

メタゲノムライブラリの構築および新規耐熱性酵素の開発

奥村 史朗^{*1}

Construction of metagenomic library and development of new thermostable enzymes

Shiro Okumura

ペットボトルや半導体の洗浄に広く利用されている過酸化水素の排水処理については近年環境負荷が少ないカタラーゼによる分解処理が普及してきた。しかし過酸化水素分解時の発熱のため、使用するカタラーゼには耐熱性が要求されている。そこで、高温環境中の微生物群のメタゲノムを採取し、そこからカタラーゼ遺伝子を探索し、単離・培養を介さずに耐熱性に優れたカタラーゼの開発を目指した。作製したメタゲノムライブラリに対して、カタラーゼ遺伝子保存領域を対象とした縮重プライマーを設計し、PCR 法によるスクリーニングを行い、増幅産物の塩基配列を決定した。また、その際に得られた増幅産物を In-Fusion クローニングにより既存のカタラーゼ遺伝子の相当部分に置換し、その一部が高温環境微生物由来である組換えカタラーゼを作製してその耐熱性を調べた。

1 はじめに

現在ペットボトルや半導体の洗浄に、過酸化水素を含有した洗浄液が多く用いられている。こうした工場からは過酸化水素を含む排水が排出されるが、過酸化水素は発がん性があるとされていることから、排水処理が必要である。これまでは活性炭や還元剤などの化学薬品による処理が行われてきたが、近年、カタラーゼによる酵素処理が行われるようになってきた。

カタラーゼによる排水処理は従来法に比べて高コストであるが、取り扱いが簡単で環境負荷の小さな処理法であることからシェアが伸びている。カタラーゼによる過酸化水素の分解は発熱反応であり、1%の過酸化水素水を完全に分解すると約 6℃の温度上昇が見込まれる。工場では 10～30%の濃度の過酸化水素が用いられており、特に夏季には発熱によるカタラーゼの失活が見られるため、耐熱性に優れたカタラーゼが求められている。そこで本研究においては、高温湧水環境からメタゲノムライブラリを構築し、それを用いたカタラーゼの耐熱性の向上に取り組んだ。

2 研究、実験方法

2-1 メタゲノムの抽出

塚原地獄（大分県）、雲仙地獄（長崎県）、栗野岳地獄（鹿児島県）（図 1）において 50℃～82℃の環境にある土砂を採取し、Zhou らの方法¹⁾の方法を改変し、これらのサンプル中のメタゲノムを抽出した。具体的

には 5 g のサンプルに 13.5 mL の DNA extraction buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM Sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% CTAB, pH8.0) および 100 μ L の Proteinase K (10 mg/mL) を加え、225 rpm で 37℃, 30 分振とうし、次に 1.5 mL の 20% SDS を加えて、65℃の温水浴で穏やかに攪拌しながら 2 時間インキュベートした。インキュベート後のサンプルを 6,000 $\times$ g, 10 分遠心して上清を回収し、これに同量の Chloroform と Isoamyl alcohol の混合液 (24:1, vol/vol) を加えて十分攪拌した後、遠心により水溶液層を回収し、0.6 倍量の Isopropanol を加え、室温に 1 時間静置した。沈殿を 16,000 $\times$ g, 20 分遠心して回収し、70% 冷 Ethanol で洗浄し、軽く乾燥後、滅菌水に溶解した。

2-2 メタゲノムライブラリの構築

前項で抽出したメタゲノム DNA を BamH I, Pst I, EcoR I の 3 種類の制限酵素で切断し、3 パターンの断片化 DNA を作製した。それぞれの断片化 DNA を、同じ制限酵素で処理した pSTV28 (TaKaRa 製) とライゲーション後、*E. coli* DH5 α に形質転換し、高温湧水環境のメタゲノム DNA のライブラリを作製した。

2-3 カタラーゼ遺伝子のスクリーニング

複数存在するカタラーゼ保存領域のうち特定の 2 か所を対象とした縮重 Primer を設計し、これを用いて、前項で構築したライブラリをテンプレートとするリアルタイム PCR によるスクリーニングを行った。このスクリーニングによりメタゲノム由来のカタラーゼ遺伝子のうち縮重 Primer に挟まれた部分の増幅物を得る

