

<p>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</p>
<p>サブテーマリーダー：埼玉大学大学院理工学研究科、教授、定家 義人 (○:小テーマ代表者) 研究従事者：(財)埼玉県中小企業振興公社、雇用研究員、山本 まみ、松尾 高稔 東洋大学生命科学部、教授、井上 明、准教授、○伊藤 政博 東洋大学工学部、教授、宇佐美 論</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要： 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 (2)GS法を活用し、環境浄化に有用な微生物を育種した。</p> <p>②研究の独自性・新規性： グラム陰性細菌、<i>Rhodococcus</i>属細菌、また異種微生物間でのGS法による育種例はこれまでにない。よって本方法が確立されれば、新規性が高く、有用性があり、特許性が大きい。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て探索を行った。これらの菌株を利用してGS法により微生物育種を行うことは、新規性が高く非常に有用性があり、特許性が大きい。また、これまでにない応用範囲の技術拡大が出来、新規な環境浄化・環境耐性能の分離および遺伝子資源ライブラリー化が期待できた。</p> <p>③研究の目標(各フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に)：</p> <p>フェーズⅠは、(1)環境浄化・環境耐性微生物における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。(2)NO<sub>x</sub>化合物を分解・浄化する微生物の探索。(3)家畜屠殺場の廃液や、養鶏場・養豚場・ゴミ処理場・ゴミ埋め立て場から排出する悪臭物質を分解・浄化または分解・無臭化する微生物の探索。</p> <p>フェーズⅡは、(1)GS法による進化速度の測定。(2)環境浄化微生物へのGS法の適用による分子育種株の取得</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況(目標と対比して)</p> <p>(1)新規好熱好アルカリ脱窒菌の分離とGS法の適用。フェーズⅠでは、高温、アルカリ環境で熟成が進行する堆肥での脱窒促進に使用可能な、高温アルカリ環境に耐性である脱窒菌の取得を目指して105カ所の試料を検索し、板倉町周辺の畑土から新規好熱好アルカリ脱窒菌AT-1を分離した。16S rDNA解析および生理化学的性質の解析により、AT-1株を <i>Anoxybacillus pushchinoensis</i> と同定した。<i>Anoxybacillus</i>属は温泉や土壌、堆肥からの分離例があるが、脱窒菌としてはAT-1株が初めての報告であった。AT-1株は一般的な細菌や病原菌がほとんど生育しない50℃、pH9.5の高温アルカリ環境で最も良好に生育する。さらにアルカリ環境(pH 9.5)だけでなく中性環境(pH 7.5)、50℃および37℃の培養条件で培地中の硝酸イオンを減少させることが可能であった。50℃、pH9.5の培養条件では2mMの硝酸イオンが24時間後ほぼ消失した。以上の成果を踏まえ、フェーズⅡでは、AT-1株へのGS法を適用するための課題である菌体のプロトプラスト化、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。</p> <p>(2)アンモニア分解菌の分離とGS法の適用。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 <i>Bacillus</i>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 <i>Bacillus licheniformis</i>と同定した。<i>Bacillus licheniformis</i>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3～6 x10<sup>-5</sup>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。</p>

(3) 脱窒菌培養中に発生するガスを採取する器具を考案した。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。

(4) グラム陰性菌 *Pseudomonas putida* 502株にてスフェロプラスト化に成功。グラム陽性菌 *Rhodococcus sp.*株にてプロトプラスト化に成功。*Rhodococcus sp.*株にてプロトプラスト化の効率化を目指し、リゾチーム感受性変異株の取得に成功。現在、*Rhodococcus sp.*株の高効率でのプロトプラスト化を検討中。

主な成果

具体的な成果内容：

- 1 新規な耐アルカリ耐熱性脱窒菌の分離に成功した。(特許出願)
- 2 培養中に発生するガスの採取器の考案およびその改良を行った。(特許出願)

特許件数：2件 論文数：9件 口頭発表件数：31件

研究成果に関する評価

- 1 国内外における水準との対比：

GS法による微生物の育種に関する報告例はまだ少ない。GS法の問題点（細胞融合条件や研究例などの少なさ）を克服することが、今後の研究の発展に非常に重要となる。

- 2 実用化に向けた波及効果：

古典的な変異導入技術を用いた微生物育種は、いわゆる適応歩行進化による育種法であり、時間と手間がかかった。GS法を用いた微生物育種は、いわゆる適応飛躍進化による育種法であり、微生物創製をさらに迅速化する可能性がある。

残された課題と対応方針について

- 1 極限環境微生物の遺伝子資源ライブラリーの増強：これによりオーダーメイド型微生物の創製を飛躍的に発展させることができる。
- 2 有用微生物のGS法による育種の迅速化：実験経験からの知見を増やすことにより有用微生物の創製を短期間のうちに達成することができる。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	
人件費		11,415	11,536	11,095	11,082		45,128	489	11,595	9,675	6,700	6,600		35,059	80,187
設備費		555					555							0	555
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)		2,445	3,479	4,150	4,872		14,946	200	6,000	6,000	6,000	5,000		23,200	38,146
旅費		251	132	316	273		972							0	972
その他		639	546	668	850		2,703	12,169	389	290	389	389		13,626	16,329
小計	0	15,305	15,693	16,229	17,077	0	64,304	12,858	17,984	15,965	13,089	11,989		71,885	136,189

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：バキュームプロッター、卓上式クリーンベンチ

地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。