

助成番号 0718

## eDNA-PCRによる海洋からの新規糖質加水分解酵素の取得に関する研究

林 秀謙

前橋工科大学工学部生物工学科

**概要** 現在、化石燃料に変わる資源として地球上に豊富に存在するセルロース系バイオマスおよびキチン系バイオマスの有効利用は非常に重要である。これらのバイオマスを微生物より糖化を行えば、エタノール、水素および化学工業製品等への変換が可能になる。海洋には海藻、海老および蟹等甲殻類等の非常に豊富なバイオマスが存在する。これらのバイオマスの分解(糖化)に利用できる微生物は種類も少なく、その分解活性が弱いものがほとんどである。また、海洋中の培養可能な細菌は1%以下と言われており、そのほとんどが難分離、難培養細菌で占められている。近年、培養を介すことなく直接環境試料からDNA (environmental DNA=eDNA)の抽出を行い、ライブラリー構築が行われている。eDNAを環境微生物群集全体の遺伝子プールと考えると、有用な遺伝子のクローニングを行う方法である。神奈川県足柄下郡真鶴町の真鶴湾沖および真鶴港周辺の浜辺より海水のサンプリングを行なった。海水はステリベクスフィルターを使用して濃縮を行ない、海水中の微生物の濃縮を行なった。ステリベクスフィルターよりeDNAの回収を行なった。回収したeDNAを鋳型として $\beta$ -1,4-キシラナーゼ(HG10)、アガラーゼ(HG16)、キチナーゼ(HG18)および $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(HG26)の保存領域から作成したプライマーを使用して各糖質加水分解酵素遺伝子断片の増幅を行なった。真鶴湾沖より回収したサンプルよりキチナーゼ遺伝子断片の増幅に成功した。しかしながら他の遺伝子については増幅することが出来なかった。これらの断片のクローニングを行い、85クローンの解析を行った。それらの塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸を解析したところ、14種類のキチナーゼに分類された。これらのキチナーゼは既存のキチナーゼと88%以下の相同性を示し、新規のキチナーゼと推定された。さらに61クローンが96%以上の相同性を示し、同一または近縁のキチナーゼと推定された。これらのキチナーゼは*Bacillus circulans*のchitinase A1と52%の相同性を示した。これらのキチナーゼは他の海洋由来のサンプルからも検出されていない。また、eDNAサンプルを使用して16S rRNA遺伝子ライブラリーおよびT-RFLPにより細菌叢の解析を行った。その結果、"*Gammaproteobacteria*"、"*Alphaproteobacteria*"、*Bacteroidetes*、*Flavobacteriaceae*、*Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Roseobacter* sp.、*Synechococcus* sp. に属する配列を検出した。これらの配列の多くの未同定の菌種由来であった。しかしながら、最も多く検出したキチナーゼ遺伝子断片の由来と考えられる菌種は推定することは出来なかった。今後は得られたキチナーゼ遺伝子断片を基に完全長キチナーゼ遺伝子の取得を行う予定である。

## 1. 目的

化石燃料の大量消費による大気中のCO<sub>2</sub>濃度の上昇は地球温暖化等の深刻な環境問題を引き起こしている。化石燃料に変わる資源として地球上に豊富に存在するセルロース系バイオマスおよびキチン系バイオマスの有効利用は非常に重要である。これらのバイオマスを微生物より糖化を行えば、エタノール、水素および化学工業製品等

への変換が可能になる。海洋には海藻、海老および蟹等甲殻類等の非常に豊富なバイオマスが存在する。これらのバイオマスの分解(糖化)に利用できる微生物は種類も少なく、その分解活性が弱いものがほとんどである。また、海洋中の細菌は多くの難分離、難培養細菌で占められている。

近年、培養を介すことなく直接環境試料からDNA

(environmental DNA = eDNA)の抽出を行い、ライブラリー構築(eDNA ライブラリーまたはメタゲノムライブラリー)が行われるようになってきた (Cottrell *et al.*, 1990; Rondon *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2005)。eDNA を環境微生物群集全体の遺伝子のプールと考えて、これらの中より有用な遺伝子のクローニングを行う方法である。本方法より難培養、難分離細菌由来の有用な遺伝子も入手可能になった。さらに新規遺伝子の取得に eDNA-PCR 法も使用されている。既知物質を生産する遺伝子配列情報を基にプライマーを設計し eDNA に対して PCR を行い、ある機能を持った既知遺伝子を見つける試みである。同じファミリーに属する新規酵素の取得、酵素の機能改良または多様性の研究であれば eDNA-PCR 法は十分な威力を発揮できる (Hayashi *et al.*, 2005; Sunna *et al.*, 2003)。本研究は海洋中の難分離、難培養細菌由来の糖質加水分解酵素を eDNA-PCR 法を使用して取得を行い、豊富な海洋資源であるセルロース系バイオマスおよびキチン系バイオマスの有効利用を目指す研究である。

