバイオマスの半分に相当すると言われているが、環境中には分離や培養が困難な「難培養微生物」が存在しており、その割合は環境中に生息する微生物の99%以上を占めることが分かってきた。膨大な量のバイオリソースである難培養微生物は、希少価値の高い酵素や天然化合物のソースとして、新しい工業原料の生産技術(バイオプロセス)の実現や、医療診断技術、医薬品の開発などへ活用が期待されている。また、未知・未培養微生物の生態や挙動を理解することは、生態系全体を理解するうえで重要な事柄と考えられる。

## ファンクショナルメタゲノム法とは

従来の微生物由来の遺伝子や酵素の探索は、選択培地などを利用した微生物の分離と培養から始まるが、環境に生息する微生物のほとんどは難培養微生物であることから、従来の手法ではアクセスできる微生物の種類や規模に限界があった。

そのため、1990年代から「微生物を分離や培養することなく、微生物の遺伝子や酵素を探索・解析する」研究が試みられるようになった。ウィスコンシン大学植物病理学部(当時)のHandelsmanらは、土壌DNAからゲノムライブラリーを構築し、新奇な抗生物質turbomycin Aのスクリーニングに成功している<sup>1)</sup>。Handelsmanらは、論文において環境サンプルから抽出した複合微生物系のDNAを「メタゲノム」と名付けている<sup>2)</sup>。

メタゲノムとは、「高次」という意味のmetaとgenomeを融合した造語であり、多様な生物に由来するゲノムDNAの集合体を意味する用語として普及している。一方、生命現象を包括的に解析・解明しようとするオミッ

クス解析の研究が近年盛んに行われているが、たとえば、複合系DNAを解析する手法をメタゲノム解析、転写RNAなどRNAを解析する手法をメタトランスクリプトーム解析、代謝産物を解析する手法をメタボローム解析と区別している。

メタゲノム解析の手法は大別すると二つに分けることができる。急速な次世代シーケンサーの発達は網羅的なメタゲノムの解析を可能性にしており、各種環境サンプルや、ヒトの腸内環境に生息する微生物の解析が盛んに行われている。従来の環境サンプル中の微生物叢解析は、PCR増幅したりボゾームRNA遺伝子をクローニングし、配列を決定することで行われていたが、現在ではPCR増幅したりボゾームRNA遺伝子DNAを次世代シーケンサーで配列決定する「アンプリコンシーケンス解析」が行われており、環境サンプル中のサンプル辺り数千から数万種類の微生物から構成される微生物叢を解析することができる。一方、環境サンプルからDNAを抽出し、次世代シーケンサーを利用したショットガンシーケンスが行われており、機能遺伝子の検出や、未知未培養微生物のゲノム構造の推定を行うことができる。このような塩基配列解析によって取得した配列情報に基づいたメタゲノム解析は「Sequence-based metagenomics」と呼ばれている。

一方、メタゲノムDNAを宿主ベクター系へクローニングした「メタゲノムライブラリー」を構築し、酵素活性や化合物の産生を指標にして、酵素や合成遺伝子を探索することができる(図1)。このような機能を指標にしたスクリーニング法(Function-based metagenomics; ファンクショナルメタゲノム法)は、環境サンプル中の未培養微生物に由来する遺伝子へアクセスする有効な手法として注目されている。たとえば、Narihiroらは、森林土壌サンプルからリパーゼ遺伝子の探索を実施し、微生物の分離培養によって3種類のリパーゼ遺伝子が取得されたことに対して、森林土壌から調製したメタゲノムライブラリーからは9種類の新規リパーゼ遺伝子をスクリーニングすることに成功している<sup>3)</sup>。

