

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 溝口 寛

論文の内容の要旨

大腸菌を用いた物質生産には古い歴史があり、モデル生物の一つであることから配列決定技術が向上するといち早くそのゲノム配列が決定された。ゲノム時代が幕を開け、全遺伝情報が明らかになれば格段に自由に微生物を利用することができると考えられたが、成果は期待ほどではなかった。その一つの理由は、いまだに残る機能未知遺伝子に加え、微生物の営みが複雑な遺伝子の相互作用や制御系の上に成り立っているため、この問題を解決しない限り微生物を自由に制御することは困難と思われた。実験的に全ての遺伝子の機能を解析し、さらに様々な因子の相互関係を明らかにしていくことも考えられるが、ゲノムの構成を単純化することで、機能未知遺伝子を減少させ、相互作用や制御系を減らすことで制御しやすい細胞を作製することも一つの方法である。

ゲノムの構成を単純化し物質生産の宿主とするためには、まず染色体を大規模に加工する方法を確立する必要があった。従来、大腸菌は χ 配列という特定の 8 塩基の配列に依存した組換え機構を有するため、任意の位置での組換えが困難であったが、1998 年 Murphy により λ ファージの組換え系を導入することで、両端に 40bp の相同領域があれば任意の場所で組換えを起こすことができる画期的な方法が報告された (λ Red 組換え系)。すぐにこの λ Red 組換え系を利用した染色体の大規模加工法が検討されいくつかの報告がなされた。

本論文では Cre/*loxP* を用いた方法、およびネガティブセレクションマーカーを用いたマーカーレス欠失法について検討した。次に様々な物質生産に利用することを前提に染色体縮小化株のゲノムを設計し、それをもとにマーカーレス欠失法で染色体の加工を行った。以下に主論文の要旨を示した。

(主論文 1)

直鎖 DNA と染色体間で組換えを行うことのできる λ Red 組換え系と Cre/*loxP* を組合せた大腸菌染色体の大領域欠失法を開発した。 λ Red 組換え系をプラスミド上に保持されたものが良く利用されていたが、繰返し組換えを行い染色体を加工することが想定されたため、より安定に λ Red 組換え系が保持される染色体上に λ Red 組換え系を保持している株を宿主として検討を行った。まず、*loxP* サイトを λ Red 組換え系で染色体上の 2 ヶ所に導入したが、染色体組み込み型の λ Red 組換え系においてもプラスミド型と同様に 40 bp の相同領域で効率よく *loxP* 配列が導入されることを確認した。Cre/*loxP* による消化と結合は非常に効率がよく、117 kbp と 165 kbp という非常に大きな領域を 100% の効率で欠失させることができた。更にマイクロアレイで野生株と欠失株のゲノム構造を比較し、117 kbp と 165 kbp の領域が欠失され、ターゲット領域以外の領域には異常がないことを確認した。

(主論文 2)

Cre/*loxP* を用いた染色体加工法は大きな領域を効率よく欠失することができたが、*loxP* 配列が染色体上に残るため繰返し操作を行うためには *loxP* 配列を除去する工程が必要であった。そこで、痕跡を残さずに染色体の任意な領域を削除するためネガティブセレクションマーカーを用いたマーカーレス欠失法の検討を行った。この方法では一つの領域を削除するために λ Red 組換え系による 2 回の操作が必要となる。最初の組換えで欠失対象領域をマーカーカセットで置換し、2 回目の組換えでそのマーカーカセットを削除する。マーカーカセットは薬剤耐性遺伝子とネガティブセレクションマーカー (*Bacillus subtilis sacB*) で構成されているため、カセットが導入された大腸菌は SacB の働きによりシュークロースに感受性を示す。マーカーカセットが挿入された株を形質転換し、シュークロース耐性を示す株を選択することで痕跡を残さずに目的の領域を欠失した株が取得される。この手法を用い染色体上の 2 ヶ所の領域を順次削除し、1 種類のマーカーカセットで繰返し欠失が行えることを確認した。またマーカーカセット除去用の断片に任意の配列を含め挿入も可能であることを確認した。欠失だけではなく挿入も可能であることから染色体加工には有用な手法であると考えられた。マーカーレス欠失法の 2 回の相同組換えで目的の表現型を示すクローンが取得される確立は、それぞれ 24%と 93%であった。1 回目の形質転換の効率が低いこと、組換えに用いる PCR 断片に由来する変異が導入されることが課題として残ったが、十分に大規模な染色体加工が行えると判断した。本論文は 2007 年 Biosci. Biotechnol. Biochem 誌論文賞を受賞した。