## 2. 材料と方法

### 2.1 海水のサンプリング

海水サンプルは神奈川県足柄下郡真鶴町の真鶴港沖において 2007 年 5 月 17 日に海面表層より回収を行なった。このサンプルを T30 と名付けた。また、2007 年 10 月 18 日に真鶴港周辺の海岸より海水のサンプリングを行なった。2007 年 10 月 19 日には 5 月 17 日と同様、真鶴港沖にて海面表層より海水のサンプリングを行なった。このサンプルを OKI と名付けた。

### 2.2 DNA の抽出

回収した約 10 L の海水をペリスタポンプより海水をステリベクス (Millipore, Bedford, MA) に流し込み、ステリベクスのフィルター上に細菌の濃縮を行なった。濃縮後、ステリベクスから海水を取り除き、DNA を抽出するまで -20°C で保存を行なった。

ステリベクスを融解後、1.8 ml の SET buffer (20% Sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.6) を注入した。続いて、62  $\mu$ l のリゾチウム (5 mg/ml) を注入した。攪拌後、15 分間氷上に置いた。16  $\mu$ l の 25% の SDS 溶液を添加して、室温で 1 時間ゆっくりと転倒攪拌を行なった。50  $\mu$ l プロテアーゼ K (20 mg/ml) の添加を行ない、室温で 3

～4 時間、転倒攪拌を行なった。5 ml の注射器でステリベクス内より溶菌液の回収を行なった。さらにステリベクスに 1 ml の STE buffer を加え洗浄を行なった。洗浄液は溶菌液ともに回収した。1/10 容量の酢酸ナトリウムおよび 2 倍容量のエタノールを加え、氷中に 15 分間、静置した。15,000 rpm、10 分間、遠心分離を行なった。70% エタノールで洗浄後、乾燥を行ない、500  $\mu$ l の TE に溶解した。フェノール-クロロホルム処理を行ない、15,000 rpm の遠心分離を行ない、上層を回収後、エタノールを加え、氷中に 15 分間、静置した。15,000 rpm、10 分間、遠心分離を行なった。70% エタノールで洗浄後、乾燥を行ない、100  $\mu$ l の TE に溶解した。その後、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて DNA の精製を行なった。

### 2.3 16S rRNA 遺伝子ライブラリーの構築

二つのユニバーサルプライマー 27F (5' AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG 3') and 1492R (5' GGTTACCTTGTTAC GACTT 3') を使用して 16S rRNA 遺伝子領域の増幅を行なった (Lane, 1991)。PCR 反応には抽出した細菌由来のゲノム DNA、1.25 U の TaKaRa *Ex Taq*、5  $\mu$ l の *Ex Taq* buffer、4  $\mu$ l の dNTP mixture (それぞれの塩基を 2.5 mM づつ含む)、25 pmol のそれぞれのプライマーを加え、50  $\mu$ l で反応を行なった。反応には Biometra PCR TGRADIENT を使用して、95°C、3 分間反応後、20 サイクル (95°C、30 秒、50°C、30 秒、72°C、1 分 30 秒) の反応を行ない、最後に 72°C、10 分の伸長反応を行なった。増幅した 16S rRNA 遺伝子は UltraClean PCR Clean-up Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., CA) を用いて精製を行なった。精製した 16S rRNA 遺伝子を Original TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて形質転換を行ない、16S rRNA 遺伝子ライブラリーの構築を行なった。得られた形質転換体を M13F プライマーと M13R プライマーを使用してコロニー-PCR により挿入された 16S rRNA 遺伝子断片の増幅を行った。増幅断片を MultiScreen 96-well filter plates (Millipore) を使用して精製を行った。

### 2.4 糖質加水分解酵素遺伝子断片のクローニング

抽出した細菌由来のゲノム DNA を鋳型として Table 1 に示した各プライマーセットを用いて糖質加水分解酵素遺伝子断片の増幅を行った。反応には Biometra PCR TGRADIENT を使用して、95°C、3 分間反応後、30 サイクル

**Table 1.** PCR primer sequences used in this study

Oligonucleotide	Sequence
Chi F1 (HG18)*	5' ACGGCGTGGACATCGAYTGGGART 3'
Chi R1 (HG18)*	5' CCCAGGCGCCGTAGARRTCRTAY 3'
Chi F2 (HG18)*	5' CGTGGACATCGACTGGGARTWYCC 3'
Chi R2 (HG18)*	5' CCCAGGCGCCGTAGARRTCRTARSWCA 3'
xynFw1 (HG10)**	5' CAYDSNYTNDTNTGGCA 3'
xynRv1 (HG10)**	5' TCRTTNACNACRTCCCA 3'
xynFw2 (HG10)**	5' TGGGAYGTNGTNAAYGA 3'
xynRv2 (HG10)**	5' YNKNRTARTCRTRTA 3'
HG16 Fw1	5' GATKMNACYCARGARAT 3'
HG16 Rv1	5' TGRTARTCYTGRAABGG 3'
HG26 Fw1	5' CCDCAAGATTGTAAGTGG 3'
HG26 Rv1	5' RCTRTRCRCCCCARTANCC 3'