従来行われているPCRをベースにした遺伝子探索の場合は、プライマーを設計する際に使用する配列情報を

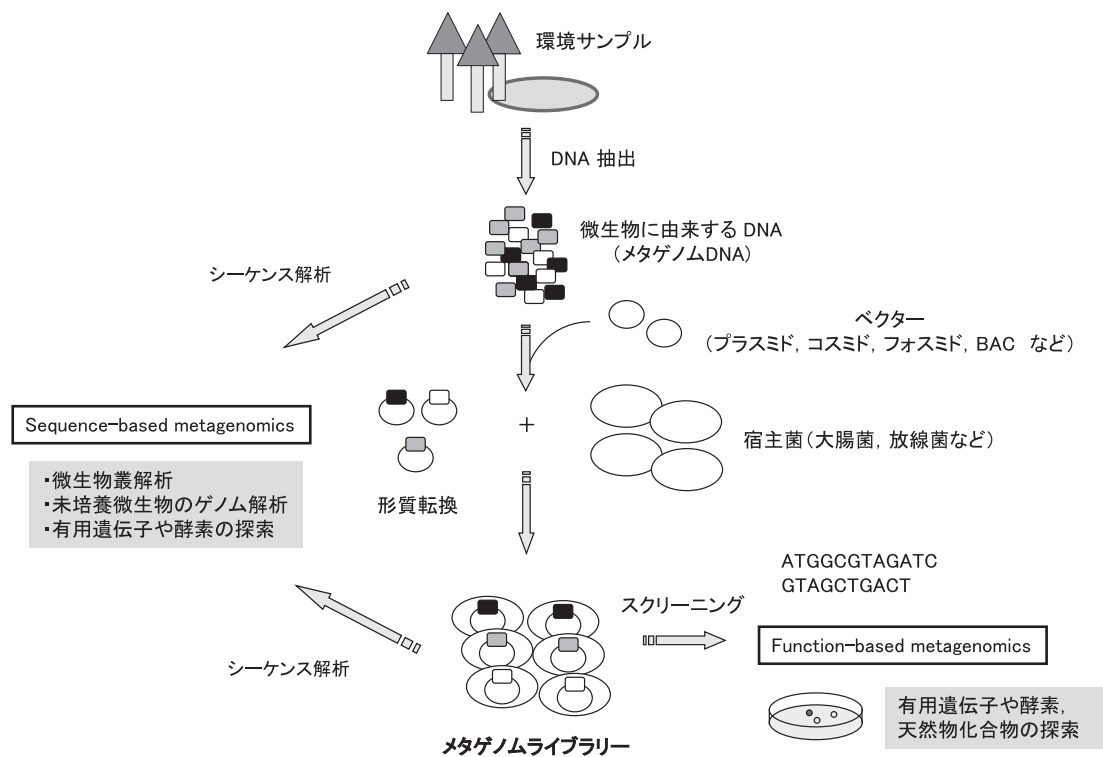


図1. メタゲノム解析の方法と目的

必要とするが、既知の配列情報に基づいてプライマーを設計することは、既知の遺伝子配列を増幅するバイアスを生み出すことになる。一方、ファンクショナルメタゲノム法は既知の配列情報を必要としないことから、既知の配列情報に類似しない未知の配列情報を含む遺伝子を探索することができる。

### ゲノムライブラリー構築

ファンクショナルメタゲノム法によって高い頻度で遺伝子を取得するためには、サンプル中におけるターゲットとする遺伝子の存在比を上げることが重要であり、ライブラリーの調製に使用するサンプルの集積方法が検討されている。たとえば、特定の化合物を資化する微生物をターゲットとする場合に、<sup>13</sup>Cでラベルした化合物を基質として集積培養したサンプルをライブラリーの構築に利用する方法が報告されている<sup>4)</sup>。また、バイオマス量が低いサンプルをライブラリーの構築に利用する場合には、抽出したDNAをφ29ポリメラーゼなどランダムにゲノムDNAを増幅するMDA法 (The multiple displacement amplification) で調製したDNAが用いられた例が報告されている<sup>5)</sup>。

一方、サンプルの適性を判断する目安の一つとしては、サンプル中における遺伝子の多様性と量比を評価するこ

とである。手法として、環境サンプル中の微生物由来リボゾームRNA遺伝子に基づいた多様性解析が一般的に行われている。さらに、複数のサンプル間の微生物叢やゲノムレベルでの機能遺伝子の存在比の多様性をSSH法 (Suppressive subtractive hybridization) で確認する研究が行われている<sup>6)</sup>。

さらに、ファンクショナルメタゲノム法によって高い頻度で遺伝子を取得するためには、メタゲノムライブラリーに長鎖のDNA断片がクローニングされていることが望ましく、メタゲノムライブラリーの構築には長鎖のゲノムDNAが利用されている。

サンプルからゲノムDNAを調製する方法を大別すると、直接法 (direct DNA isolation) と間接法 (indirect DNA isolation) に分けることができる。直接法はガラスビーズなどを利用し、サンプル中の微生物細胞を物理的に破壊する方法であり、一般的にDNAの収量は高いが、ガラスビーズとの接触でDNAについても物理的に破断してしまうことがほとんどであり、得られるDNA分子は数百bp程度である。一方、間接法はリゾチームなど酵素を利用し、ゲルに包埋した微生物細胞を破壊する化学的な方法であり、物理的な衝撃を加えないことから、得られるDNA分子は最大で数百kbp程度になる。そのため、メタゲノムライブラリーの構築には、間接法で抽出

したゲノムDNAを利用することが一般的である。

メタゲノムライブラリー構築に際して、ベクターや宿主の選択には、以下の点について検討が必要である。まず、ベクターのインサート長であるが、高いスクリーニングの効率を実現するためには、長鎖のインサートDNAを挿入できるベクターを利用することが望ましい。一般的には、インサート長の短いプラスミドよりもコスミド(Cosmid)やフォスミド(Fosmid)ベクターが利用されている。また、インサート長が数百kbp程度になるBACベクターもメタゲノムライブラリーの構築に利用されている。

