

2S1PM3 機能発現に基づく環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析

○津田 雅孝, 小野 玲, 宮崎 亮, 府中 玄樹, 永田 裕二
(東北大院・生命)

土壌環境での物質循環には未だ培養が困難な大多数の細菌による分解が重要な役割を果たすことから、これら細菌群には新規反応特性のある分解酵素をコードする遺伝子が豊富に存在すると示唆される。我々はこのような遺伝情報を未利用遺伝子資源として捉え、土壌から直接抽出した長鎖DNAを用いる手法と分解遺伝子自身が持つ水平伝播能を利用する手法の両者を主に用い、多環芳香族化合物分解能や有機ハロゲン化合物脱ハロゲン化能を発現する遺伝子を、その宿主細菌株分離過程を経ることなく、取得・解析している。

ナフタレン完全分解酵素遺伝子群の初発酸化酵素遺伝子のみを破壊した誘導体遺伝子群をもつ γ -プロテオバクテリアを受容菌株とし、油井土壌から調製したDNAを広宿主域性コスミドにクローン化した土壌DNAライブラリーによる形質転換と本土土壌との直接接合の両手法で、ナフタレン完全分解能が回復した誘導体株を取得した。形質転換株保有コスミド上には、ナフタレンをサリチル酸までに分解するために必要な分解遺伝子が存在していた。また、接合により取得した誘導体株には80又は200 kbの自己伝達性プラスミドが捕捉されており、ナフタレン完全分解に必要な全遺伝子を持っていた後者プラスミドは広宿主域性を示した。一方、高度塩素化難分解性農薬 γ -HCH (hexachlorocyclohexane) 完全分解の鍵となる脱ハロゲン化酵素LinAとLinBの機能的ホモログ遺伝子の土壌からの取得のために、 γ -HCH完全分解能がある α -プロテオバクテリア株由来のlinAまたはlinB変異株を受容菌とし、土壌DNAライブラリーによる形質転換と土壌との直接接合の両手法で、 γ -HCH完全分解能回復誘導体株を選択した。前者でlinAホモログを取得し、後者でlinBホモログをもつプラスミドを捕捉した。後者プラスミドは、他の α -プロテオバクテリア群細菌に自己接合伝達可能で、新規な複製・分配装置をコードしていた。しかし、取得した遺伝子自体は機能相補に用いた受容菌株と進化的類縁性が高い細菌由来の既知分解遺伝子と極めて高い相同性を示した。また、目的遺伝子存在量が少ない非汚染土壌からの機能相補による遺伝子取得は困難であった。

上記結果を踏まえ、新規性のある遺伝子の効率的取得のために、人工的に汚染した非汚染土壌から、進化系統的に類縁性の低い複数受容菌株を使用し、微弱な酵素活性発現の検出可能なスクリーニング系での芳香族化合物分解初発酸化酵素遺伝子の取得に着手した。実際には、ポットに入れた非汚染土壌に複数種芳香族化合物を添加後、当該化合物分解酵素遺伝子の量的変動を経時的に検討し、これら遺伝子が十分増えた時点で土壌DNAライブラリーを作製した。受容菌宿主株として α -、 β -、 γ -プロテオバクテリアを使用し、インディゴ産生能を受容菌宿主株に賦与するコスミドクローンを土壌DNAライブラリーから選択した。一般に芳香族化合物初発酸化酵素は、インドールを青色のインディゴに変換する活性を備えている。この方法で、特定宿主株でのみインディゴ産生能を発現する新規の芳香族化合物分解初発酸化酵素遺伝子を取得した。

また我々は、分解酵素遺伝子が2コピーの挿入配列(IS)に挟まれたIS複合型トランスポゾン内に存在することが希でないことを踏まえ、このようなトランスポゾン内に存在する分解酵素遺伝子を土壌DNAから直接取得・解析しており、これについても述べる。

Isolation and characterization of functional genes for degradation of environmental pollutants from soil samples by cultivation-independent techniques

○Masataka TSUDA, Akira ONO, Ryo MIYAZAKI, Genki FUCHU, Yuji NAGATA
(Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

Key words Functional metagenomics, Soil DNA, Xenobiotics-degrading genes, Mobile genetic elements

2S1PM4 遺伝子発現制御に基づいたメタゲノムアプローチ

○渡辺 一哉
(海洋バイオ研)

生物は、周辺環境に対応してその機能を調節する。この調節において最も重要なのが遺伝子の発現制御(転写制御)であり、mRNAの変動からその細胞の状態を知ろうとするのが transcriptomics である。原核生物では、関連機能をコードする一群の遺伝子(一つの酵素のサブユニットなど)が同一の発現制御機構下に一度に転写されること(オペロンの形成)により、細胞機能制御を省力化している。我々は、微生物集団の機能解析やその中の未知有用遺伝子の探索を目指したメタゲノムアプローチにおいて、微生物の遺伝子発現制御を利用した手法の開発を行ってきたが、今回はその中からSIGEX法およびcommunity transcriptome法について紹介する。Substrate-induced gene expression screening (SIGEX)は、それまでのスクリーニング法では獲得が難しいメタゲノム中の遺伝子にもアクセスするために開発された新しいコンセプトのスクリーニング法である。従来のメタゲノムライブラリー利用法においては、遺伝子配列や酵素活性に依存したスクリーニング法により目的遺伝子をもつクローンの選択が行われてきた。これらのうち遺伝子配列に依存したスクリーニング法(PCR法など)は、既知の遺伝子配列(その多くが培養のしやすい微生物からとられたもの)に依存したものであり、新規性の高い遺伝子はとれない。また、酵素活性に依存したスクリーニング法には、組換えホストに導入しただけで活性型酵素として発現される酵素遺伝子はあまり多くないという問題がある。これに対し、SIGEXは遺伝子の発現誘導活性に依存したスクリーニング法である。これは、多くの代謝系酵素は基質や反応生成物などに依存して誘導的に発現すること、原核生物の代謝系遺伝子の多くがオペロンを形成しており発現制御因子は代謝系酵素遺伝子の近傍にあること、などの知見に基づくものである。本発表では、SIGEXを用いて新規活性を持ったP450遺伝子などが得られた例を紹介する。

community transcriptome法は、微生物集団内で発現している遺伝子(mRNA)を解析することにより、その微生物集団の機能を解析しようとする方法である。1990年代に発展した分子生態解析は、一種類の特定遺伝子の配列の多様性から生態系内に存在する微生物の多様性を理解しようとするものである。この解析に最も頻りに利用されてきたのが、微生物分類同定の分子系統マーカーとして広く利用されている16S rRNAをコードする遺伝子である。この解析では、集団内に存在する微生物を個体レベルで分子系統的に同定し、それぞれの微生物が何をしているかは分子系統情報から間接的に推測する。一方community transcriptome法では、個体レベルの分子系統情報には頼らずに、発現している遺伝子の配列から予測された機能から、微生物集団内で何が行われているか直接的に知ろうとする。本発表では、community transcriptome法を用いて石油分解コンソーシアを解析した例を紹介する。

Metagenome approaches based on gene expression regulation

○Kazuya WATANABE
(MBI)

Key words SIGEX, environmental transcriptome