\* Lain *et al.*, (2007), \*\* Hayashi *et al.*, (2005)

ル(95°C, 30 秒、50°C, 30 秒、72°C, 1分30秒)の反応を行ない、最後に 72°C、10 分の伸長反応を行なった。上記の反応で増幅しないサンプルについてはアニーリング温度を 50~60°Cの間において変えて検討を行った。増幅した遺伝子断片は pCR<sup>®</sup>2.1 クローニングベクターにクローニング後、大腸菌 INVαF' を (Invitrogen) 形質転換した。得られた形質転換体を M13F プライマーと M13R プライマーを使用してコロニー-PCR により挿入された 16S rRNA 遺伝子断片の増幅を行った。増幅断片を MultiScreen 96-well filter plates (Millipore) を使用して精製を行った。

## 2. 5 DNA 塩基配列の決定と系統解析

16S rRNA 遺伝子ライブラリーで得られた断片については 5'側約 500 bp の塩基配列の決定を行った。27F プライマーまたは 520R プライマー (5' ACCGCGGCTG CTGGC 3') (Lane, 1991) を使用して Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) より反応を行い、ABI PRISM 3130 ジェネテックアナライザーを使用して解析を行った。塩基配列は GENETYX-Mac Version 11.2 (Software Development Co., Tokyo)、Blast 解析および Ribosomal Database Project-II (RDP-II) によりキメラチェックを行った (Cole *et al.*, 2003)。

決定した塩基配列については CLUSTAL W を使用してアライメントを行った (Thompson *et al.*, 1994)。系統樹は近隣結合法により作成を行った (Saitou and Nei, 1987)。

糖質加水分解酵素遺伝子断片については M13F プライマーおよび M13R プライマーを使用して 16S rRNA 遺伝子同様に塩基配列の決定を行った。糖質加水分解酵素のアミノ酸配列は CLUSTAL W を使用してアライメントを行った (Thompson *et al.*, 1994)。系統樹は近隣結合法により作成を行った (Saitou and Nei, 1987)。

## 2. 6 T-RFLP による海水サンプルの細菌叢の解析

T-RFLP 解析は 27F プライマーと 1492R プライマーを使用して、以前に報告した方法で行った (Sakamoto *et al.*, 2003)。27F プライマーは 6-FAM (6-carboxyfluorescein, Applied Biosystems) でラベルされたプライマーを使用した。PCR の反応条件は 16S rRNA 遺伝子を増幅した時とサイクル数が 30 サイクル以外は同様で行った。PCR 産物はポリエチレングリコール (PEG 6000) により精製を行い、20 μl の滅菌水に溶解した (Hiraishi *et al.*, 1995)。精製した PCR 産物は *Hha*I、*Msp*I、*Alu*I または *Hae*III によって切断を行った。制限酵素により切断した PCR 産物は Hi-Di<sup>™</sup> Formamide (Applied Biosystems) と DNA 断片サイズスタン

データ (GS-500 ROX と GS-1000 ROX [Applied Biosystems]) を混合した。T-RFs の長さの解析は ABI PRISME 3100 ジェネテックアナライザー (Applied Biosystems) の Genescan モードを使用して解析を行った。DAN 断片の長さは GenScan ソフトウェアのローカルサザンモードにより計算を行った。25 の蛍光強度より小さい T-RFs のピークは解析から除外した。主要な T-RFs は 16S rRNA 遺伝子ライブラリーで得た配列のコンピュータシミュレーションより同定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 16S rRNA 遺伝子ライブラリーによる細菌叢解析

T30 および OKI サンプルの細菌叢を 16S rRNA 遺伝子ライブラリーにより解析を行なった。T30 および OKI のそれぞれのライブラリーよりランダムに 182 クローン (T30 91 クローン, OKI 91 クローン) を分離して 5' 側、約 500 bp の塩基配列を決定した。相同性解析の結果、これらのクローンはドメインバクテリアに属していた (Fig. 1 と Fig. 2)。182 クローンの内、2 クローンのみが既存の菌種に属していた。残りのクローンは未分離もしくは未同定な菌種由来の配列と推定された。海水中には多く難培養、難分離細菌が多く存在することが既に多くの報告があるが、本研究においても同様な結果が示された。また、これらのクローンは、"*Gammaproteobacteria*"、"*Alphaproteobacteria*"、*Bacteroidetes*、*Flavobacteriaceae*、*Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Roseobacter* sp.、*Synechococcus* sp. 等に属していた。この結果は今までに解析されている海洋サンプルの結果と一致する。

#### 3.2 T-RFLP による細菌叢の解析

T30 と OKI サンプルの T-RFLP による細菌叢を制限酵素 *Hha*I、*Msp*I、*Alu*I および *Hae*III より解析を行なった (Fig. 3A と 3B)。主要な T-RFs は 16S rRNA 遺伝子ライブラリーより検出した配列をコンピュータシミュレーションより同定を行なった。16S rRNA 遺伝子ライブラリーで検出された "*Gammaproteobacteria*"、"*Alphaproteobacteria*"、*Bacteroidetes*、*Flavobacteriaceae*、*Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Roseobacter* sp.、*Synechococcus* sp. 等由来である推定できる T-RFs が検出された。しかしながら、16S rRNA 遺伝子ライブラリーでは 5' 側約 500 bp の塩基配列を決定したのみであったために、500 bp 以上の T-RFs の同

