

1A15-1 メタゲノムアプローチによる海洋無脊椎動物共生微生物からの新規機能遺伝子の獲得

○横内 裕子^{1,2}, 竹山 春子¹, 松永 是¹
(¹東京農工大・工・生命工, ²早大・生医工研)

【目的】分離プロセスを経ず直接的に遺伝子情報を取得するメタゲノムアプローチは、離培養性微生物の解析や活用に有効である。本研究では、カイメンおよび造礁サンゴ共生バクテリアの遺伝子情報をライブラリーにすることで有用物質、機能遺伝子の取得を試みた。【方法及び結果】本研究では、宿主のゲノムの除去、回収バクテリアからの効率的な高分子ゲノムDNA調整の最適化を行った。Fosmidベクターを用いた場合、平均インサート鎖長が37 Kb、総インサート長約2.3Gbpのカイメン共生バクテリアゲノムライブラリーを構築した。インサート配列の16S rDNAおよび部分配列の自己組織化地図法 (SOM: Self-Organizing Map) による解析により、ライブラリー構築前のメタゲノム中のバクテリアの多様性を保持していることが示された。そこで、インサート配列からORFを抽出し、アノテーションを行うことで有用機能遺伝子をスクリーニングした。

Metagenomic approach for screening of novel functional genes from bacteria associated with marine invertebrate

○Hiroko YOKOUCHI^{1,2}, Haruko TAKEYAMA¹,
Tadashi MATSUNAGA¹
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., ² Institute for Biomedical Engineering, Waseda Univ.)

Key words metagenome, marine invertebrate, sponge, scleractinian

1A15-3 メタゲノムファージディスプレイライブラリーからの酵素ドメイントラッピング

ポスター
発表あり

○岡本 雅次
(東亜合成株式会社)

目的: メタゲノムファージディスプレイライブラリーからの効率の良い酵素ドメイン収集法の確立を目指している。森林土壌DNA由来平均インサート1Kb、トータル35Gbpのライブラリー作製した(昨年度本大会)。シクロデキストリンアガロースビーズで数ラウンドパンニングを行い、プルナーゼ相同性配列クロンを含め、複数のクロンがエンリッチされた(昨年度分子生物学会)。酵素以外に輸送因子や転写因子と見られる配列も含まれ、群特異的クロマトの様相を呈した。相同性が全くないクロンも多数であった。今回、目的クロンをより効率よく選抜するためのモデルとして、特異性・親和性の高いストレプトアビジン (SA) をペイトリガンドとし、ビオチンを内在するビオチン酵素群遺伝子断片の収集を試みた。方法と結果: 上記ライブラリーから SA 磁性ビーズを用いてを行った。3 ラウンド目の溶出ファージブラークをプロットし、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識SAを用いて染色した。およそ 1/100 の頻度で染色ブラークが得られ、回収クロンのインサート配列相同性解析の結果、oxaloacetate decarboxylase や acetyl-CoA carboxylase などいずれもビオチン酵素のビオチン結合ドメインと見られる領域を含む断片であった。数日の工程で複数の新規なビオチン酵素遺伝子断片が効率よく収集できた。以上のことから、インヒターなどのある程度特異性・親和性の高いペイトリガンドを用い、得られたファージブラークを AP 標識リガンドによるリガンドプロットで染色することにより、目的クロンをより効率的に選抜できる可能性が示唆された。トータルコード領域は基のDNAソースからRACE様の方法で回収可能と思われる。

Enzyme domain trapping from phage-displayed metagenome library

○Masaji OKAMATO
(Toagosei Co.,Ltd)

Key words metagenomic libraries, phage display, enzyme, biotin

1A15-2 メタゲノム由来新規生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の性質

ポスター
発表あり

○真弓 大介¹, 坪 (茂野) ゆき枝², 野村 暢彦¹, 内山 裕夫¹,
中島 (神戸) 敏明¹
(¹筑波大院・生命環境, ²JST. PRESTO)