^{*1} 生物食品研究所

3-2 カタラーゼ遺伝子のスクリーニング

構築した高温湧水環境メタゲノムライブラリを対象にリアルタイム PCR によるカタラーゼ遺伝子のスクリーニングを行った。保持するクローンのうち 1,356 クローンについてスクリーニングを行い、38 個の耐熱性カタラーゼ遺伝子候補が得られた。増幅があったクローンについてサンガー法により DNA 配列を決定したが、決定した範囲ではカタラーゼの全長配列やそのプロモータは見つからなかった。リアルタイム PCR で得られた耐熱性カタラーゼ遺伝子候補についても DNA 配列を決定し、BLAST 検索により相同性のある遺伝子を検索して近縁の生物種を決定した上で、増幅物間の相同性から系統樹を作製した (図 2)。

3-3 新規耐熱性カタラーゼ遺伝子の発現とその耐熱性

次に、既存のカタラーゼの遺伝子を発現用ベクター (pET30a+) に導入して発現系を構築し、前項のスクリーニングで得た耐熱性カタラーゼ遺伝子候補のうち 5 つについて、In-Fusion 法を用いて耐熱性カタラーゼ遺伝子候補を既存のカタラーゼの遺伝子の相当部分に入れ替えて導入し、既存のカタラーゼと耐熱性カタラーゼ遺伝子候補のキメラ遺伝子を作製し、それを発現させてカタラーゼの耐熱性を調べたところ、既存のカタラーゼと比較して約 10℃耐熱性が向上しており (図 3)、高温環境メタゲノムを用いたカタラーゼの耐熱性向上が有効な手法であることを確認できた。

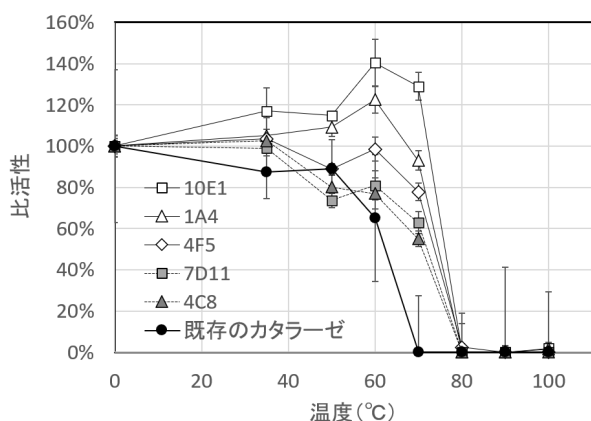


図 3 キメラカタラーゼの耐熱性
凡例の記号はクローンの整理番号

4 今後の展開

まず、今回既存のカタラーゼに組み込んだ5つの候補以外にも33個の耐熱性カタラーゼ遺伝子候補が得られていることから、これらについても同様に

*Rhizobium*属細菌のカタラーゼに組み込んだ上で、その耐熱性を検討する必要がある。

次に、耐熱性カタラーゼ遺伝子候補が得られたメタゲノムライブラリのクローンについて、得られた遺伝子の前後の配列を決定し、耐熱性遺伝子部分の前後を拡張してから既存のカタラーゼに組み込むことで、カタラーゼ遺伝子全体に対する耐熱性カタラーゼ遺伝子の構成割合を高め、より高い耐熱性を持つカタラーゼの作出を検討する。

さらに、高温環境メタゲノムライブラリについては、今後も継続的に拡充を進め、これを用いた他の産業用酵素の耐熱性の向上への応用を進めていくこととした。

5 謝辞

久留米工業高等専門学校富岡寛治教授には、研究の進め方や枠組みについて有益な助言をいただきました。また株式会社MKバイオからはカタラーゼ製剤およびその遺伝子情報を提供いただきました。心より御礼申し上げます。

この研究は2016年度の公益財団 柿原科学技術研究財団 バイオベンチャー等育成事業助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

5 文献

- 1) Zhou J. et al., Appl. Environ. Microbiol., 62, 316-322 (1996)
- 2) Nakayama M. et al., J. Biosci. Bioeng., 106, 554-558 (2008)
- 3) Morita H. et al., Microbes Environ., 22, 214-222 (2007)