定は出来なかった。また、系統樹より近縁の菌種またはクローンから T-RFs の同定も可能な場合もあるが、T30 および OKI サンプルのクローンから検出した配列は最も近縁の菌種またはクローンにおいてもそのほとんどが 95% 以下であった。つまり、16S rRNA 遺伝子配列はこれらのクローンはかけはなれているため、最も近縁の菌種またはクローンから T-RFs の推定は不可能であった。今回、16S rRNA 遺伝子ライブラリーは 182 クローンと細菌叢の多様解析においては十分な解析数ではなかった。そのため、細菌叢の全体像を捕らえるために T-RFLP による解析を行なった。その結果、16S rRNA 遺伝子ライブラリーでは捕らえることが出来なかった、T-RFs も多数検出し、その細菌叢の全体像を捕らえることが可能になった。

#### 3.3 糖質加水分解酵素遺伝子断片のクローニング

キチナーゼ増幅用プライマー、Chi F2 プライマーおよび Chi R2 プライマーを使用した時に T30 サンプルおよび OKI サンプルの両方より約 250 bp の遺伝子断片を増幅した。この断片を pCR<sup>®</sup>2.1 にクローニングを行い、大腸菌 INVaF<sup>+</sup> を形質転換した。T30 サンプルにおいては 44 のクローン、OKI サンプルより 41 のクローンを得た。これらのクローンの遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列を SWISS PROT によって解析を行ったところ、これらの遺伝子断片は糖質関連酵素ファミリー 18 に属しており、14 種類のキチナーゼに分類された (Fig. 4)。これらのキチナーゼは既存のキチナーゼと 88% 以下の相同性を示し、新規のキチナーゼと推定された。61 のクローン (T30 が 31 クローン、OKI が 30 クローン) のそれぞれが 96% 以上の相同性を示し、同一もしくは近縁のキチナーゼと推定された。また、これらのキチナーゼは *Bacillus circulans* のキチナーゼ A1 と 53%、*Bacillus licheniformis* のキチナーゼ B と 52%、*Bacillus ehimensis* のキチナーゼ 80 と 52% の相同性を示した。Lian らは Chi F1、Chi R1、Chi F2 および Chi R2 を使用して海水サンプル使用してキチナーゼの多様性解析を行なっているが、本クローンは検出されていない (Lian *et al.*, 2007)。また、LeCleir らは様々な海水サンプルを使用して、本研究して使用した異なるプライマーを用いてファミリー 18 に属するキチナーゼ遺伝子断片のクローニングを行い、キチナーゼの多様性を示した (LeCleir *et al.*, 2004)。本研究とは異なったキチナーゼ遺伝子断片の増幅を行っているため、本研究で最も高頻度で検出したクローンとの比較

はできないが、*Bacillus circulans* や *Bacillus licheniformis* のキチナーゼの近縁のキチナーゼは検出されていない。また、本キチナーゼは時期が異なる2回サンプリングで高頻度に検出されることから、真鶴港沖に常時存在する細菌由来のキチナーゼと推定される。しかしながら、16S rRNA 遺伝子ライブラリーおよび T-RFLP による細菌叢の解析からは *Bacillus circulans* や *Bacillus licheniformis* 由来の 16S rRNA 遺伝子配列は検出されていない。そのため、本キチナーゼ遺伝子を持つ細菌は高頻度に存在する細菌由来ではないと考えられる。

他のクローンは *Clostridium thermocellum*、*Synechococcus* sp.、*Paenibacillus ehimensis* 等に近縁なキチナーゼが検出された (Fig. 4)。しかしながら、その相同性は 51~88%と決して高いものではなかった。ほとんどが未分離、未同定の菌種由来のキチナーゼと推定される。*Vibrio proteolyticus* と相同性が高い(90%)二つのクローンが OKI サンプルから検出されている。16S rRNA 遺伝子ライブラリーからも一つのクローンが検出されており、共に検出された唯一のクローンである (Fig. 2)。

