

助成年度：平成 5 年度

[所属] 広島大学 工学部

[役職] 教授

[氏名] 大竹 久夫 (他計 2 名)

[課題]

富栄養化防止のための強力な窒素およびリン除去細菌の分子育種に関する研究

[内容]

大腸菌の遺伝子組換えにより強力なリン除去細菌の分子育種に成功した。育種の要点は、ポリリン酸の生合成酵素であるポリリン酸キナーゼ遺伝子 (ppk) とリン酸の膜輸送系 (Pst と呼ぶ) の遺伝子 (pst) を大量発現できるようにした点である。分子育種の結果、ppk および pst 遺伝子を増幅した株 (+pst+ppk) が乾燥重量当り 12.3% のリン (リン酸に換算して約 37%) を蓄積した。この値は親株 (control) の約 9 倍に当り、我々の分子育種戦略が大成功であったことを物語っている。

驚いたことに、遺伝子組換え株は細胞内に最大限のリン酸 (乾燥重量当り約 48%) をため込むと細胞外にポリリン酸を放出しながらさらにリン酸を取り込もうとする。これに伴い細胞内のリン含有率は 16% を最大値として 13% 付近まで減少した。その後の詳細な実験結果から、このポリリン酸の放出は細胞の溶解によるものではなく、生きた細胞から漏れ出していると推察された。なお、³¹P-NMR 解析によればリン蓄積細胞の表面にはポリリン酸のプールが存在し、これがやがて細胞外に放出されるものと推察された。培地中に放出されたポリリン酸は陰イオン交換カラムを用い容易に回収することができた。この場合操作は、培養液の遠心上澄みを直接にカラムを通しただけである。このような簡単な操作では、リン酸は陰イオン交換カラムには殆ど吸収されない。リン酸に較べポリリン酸の負電荷量ははるかに大いため陰イオン交換カラムによりリン酸とポリリン酸を見事に分別できることも分かった。現在、より実用的な細菌である *Pseudomonas putida* の分子育種を進めている。既に、大腸菌の ppk 遺伝子を *P. putida* において発現させ、この細胞のリン酸蓄積量が增大することを確かめている。

アンモニア態窒素除去細菌の分子育種には、NH₃ をグルタミンに固定する酵素であるグルタミンシンターゼの構造遺伝子 (glnA) を増幅し、できたグルタミンを原料として細胞内に巨大なタンパク質顆粒であるインクルージョンボディを形成させる戦略を立てた。リン酸代謝と較べると細菌の窒素代謝系はグルタミンの合成だけでもかなり複雑な制御を受けている。本研究では遺伝子組換え法により大腸菌内でグルタミンシンターゼおよびインクルージョンボディ形成のための β -ガラクトシダーゼ遺伝子を大量に発現させた。詳細な解析からこれらの酵素タンパク質は確かに大量生産されていることが分かったが、残念ながらグルタミンシンターゼの活性は細胞内で低く抑えられていた。まだ窒素除去能力が飛躍的に増大した株は得られていない。現在、アンモニア態窒素能動輸送系の分子強化を目的として輸送系をコードする遺伝子の取得を試みている。既に、*Pseudomonas putida* にトランスポゾン変異をかけることにより、メチルアミン資化能が喪失した株が分離できその染色体 DNA 断片がクローニングできた。この変異株は親株に較べて低アンモニア濃度培地での生育が悪いことから、アンモニア態窒素能動輸送系に関与した遺伝子に変異を持つことが期待できる。