



Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*

食虫植物ウツボカズラ消化液内共生細菌メタゲノムライブラリーからの
新規リパーゼ遺伝子のスクリーニング

(JBB, Vol. 112, No. 4, 315–320, 2011)

諸星 知広^{1*}・及川 学¹・佐藤 祥子¹・菊地 典子¹・加藤 紀弘²・池田 幸¹

環境中には多種多様な微生物が存在することが知られているが、その大部分は培養が困難な難培養性微生物である。この難培養性微生物には多くの遺伝子資源が眠っていると考えられ、新規性の高い遺伝子が得られる可能性が考えられる。これらの遺伝子資源にアプローチする手法の一つとしてメタゲノム解析が注目を集めている。メタゲノム解析とは、土壌や海水などの環境サンプルから培養を介さずに微生物ゲノムを直接抽出して解析を行う手法であり、実際にさまざまな環境メタゲノムから新規性の高い遺伝子がクローニングされてきた。一方で、筆者らはほとんど存在が注目されていないようなメタゲノムから新規遺伝子をクローニングすることを計画した。そこで注目したのが食虫植物ウツボカズラである。ウツボカズラは捕虫器と呼ばれる器官を持ち、内部に溜まった消化液に含まれる消化酵素により捕らえた昆虫を消化し、栄養分を取り込む。この消化酵素は最初のうちは捕虫器自身から分泌されるが、古い捕虫器では消化液内に存在する共生細菌が大部分を分泌していることが明らかになっている。筆者らは、この消化液内共生細菌メタゲノムから昆虫の消化に関わる新規遺伝子のクローニングができないかと考え、研究に着手した。

宇都宮大学標本温室内のウツボカズラ(図1)からスポイトで消化液を採取し、虫などの固形物を取り除いた後、消化液内共生細菌からメタゲノムを抽出した。共生細菌の構成を16S rRNA塩基配列を基に解析したところ、



図1. 本研究で使ったウツボカズラの捕虫器

*Burkholderia*属細菌、*Variovorax*属細菌および好酸性細菌で主に構成されていることが明らかとなった。別の食虫植物であるサラセニアの消化液内に生息する培養可能な細菌の構成は調べられているが^{1,2)}、今回のメタゲノム解析はそれらの結果と大きく異なっており、難培養性細菌を含めた実際の細菌構成を再現可能なメタゲノム解析の優位性が明らかとなった。

次に、共生細菌メタゲノムから新規遺伝子をクローニングするため、プラスミドベースのメタゲノムライブラリーの作製を行った。消化液内共生細菌は菌体密度が低いため、一つの捕虫器からは微量のメタゲノムしか抽出できない。そこで、抽出したメタゲノムを既報に基づいて全ゲノム増幅を行い³⁾、pUC118ベクターにクローニングを行った。その結果、挿入されたメタゲノム断片の総サイズが約280 Mbpのライブラリーを構築することに成功した。新規遺伝子クローニングのターゲットとして、昆虫の消化にも関わるリパーゼに着目した。基質であるトリブチリン含有培地上でハロを形成するクローンを選択したところ、2株のポジティブクローンを取得することに成功し、挿入断片のシーケンス解析の結果、既知のリパーゼと相同性を示す遺伝子(*lip1*および*lip2*)をコードするORFが存在することが明らかとなった。これらのリパーゼは弱酸性領域で高い活性を示し、特にLip2のアミノ酸配列の相同性解析結果から、新しいリパーゼファミリーに属する可能性が示唆された。

本研究では、極限環境のような特殊な環境ではなく、ウツボカズラ消化液内という、あまり注目されてこなかった環境中のメタゲノムから、新規機能性遺伝子をクローニングすることに成功した。私たちの周辺環境には、まだ陽の目を見ないメタゲノム資源が数多く眠っているはずであり、本研究で得られた知見が、これらの遺伝子資源からの新規遺伝子のクローニングに繋がる事を期待したい。

- 1) Siragusa, A. J. *et al.*: *Microb. Ecol.*, **54**, 324–331 (2007).
- 2) Peterson, C. N. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **10**, 2257–2266 (2008).
- 3) Zhang, K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 680–686 (2006).

* 著者紹介 ¹宇都宮大学大学院工学研究科物質環境化学専攻(助教) E-mail: morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp
²宇都宮大学大学院工学研究科科学祭先端システム専攻