真鶴港周辺の海岸より海水サンプルよりもキチナーゼ遺伝子断片の増幅に成功したが、増幅量が少なかったため今回は解析を行わなかった (Data not shown)。

$\beta$ -1,4-キシラナーゼ (HG10)、アガラーゼ (HG16) および

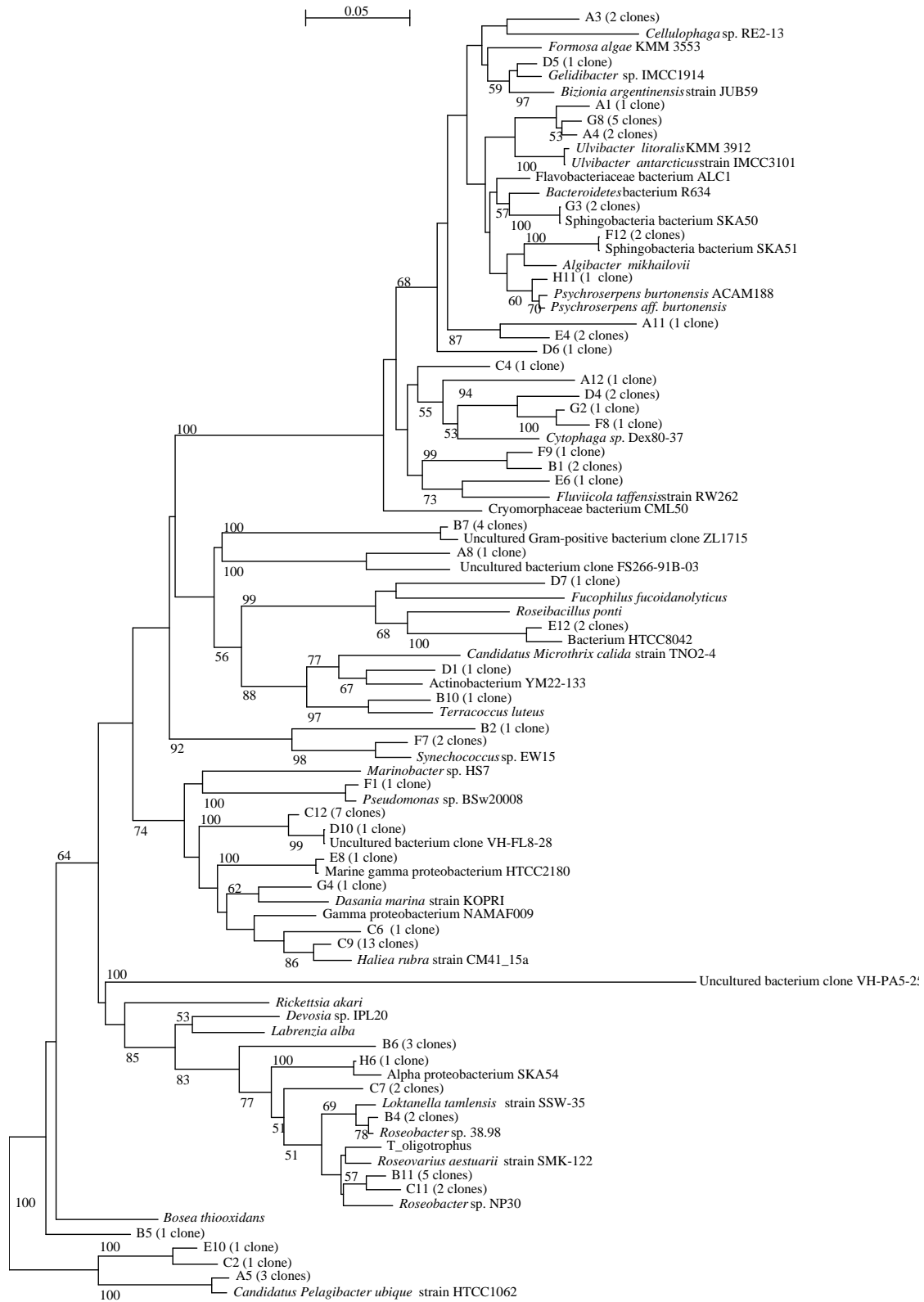
$\beta$ -1,3-キシラナーゼ (HG26) についてはどのサンプルからもそれらの遺伝子断片の増幅することが出来なかった。それらの遺伝子がサンプル中に存在しないか、今回使用したプライマーがそれらの遺伝子の増幅に適していなかった可能性もある。

