

サブテーマ名：D 高速分子進化の環境応用
小テーマ名：D1 環境浄化・環境耐性微生物の分子育種

フェーズ I<3-2-a>

[概要]

- 環境浄化・環境耐性微生物におけるゲノムシャフリング（GS）法に必要なプロトプラスト化および再生法の確立、融合条件の検討し、実用化へ向けた条件検討を行った。
- NO_x 化合物を分解・浄化する微生物として自然界より環境耐性能力がある耐アルカリ耐熱脱窒菌の探索を行った。
- 環境汚染物質として硝酸性窒素やアンモニアが問題になっていることからこれらを低減する脱窒菌とアンモニア分解菌の 2 種類の菌株に着目し、分離したアンモニア分解菌、脱窒菌に対して GS 法を適用して特異性の拡大が実用化レベルで可能であることが示された。

[フェーズ I の研究成果]：

環境浄化・汚染物質分解菌の特異性を拡大ために、コア技術としてのこれまで報告例の少ないゲノムシャフリング（GS）法に必要な技術およびその問題点の抽出を試みた。同時にフェーズ II 以降で実際に利用する新たな環境耐性微生物から環境浄化に有用な微生物を探索するための新規スクリーニング技術を開発し、これを用いて環境浄化・環境耐性微生物のスクリーニングを行った。

環境浄化能を有するグラム陰性菌として *Pseudomonas putida* 502 株を、また、グラム陽性菌として *Rhodococcus sp.* 株について細胞融合による GS 法の適用を行うためのプロトプラスト化を検討した。その結果、どちらもリゾチーム処理により、プロトプラストを得ることに成功した。次に、*Rhodococcus sp.* 株について高効率なプロトプラスト化を目指し、リゾチーム感受性変異株の取得に成功した。しかし、いずれの菌株の場合も、次の細胞融合の段階で、細胞壁の再生条件および、細胞融合株と非細胞融合株との分離条件を明確に確立することが出来なかった。このことは、GS 法自体は、非常に新規性と有用性の高い分子育種法であるが、研究室で利用されている菌株に比べ、一般の土壌から分離されたような“慣らされていない”微生物に適用することに大きな制約があるということが明らかとなった。

NO_x 化合物を分解・浄化する微生物として自然界より環境耐性能力がある耐アルカリ耐熱脱窒菌のスクリーニング用の培地を検討し、土壌試料を中心に様々な環境から試料からスクリーニング系条件の適正化を行い、ガスを発生する微生物を取得することに成功した。そして、この微生物を純粋分離し、60℃、pH10 で生育する菌の純粋培養に成功した。取得した菌株の 16SrDNA 解析、生理化学的諸性質の解析によって同定した。この実験の過程で、培養中に発生するガスを採取する器具を考案し、実用新案（出願番号：2004-367536 出願日：2004 年 12 月 20 日）を出願した。採取したガス成分は窒素分子であり、取得した菌株が脱窒菌であることを明らかにした。本菌株は、16S rDNA 解析および生理化学的性質の解析により、AT-1 株を *Anoxybacillus pushchinoensis* と同定した。この研究に関しても、「脱窒菌株およびこれを用いた硝酸の除去方法」という名称で特許出願（出願番号：実願 2004-007025 出願日：2004 年 1 月 30 日）を行った。

[フェーズ II の研究成果]：

新たな生物資源としての環境耐性微生物から、環境浄化に有用な微生物を探索し、①その特異性を拡大するコア技術としての GS（ゲノムシャフリング）法を確立すること ②GS 法を活用し、有用微生物を育種し、環境浄化に応用することを目標とした。

フェーズ I で分離に成功した新規な高温アルカリ環境に耐性である脱窒菌 *Anoxybacillus pushchinoensis* AT-1 株への GS 法の適用を試みた。GS 法適用のための課題である菌体のプ

プロトプラスト化、細胞壁の再生条件を検討し、菌体をほぼ 100%プロトプラスト化する条件を見出した。また、再生培地としてソルビトールを用い、寒天濃度およびプロトプラストの接種方法を検討することにより、プロトプラストの 1%が再生する再現性の良好な条件を見出した。以上より細胞融合による分子育種を可能にする前提条件が整ったと考えられる。

アンモニア分解菌の分離では、畜産廃棄物の脱臭装置など約 20 箇所の試料を探索し、50℃、pH8.3、あるいは 37℃、pH9.6 で培地中のアンモニウムイオンを減少させる *Bacillus* 属の菌を得た。本菌株は 0.5M の塩化アンモニウム含有培地でも生育可能であった。本菌株の 16S rDNA および生理化学的性質の解析から *Bacillus licheniformis* と同定した。*Bacillus licheniformis* は非病原性の細菌であり、環境浄化を目的とした使用に有利であると考えられる。

同定したアンモニア分解菌の GS 法への適用条件を検討し、ほぼ 100%プロトプラスト化する条件を見出した。また、プロトプラスト化した細胞の再生率は約 14%だった。これらの知見を踏まえて薬剤耐性およびアミノ酸要求性をマーカーとして GS 法のモデル実験を行ったところ、細胞融合株が $3 \sim 6 \times 10^{-5}$ の頻度で得られた。これらの結果より、アンモニア分解菌、脱窒菌、アンモニア分解菌と脱窒菌の融合株は GS 法の適用により特異性の拡大が実用化レベルで可能であることが示唆された。

[今後の展開] :

- GS 法については、広く一般の微生物へ適用するために残っている問題点について明らかにできた。今後、細胞融合法の問題を解決するか、全く別の手法によってゲノムシャufflingを行う実験技術の開発が期待される。
- アンモニア分解菌、脱窒菌、アンモニア分解菌と脱窒菌の融合株は GS 法の適用により特異性の拡大が実用化レベルで可能であることが示唆された。今後、これらの知見を活かし高速分子進化技術の拡大・発展が期待される。