(主論文 3)

大腸菌染色体の不要な領域を削除すると、機能未知遺伝子、様々な因子の相互作用や制御系が減少し、より扱い易い細胞が作製されると期待された。染色体の加工にあたっては物質生産に利用できる汎用的な宿主細胞を創成するため、旺盛な生育と基本的な代謝経路を維持させることを考えた。まず、大腸菌のアノテーション情報や比較ゲノムの結果から、M9 最少培地での旺盛な生育に不要と考えられた領域を抽出し、マーカーレス欠失法を用いてそれらの領域を個別に欠失した大腸菌ライブラリーを作製した。次にこれらの欠失株、およびそれら欠失の組合せを M9 最少培地で評価し、旺盛な生育を維持できる欠失を組合せることで 1 Mbp の領域を欠失した MGF-01 株を作製した。MGF-01 株は M9 最少培地において生育の立ち上がりや、対数増殖期の生育は野生株と同等であった。さらに、野生株が定常期に移行した後も MGF-01 株は増殖を続け、最終到達濁度は野生株の 1.5 倍に達した。生育面で良好な性質が見られたことから、この MGF-01 株にスレオニン生産系を導入し物質生産能を評価した。その結果、野生株と比較して 2.4 倍の生産性が確認され、スレオニン生産においても良好な結果を得ることができた。これまで大腸菌でもいくつかの染色体縮小化株が報告されているが、欠失や欠失の組合せを詳細に評価しながら染色体を加工した例はない。今回は物質生産の効率を直接の指標とせず、旺盛な生育と基本的な代謝経路の維持を目標に加工を行ったが、良好な結果を得ることができた。

家畜排泄物は従来、堆肥化、液肥化処理を経て肥効成分に富んだ有機肥料として用いられてきたが、近年の状況からこれまで以上に家畜排泄物の衛生的な処理が望まれている。本研究では、温度が上昇しにくい高水分の堆肥原料中での有害微生物の低減化を促進させ

の方法として、家畜糞と食品副産物等の有機廃棄物との混合堆肥化を検討した。また、通気処理過程における糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長についての知見を得るとともに、大腸菌数の推移に影響を与えると予測される物理化学的パラメータや微生物群集の推移を解析しそれらの関連性について検討を行った。

まず第1章では、高水分含量の状態ながらも衛生的な条件を満たしうる堆肥化プロセスの確立を目的として、牛糞と各種有機廃棄物との混合堆肥化処理について検討を行った。その結果、水分が高くなるほど堆肥の温度上昇は抑制される一方で、ポリペプトンの添加は温度上昇を促進し、その効果は水分の高い堆肥原料において特に顕著となることを明らかとした。次に実際の有機廃棄物と牛糞との混合堆肥化試験を行った。高水分牛糞に対する豆腐粕、米ぬか、油かすおよび生ゴミの混合は、無添加の原料に比べ大幅に温度上昇を促進し、55°Cを超える高温を維持することで、大腸菌数を激減させることを明らかとした。この温度上昇は主として添加物中の易分解性有機物量に依存し、堆肥温度と易分解性有機物量の指標である BOD (Biochemical Oxygen Demand) 値の間には正の相関が認められた。また有機廃棄物を添加した堆肥原料の BOD 値が 166.2 O₂ mg/g-dry matter 以上の時、顕著な温度の上昇と大腸菌数の低減が認められ、家畜糞と有機廃棄物の混合堆肥化処理は有機資源の循環の上でも、また堆肥化プロセスの改善の意味でも有効な手段と考えられた。

