

## 助成年度：平成6年度

[所属] 広島大学 工学部

[役職] 教授

[氏名] 大竹 久夫 (他計3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]

本報告書は3章からなり、第1章では、リン酸蓄積細菌の分子育種、第2章では、アンモニア輸送系遺伝子およびアンモニア酸化酵素の取得の試み、そして第3章では、亜リン酸酸化細菌の分子育種について述べている。

まず大腸菌においてその有効性が実施された分子育種戦略を実際の産業廃水の処理に適用可能と思われる土壤細菌の *Pseudomonas putida* 細菌に適用し、そのポリリン酸高蓄積株を分子育種することを試みた。*K. aerogenes* 由来の *ppk* 遺伝子により *P. putida* の PPK を増強したところ、その組換え株のリン含有率は親株 (1.99%) の約2倍の値を示した。しかし、大腸菌のリン酸輸送系を支配する *pst* オペロン遺伝子は *P. putida* において発現しなかった。*P. putida* において発現すると思われる *pst* オペロン遺伝子を *P. aeruginosa* よりクローニングし、そのオペロン構造を明らかにした。*P. aeruginosa* の *pst* オペロンは、大腸菌のそれと異なり *pstS* および *pstC* 遺伝子の前にそれぞれ *pho box* が存在していた。また *pstC* および *pstA* 遺伝子産物も大腸菌のそれとは余り似ていなかった。*P. aeruginosa* の場合 *pst* 遺伝子を増幅することによりリン酸の取り込み速度は増大することが観察できた。そこで、*P. aeruginosa* の *pst* 遺伝子を DNA プローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い *P. putida* の *pst* 遺伝子のクローニングを行った。現在塩基配列を決定中であり、それが終了した後に *P. putida* のリン酸取り込みを強化して目的とするポリリン酸高蓄積株を作成する予定である。

次に、*P. putida* のアンモニア膜輸送チャンネル遺伝子のクローニングを試みた。アンモニア膜輸送チャンネルはメチルアミンも輸送するから、メチルアミンを唯一窒素源とした培地で生育ができなくなった異変株をスクリーニングすれば、そのなかにはアンモニア膜輸送チャンネル遺伝子に異変が生じた異変株も存在すると考えた。トランスポゾン Tn5 を用い1株のメチルアミン資化欠損株が取得された。しかし DNA 塩基配列を決定したところ、この遺伝子はアンモニア膜輸送チャンネル遺伝子の変異株ではなくグルタミン酸シンターゼ遺伝子であった。アンモニア膜輸送チャンネル遺伝子の取得が困難であることが分かったので、アンモニア酸化 (*amo*) およびヒドロキシルアミン酸化酵素 (*hao*) 遺伝子のクローニングを試みた。既往の報告から合成 DNA プライマーを作成し PCR により *Nitrosomonas europaea* から遺伝子を部分的にクローニングすることができた。現在、残りの断片をクローニング中であり、遺伝子が完全に取得した後大腸菌での大量発現を試みる予定である。

最後に、亜リン酸をリン源として生育の良い *Klebsiella aerogenes* ATCC9621 株に C-P リアーゼならびに亜リン酸酸化酵素遺伝子である *phn* 遺伝子群に類似する遺伝子が存在することがわかった。その領域を含む遺伝子断片を単離し、現在遺伝子破壊による機能解析と塩基配列の決定を行なっている。*Klebsiella aerogenes* は余分なリン酸をポリリン酸として蓄積する細菌であるため、取り込んだ亜リン酸をポリリン酸として回収できると期待できる。