#### 4. 今後の課題

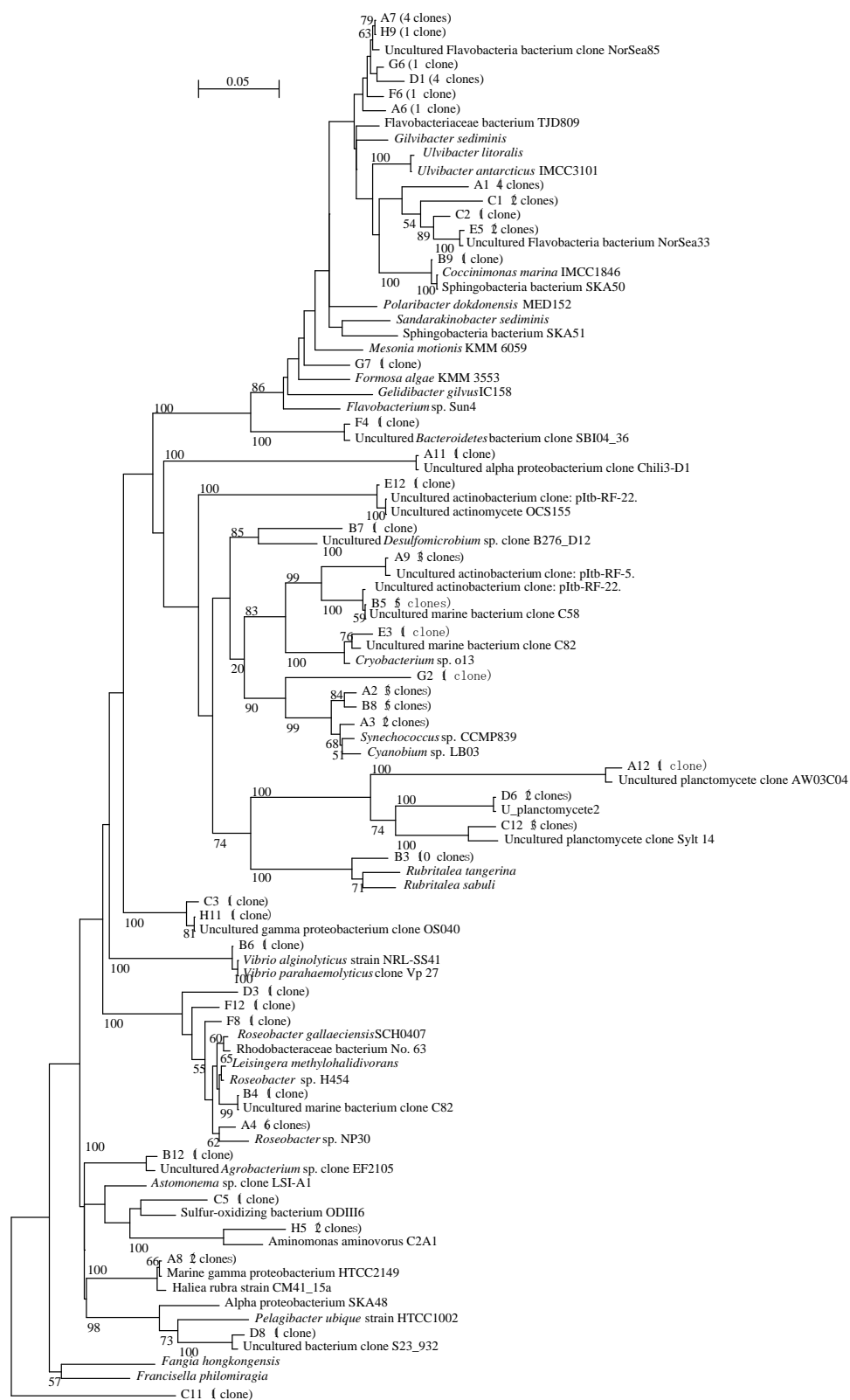
今回、新規キチナーゼと考えられる遺伝子断片の取得に成功した。これらの遺伝子断片の塩基配列を基にゲノムウォーキングを行い、完全長のキチナーゼ遺伝子の取得を行い、大腸菌で発現させ、その性質を明らかとする。さらに自己組織化マップ (SOM: Self-Organizing Maps) 等の解析を行い、その遺伝子の由来する細菌も明らかとする必要がある。