第2章では有機廃棄物のうち、顕著な温度上昇効果を示した豆腐粕について、豆腐粕と牛糞の混合物の分解特性と、農業現場で一般的な堆積型堆肥化における豆腐粕混合の温度上昇効果について検証を行った。小型堆肥化リアクターを用い、乾物当たり 0、6 および 11% の豆腐粕を牛糞に混合して堆肥化を行った結果、乾物当たり 11% の豆腐粕の添加は無添加の堆肥と比較して最高温度には差が認められなかったものの、高温域に達するまでに要する時間を短縮し、55°C以上の高温持続時間を有意に延長させた。また豆腐粕の添加により堆肥原料中の易分解性有機物量が大幅に増加する一方で、12 日間の堆肥化期間中にそれらの大部分は分解されることが明らかとなった。この豆腐粕の温度上昇効果はパイロット・スケールの堆積型堆肥化において更に顕著となり、堆積堆肥中のいずれの部位でも無添加区よりも高い最高温度、および約 2 倍の高温(>55°C)持続時間が認められた。豆腐粕添加は最高温度を上昇させるだけでなく、大腸菌の死滅に必要な高温持続時間を堆積物中の広範囲な部位で実現することが明らかとなった。

第3章では堆肥化ステージが異なる堆肥中に接種した大腸菌の再増殖を検討した。堆肥化開始後から 0、7、13、22、41、190 および 360 日目に採取した堆肥に、人為的に大腸菌を接種することでそれぞれの堆肥における大腸菌の増殖リスクを検討した。堆肥を 50% に水分調整し、大腸菌を接種された後に 30°C の条件で 5 日間の培養を行った。その結果ほとんどの堆肥中で大腸菌は増殖し、特に高温期の (7 日)、または高温期が終了した直後の堆肥サンプルにおいても最も高い増殖が認められた。しかしながら堆肥化開始後 13 日以上経過した堆肥サンプルと、190 日以上経過した堆肥サンプルの間には有意な差は認められなかった。豆腐粕混合堆肥の経過日数 13 日目よりも前の堆肥では、同時期の無添加の牛糞堆肥と比較して高い大腸菌の増殖割合が認められた。よって豆腐粕の混合は易分解性有機物の増加により堆肥温度を大幅に上昇させ大腸菌の死滅を促進する一方で、堆肥化過程で分解が進行しなかった場合には、適当な水分や温度条件が与えられることで大腸菌が大幅に増

殖する可能性があることが示された。しかしながら十分な堆肥化期間を経ることでその増殖は無添加の堆肥と同程度になることを明らかとした。

第4章では環境負荷物質として重要な臭気物質および糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長を測定するとともに、処理過程における微生物群集の変遷を非培養的手法で解析した。豚糞尿の酸化還元電位(ORP)は連続通気にも拘わらず1日目に-350mV 近くまで低下したことから、好気性菌群による活発な溶存酸素の消費が起こっていたと考えられた。このORPが低い環境では *Bacilli*, *Clostridia* そして *Bacteroidetes* が優占となっており、特に *Bacillus* spp.は2日目のクローンライブラリーで全クローンの65%を占めていた。このORPが低く、*Bacillus* spp.が優占していた環境下では、臭気物質である低級脂肪酸およびアンモニア濃度が低下するとともに大腸菌数が大幅に低下していた。低級脂肪酸が消失し、糞尿中の可溶性炭素成分の分解が鈍化した4日目前後を境にORP値は-250から-50mVの値を上下しつつ6日目に-7mVまで上昇した。このORP値の変動は可溶性炭素成分の消失に伴う好氣的代謝活性の減退と、飢餓により生じた死菌を新たに基質として分解する際に要した酸素消費によるものと考えられた。糞尿中の有機成分の安定化とORP値の上昇に伴い、微生物群集は *Bacillus* spp.から *Proteobacteria* を優占とする群集へと遷移していった。2つの未培養の菌種を含む *Bacillus* 優占の群集は、豚糞尿の主要な臭気成分である低級脂肪酸の分解、アンモニアの有機化を進行させるとともに大腸菌数を大幅に低減させ、糞尿の有機物を分解することにより安定した有機肥料へと変換させていた。

本研究では、固形状の家畜排泄物を扱う堆肥化処理、および液状物を扱う液肥化処理の2つの処理形態における糞便汚染指標微生物の動態を把握するとともに、それらの制御について検討を行った。堆肥化過程においては、大腸菌が残存しやすい高水分材料に対する有機廃棄物の添加効果を明らかとするとともに、大腸菌の再増殖が起こりやすい堆肥の類型化を行った。また液肥化過程における物理化学的パラメータと微生物群集の同時解析により、微生物群集と液中環境の相互作用により劇的に変化していく生物的・非生物的要因が大腸菌の低減に影響を及ぼしている可能性を示した。本研究で明らかとなった知見は、より衛生的な家畜排泄物処理の確立に寄与すると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位としてふさわしいものと認めた。