次に、ベクターの選択においては、プロモーターの有無について考慮する必要がある。ファンクショナルメタゲノム法では、インサートDNAにコードされる酵素や産生する化合物を指標にスクリーニングを行うが、それらをコードする遺伝子が宿主の中で発現するには、ベクターにプロモーターが備え付けられているか、あるいは、宿主で働くプロモーターが遺伝子配列に存在する必要がある。しかし、宿主の選択においては、長鎖のインサートDNAをベクターに挿入できる大腸菌が主に利用されており、スクリーニングできる遺伝子は大腸菌内で発現する遺伝子に限られている。

そこで、*Pseudomonas*細菌や*Burkholderia*属細菌などのグラム陰性菌や、放線菌などのグラム陽性菌、さらに酵母などの大腸菌以外の微生物をライブラリーの宿主として利用した研究が行われている。これらの宿主は大腸菌とは異なる遺伝子発現系を有していることから、環境中の多様な微生物種の遺伝子を網羅的に探索するためには有効である。たとえば、Liらは、同一のサンプルにも関わらず、複数の宿主を利用することで異なる種類の遺伝子や化合物の探索ができることを実証している<sup>7)</sup>。

また、放線菌など宿主が有する二次代謝系を有する微生物へメタゲノムDNAを導入することで、未知の天然化合物の合成に成功している。Wangらは、*Streptomyces lividans*を宿主とした土壌由来のメタゲノムライブラリーを構築し、5種類の新規化合物(terragines A, B, C, D, およびE)の分離に成功している<sup>8)</sup>。*Streptomyces*属細菌は数多くの二次代謝に関わる遺伝子クラスターがゲノム上に密に存在しており、導入した遺伝子に由来する酵素によって修飾された二次代謝産物の産生が期待できる。

#### ファンクショナルメタゲノム法のターゲット

ファンクショナルメタゲノム法の探索対象は、1) 新規遺伝子と酵素、および2) 天然化合物に大別すること

ができる。すでに数多くのリパーゼ、エステラーゼ、キチナーゼ、アミダーゼ、アミラーゼなどの遺伝子がメタゲノムライブラリーから分離されている。また、抗生物質耐性遺伝子が土壌や口腔内のサンプルから分離されており、環境中に多様な耐性遺伝子が存在することを示している。さらに、人工化合物の代謝に有効な分解遺伝子の分離が報告されており、環境中に人工化合物を分解する微生物は広く存在することを明らかにしている。そのことは、環境サンプルがバイオレメディエーションに使用する微生物や酵素の有力な供給源となりうることを示している。

一方、製薬や化成品原料の生産などへ使用を目的とした化合物やそれらの合成遺伝子の分離が報告されている。ポリケタイドなど二次代謝産物の合成遺伝子の分離については研究例が多いが、特に、ポリケタイド化合物を合成する過程でKeyとなるtype Iとtype IIのポリケタイド合成酵素(PKSs)の分離がもっとも精力的に行われている。例として、Seowらは環境中の複合微生物系からtype IIのポリケタイド合成酵素遺伝子のホモログの分離に初めて成功している<sup>9)</sup>。また、Pielらは、アオバリガタハネカクシ昆虫*Pseuderus fuscipes*の体内に生息する未知未培養微生物から、抗腫瘍性のポリケタイド化合物を合成するpederin PKSを分離している<sup>10)</sup>。さらに、海洋性の海綿*Theonella swinhoei*の共生菌から抗腫瘍性の抗生物質の分離に成功している。

さらに、新規な抗生物質の合成に関わる数多くの遺伝子が分離されている。Bradyらは、メタゲノムライブラリーを導入した微生物から幅広い抗菌性を有する新奇violaceinの生産を確認したことを報告している<sup>11)</sup>。また、抗菌活性を有する新規化合物であるturbomycin AおよびBが土壌サンプル由来のメタゲノムライブラリーから分離を報告している<sup>1)</sup>。その他にも、isocyanide, indirubin, indigo, long-chain *N*-acyltyrosineなどの天然由来の未知化合物の合成遺伝子がメタゲノムライブラリーを導入した微生物から分離されている。

#### ファンクショナルメタゲノム法のスクリーニング技術

スクリーニングに際しては、ライブラリーからクローンの選抜が行われ、続いて、クローンの生化学的解析や、クローンから抽出したDNAの塩基配列の決定が行われている。クローンの選択は、メタゲノムライブラリーを培養する寒天培地に添加した指示薬や基質の変化を指標に行うことが一般的であり、目的のクローンの検出は肉眼によって行われていた。しかし、メタゲノムライブラリーは、数万から数十万クローンから構成されており、