【要旨】これまでに有用酵素の取得を目的として、多くの微生物が自然界からスクリーニングによって取得されてきた。しかし、従来の純粋培養法で培養可能な微生物は環境中の全微生物資源の1%に過ぎないことが最近の研究で明らかになっている。当研究室は自然界での生分解性プラスチックの微生物分解に関する研究を行っており、その結果、生分解性プラスチックの分解には純粋培養が困難である微生物が多数関与していることが明らかになっている。そこで、本研究では環境中から直接抽出したDNAを用いてメタゲノムライブラリーを構築し、新規ポリ乳酸 (PLA) 分解酵素遺伝子の取得を試みた。これまでに本研究ではPLAエマルジョンを分解する酵素遺伝子と考えられる *plaM4* の取得に成功しており、シーケンス解析の結果、*plaM4* はリパーゼ遺伝子で、その推定産物はこれまで報告されているものとは相同性が極めて低い新規なPLA分解リパーゼであることがわかっている。今回はさらに詳しい *plaM4* の諸性質について解析するため、発現ベクター pLA-NH を構築し、*PlaM4* の精製と至適条件、基質特異性および活性に及ぼす金属イオンの影響について検討を行った。その結果、*PlaM4* は50℃で2時間の反応においてもその活性を維持することのできる熱安定性リパーゼであった。

Characterization of novel biodegradable plastic degradation enzyme from metagenomic libraries

○Daisuke MAYUMI¹, Yukie AKUTSU-SHIGENO², Nobuhiko NOMURA¹, Hiroo UCHIYAMA¹, Toshiaki NAKAJIMA-KAMBE¹
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²JST. PRESTO)

Key words metagenomic libraries, poly (L-lactide), lipase, thermostable enzyme

1A15-4 Anammox 菌叢由来 DNA のショットガンゲノムアレイによる細菌叢遷移の分析

○横井 崇秀¹, 加来 佳子¹, 高橋 牧子¹, 鈴木 洋之¹, 生田 創²,
井坂 和², 角野 立夫², 我妻 雅子¹
(¹ (株) 日立製作所ライフサイエンス推進事業部, ² 日立プラント建設)

我々は塩基配列未知の微生物に対して網羅的な遺伝子発現解析を実現するマイクロアレイ (ショットガンゲノムアレイ) を考案し、平成16年度大会において発表を行った。本発表においては塩基配列未知の微生物に対応可能であるショットガンゲノムアレイの特徴を活用し、基板上に細菌叢由来ゲノムライブラリーを固定化したマイクロアレイを用いた細菌叢評価方法について検討を行った。ゲノムDNAライブラリーは集積培養によって得られたAnammox細菌叢より回収したゲノムDNAより作製し、ガラス基板上に任意の約2,000クロンを固定化した。比較対照試料として集積前および集積後の細菌叢ゲノムDNAを調製した。それぞれのゲノムDNAを鋳型とし、ランダムプライマーを用いてCy3あるいはCy5標識を行った。それぞれの標識DNAを用いた競合ハイブリダイゼーションによって得られた標識信号パターンを観察した結果、集積培養によって増加あるいは減少した菌体由来すると推察される塩基配列が確認された。この結果からショットガンゲノムアレイにより、多様な細菌叢の状態を標識信号パターンによって評価すると同時に、複数の菌体を個別に識別できる遺伝子マーカーの取得が可能であることが示された。

Analysis of microbial community for Anammox sludge by Shotgun genome microarray.

○Takahide YOKOI¹, Yoshiko KAKU¹, Makiko TAKAHASHI¹,
Hiroyuki SUZUKI¹, Hajime IKUTA², Kazuichi ISAKA²,
Tatsuo SUMINO², Masako WAGUTSUMA¹
(¹Hitachi, Ltd., Life Science Group, ²Hitachi Plant Engineering & Construction Co. Ltd.)

Key words microbial flora, genome array, anaerobic ammonium oxidation