#### 謝辞

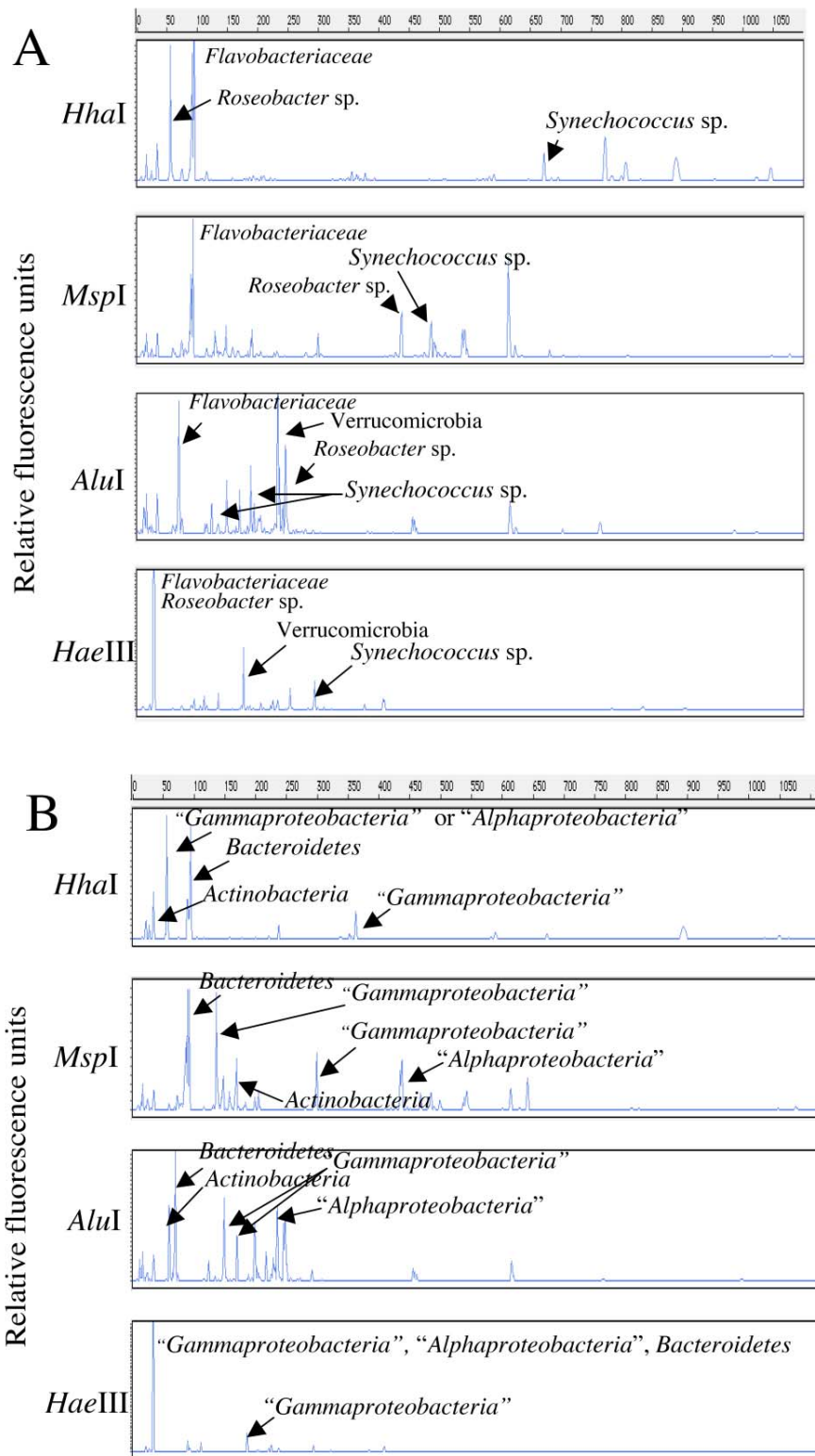
本研究の行うにあたり、海水のサンプリングおよび濃縮方法のご指導を頂いた、東京大学 海洋研究所の木暮一啓教授、浜崎恒二準教授、西村昌彦助教、谷口亮人博士にお礼申し上げます。また、研究のご助言を頂いた、(独)理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室の辨野義己室長にお礼申し上げます。



**Fig. 1.** Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA gene sequences from T30 samples. The tree was constructed using neighbor-joining analysis based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values (n = 100 replicates) of  $\geq 50$  are considered as parentages. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. Numbers in parentheses represent numbers of clones.