(肉眼で判定するには限界があるため)スクリーニングの効率化と高精度化が課題であった。

このような課題の解決策として、従来のスクリーニング手法が*in vitro*法で行われていたことに対して、*in vivo*法によるスクリーニング手法が開発されている。Uchiyamaらは、芳香族分解遺伝子の発現が基質(分解産物)によってコントロールされる知見を利用し、芳香族分解遺伝子のプロモーターの下流にGFPタンパク質遺伝子を挿入し、メタゲノムライブラリーから芳香族分解遺伝子をスクリーニングする手法であるSIGEX法(substrate-induced gene expression screening)を開発した<sup>12)</sup>。SIGEX法はクローンの選択にフローサイトメーターなど分析機器を取り入れることが可能であることから、スクリーニングの効率化と高精度化を可能にした。また、メタゲノムライブラリーから微生物間コミュニケーション物質である*N*-アシル-L-ホモセリンラクトン合成遺伝子をスクリーニングする手法、METREX法(Metabolite-regulated expression)が開発されている<sup>13)</sup>。本法は、*N*-アシル-L-ホモセリンラクトンに反応するプロモーターを上流に連結したGFP遺伝子をコードするプラスミドが導入されている大腸菌へメタゲノムライブラリーをco-transformationすることで、目的の合成遺伝子を取得する手法である。

さらに、メタゲノムライブラリー内の一クローンが導入された一細胞をマイクロドロップに包埋して個別のクローンを分離することで、一細胞レベルのクローンの活性測定を可能にした「マイクロドロプレット」を応用したスクリーニング法に関する技術開発が行われている<sup>14)</sup>。

一方、従来はファンクショナルメタゲノム法の遺伝子探索のターゲットは原核生物由来の遺伝子に限定されていたが、特定の基質で集積した環境サンプルからmRNAを抽出し、合成したcDNAを酵母へ導入したメタゲノムライブラリーを作製した真核生物由来の未知遺伝子資源の探索に関する研究成果が報告されている<sup>15)</sup>。

#### ファンクショナルメタゲノム法の課題

ファンクショナルメタゲノム法は、未知の遺伝子や化合物をスクリーニングするうえで有力なツールとして実証されているが、今後、同手法がさらに普及するためには、さらにいくつかの課題がある。

たとえば、ファンクショナルメタゲノム法で取得した

環境サンプル中の未知微生物に由来する遺伝子の起源となる微生物種を特定することは、同法で取得した遺伝子資源の産業利用を促進するうえで大きな課題である。また、二次代謝産物の完全長の合成遺伝子クラスターを取得するためには、長鎖のDNA断片をクローニングできるベクターを利用することが有効であり、また、化合物を生産するうえで、長鎖のDNA上にクラスター化した遺伝子群の発現を制御することが必要になる。さらに、選抜したクローンに含まれるメタゲノム由来のDNAの塩基配列解析の結果、既知の遺伝子配列とは相同性を有しないケースもあることから、タンパク質の構造解析を含めた機能未知遺伝子を同定する手法開発も必要である。

#### おわりに

微生物学の中心的な二つの操作としては、微生物の「分離」と「培養」をあげることができる。しかし、地球上には環境中から分離や培養が困難な難培養微生物が存在しており、メタゲノム解析は未踏の遺伝子資源へのアクセスを可能にした。今後は真核生物など未踏分野へのファンクショナルメタゲノム法の応用のみならず、メタゲノム配列情報を利用した未知微生物の可培養技術の開発や細胞分取技術の開発など、未知微生物資源へアクセスする統合的な技術開発が進むことが期待される。

#### 文 献

- 1) Gillespie, E. E. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4301 (2002).
- 2) Handelsman, J. *et al.*: *Chem. Biol.*, **5**, R245 (1997).
- 3) Narihiro, T. *et al.*: *Microbes Environ.*, **29**, 154 (2014).
- 4) Radajewski, S. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 296 (2003).
- 5) Yokouchi, H. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **8**, 1155 (2006).
- 6) Galbraith, E. A. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **6**, 928 (2004).
- 7) Li, Y. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **7**, 1927 (2005).
- 8) Wang, G. Y. *et al.*: *Org. Lett.*, **10**, 2401 (2000).
- 9) Seow, K. T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **179**, 7360 (1997).
- 10) Piel, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16222 (2004).
- 11) Brady, S. F., *et al.*: *Org. Lett.*, **28**, 1981 (2001).
- 12) Uchiyama, T. and Harayama, S.: *Nat. Protoc.*, **3**, 1202 (2008).
- 13) Williams, L. L. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6335 (2005).
- 14) Colin, P. Y. *et al.*: *Nat. Commun.*, **6**, 10008 (2015).
- 15) Kellbner, H. *et al.*: *Microbial. Res.*, **166**, 360 (2011).