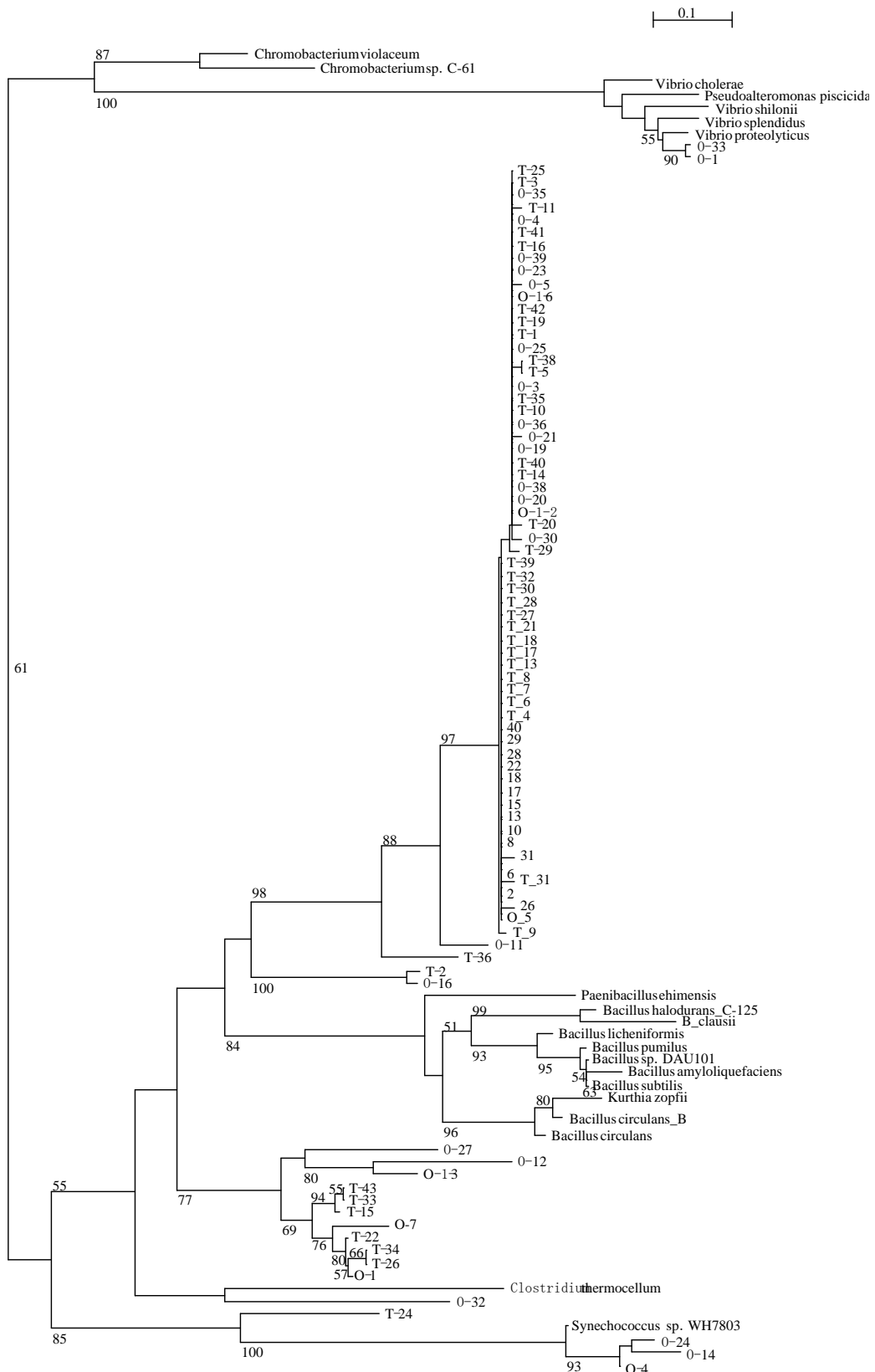


**Fig. 2.** Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA gene sequences from OKI samples. The tree was constructed using neighbor-joining analysis based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values (n = 100 replicates) of  $\geq 50$  are considered as parentages. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. Numbers in parentheses represent numbers of clones.



**Fig. 3.** T-RFLP analysis of *HhaI*, *MspI*, *AluI*, and *HaeIII* digested 16S rRNA genes from T30 and OKI samples. Major T-RFs are indicated by arrows. A; T30 sample, B; OKI sample.





**Fig. 4.** Phylogenetic analysis of chinase from marine sample and other homologous proteins. The phylogenetic analysis was performed using the CLUSTAL W and neighbor-joining method programs. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position.

引用文献

- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* **31**, 442-443
- Cottrell, M.T., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1990). Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2553-2557.
- Hayashi H, Abe T, Sakamoto M, Ohara H, Ikemura T, Sakka K, Benno Y. (2005). Direct cloning of genes encoding novel xylanases from the human gut. *Can J Microbiol.* **51**:251-9.
- Hiraishi, A., Kamagata, Y. & Nakamura, K. (1995). Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA gene from methanogens. *J Ferment Bioeng.* **79**, 523-529.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. pp.115-175. Edited by Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. John Wiley and Sons, New York.
- Lain, M., Lin, S., and Zeng, R. (2007). Chitinase gene diversity at deep sea station of the east pacific nodule province. *Extremophiles.* **11**. 463-476.
- LeClerc, G. R., Buchan, A., and Hollibaugh, J. T. (2004). Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 6977-6983.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2541-2547.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sakamoto, M., Hayashi, H. & Benno, Y. (2003). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol* **47**, 133-142.
- Sunna, A., and Bergquist, P.L. (2003). A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. *Extremophiles* **7**: 63-70.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673- 4680.

No. 0718

## Acquisition of Novel Glycoside Hydrolyase from Marine Using eDNA-PCR

Hidenori Hayashi

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Maebashi Institute of Technology

### Summary

The aim of this study was to identify novel glycoside hydrolyase genes from mixed genome DNA of seawater samples without bacterial cultivation. I attempted to obtain directly novel chitinase genes from mixed genome DNA of seawater, including bacteria. A short region (about 280-bp) of family-18 chitinase genes was amplified by PCR from the seawater sample with two degenerated primers ChiF1 and ChiR1, cloned into the plasmid vector, and introduced into *E. coli*. A total of 85 colonies in two samples from seawater (T30 and OKI) were subjected to sequence analysis with subsequent on line homology searches using databases. Fourteen different family 18 chitinase genes were recovered from these clones. These chitinases exhibited low sequence similarity (less than 88%) with the other known chitinase, were thought to be novel chitinase. Out of 85 clones, 61 had same chitinase genes. These chitinase (acids deduced from about 280-bp) exhibited amino acid sequence similarity to *Bacillus circulans* chitinase A1 with sequence identity of about 52% and were not detected in other seawater samples. The same samples (T30 and OKI) were characterized by the 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. A large number of species that are not yet known exist in the T30 and OKI samples. The 16S rRNA gene libraries and T-RFLP included the "Gammaproteobacteria", "Alphaproteobacteria", *Bacteroidetes*, *Flavobacteriaceae*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Roseobacter* sp., *Synechococcus* sp.. Bacteria, which related to a lot of detected chitinase (61 clones) were not detected from 16S rRNA gene libraries and T-RFLP.