

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580335  
 研究課題名 (和文) 遺伝子組換え技術を用いたブタ糞尿中のリン低減化に関する研究  
 研究課題名 (英文) Study on phosphate reduction in the pig dung using genetic recombination technology

研究代表者  
 久松 伸 (HISAMATSU SHIN)  
 麻布大学・環境保健学部・講師  
 研究者番号：10198997

研究成果の概要：養豚業が盛んな地域では、ブタ糞便由来のリン酸化合物による水域の富栄養化が問題になることが多い。これらは、ブタ飼料中に含まれるリン酸化合物が未利用のまま糞便に排出されることから生じている。そこで本研究課題では、リン酸化合物を加水分解するフィターゼ遺伝子を利用し、遺伝子組換え技術を用いた安全かつ効果的な新しい技術開発を試みた。用いるフィターゼ遺伝子は、胃酸などの酸性条件下でも活性を保持する大腸菌由来の遺伝子を利用することにした。しかしながら、大腸菌からフィターゼ遺伝子を PCR 法によって増幅させることは容易に出来たが、この遺伝子を宿主細胞として再び大腸菌内にクローニングすることは困難であった。従って、このフィターゼ遺伝子をクローニングするには、異なる宿主細胞を用いるなど、相当な工夫が必要であることがわかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	570,000	3,670,000

研究分野：環境科学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：遺伝子組換え、乳酸菌、ブタ、リン

## 1. 研究開始当初の背景

水域の富栄養化の主な原因物質としては、窒素化合物やリン酸化合物が挙げられる。一般的な既存の浄化処理においては、硝化や脱窒を行うことにより窒素化合物を効率的に除去できるが、リン酸化合物の効率な除去を行うのは難しいのが現状である。家庭排水のリン酸化合物は、かつては洗剤由来のものが多かったが、現在ではリン酸を含まない洗剤

の開発により、家庭由来のリン酸化合物量は低減している。一方、畜産業が盛んな地域の排水では動物の糞尿が占める割合も多く、この家畜糞尿中のリン酸化合物用量のコントロールは依然重要な課題のままである。

ところで、ブタの飼料中には、トウモロコシ等の植物性飼料原料に含まれるリンが有機リン化合物（フィチン）の形で存在している。ブタの消化器では、これを加水分解して

無機リン酸を遊離させて利用しているが、関連する酵素（フィターゼ）の活性が弱いいため、その利用率（消化率：20～30%）は極めて低く、養豚においては、リン酸カルシウムなどの利用率の高い無機リンが飼料へ添加されている。そのため、飼料中のフィチンのほとんどが消化されないまま排泄されることになり、莫大なリンが環境中に排出されて水域の富栄養化を引き起こしている。これら富栄養化の対応には、工学的な手法を用いた処理や植物を使った浄化方法も効果的であるが、ブタの糞尿中のフィチン量を減少させることができれば、環境に負荷のかからない養豚業の振興が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

ブタ糞尿からのリン排出量の低減化を推し進めた養豚を実現するために、遺伝子組換え技術を用いて、フィチンの利用率が極めて高いブタ及び飼育法の開発を行うことにした。ところで、フィチンを分解してリン酸を遊離させる酵素であるフィターゼは、哺乳動物では活性及び発現量ともに低い。一方、高いフィターゼ活性をもつ微生物もあり、牛などの草食動物（反芻動物）においては、消化器官に存在する微生物のフィターゼによってフィチンの分解が行われ、効率よくリン酸を得ている。そこで本研究では、ブタでこのフィターゼを有効に利用するために、特にフィターゼ活性の高い大腸菌からフィターゼ遺伝子を得て、（1）このフィターゼ遺伝子を体内の有用微生物として有名な乳酸菌に組み込み、この乳酸菌をブタに取り込ませて利用する方法、（2）フィターゼ遺伝子を導入した遺伝子組換えブタの作出を行う方法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

（1）大腸菌由来フィターゼ遺伝子の単離  
健康なブタの糞便を採取し、滅菌水に懸濁後、デソキシコレート寒天培地に塗抹後、得られたピンク色のコロニーを釣菌し、大腸菌を分取した。得られた大腸菌をコロニーダイレクト PCR 法によってフィターゼ遺伝子の増幅を行った。用いたプライマーは、NCBI の GenBank で公開されている大腸菌フィターゼ遺伝子の配列を基にし、開始コドンの ATG が制限酵素の *Bsp* HI の認識部位になるようコーディング領域上流にリンカーを付けアニール温度が 60℃となるように設計した配列をフォワードプライマーとし、終止コドン下流に制限酵素 *Nco* I の認識配列をリンカーとして付加しアニール温度が 60℃となるように設計した物を用いた。PCR 産物は、Qiagen 社のキットを用いて精製した後、吸光度を測定して 0.1 ug/ul の濃度に調整し、使用するまで-20℃にて保存した。

## （2）大腸菌由来フィターゼ遺伝子のクローニング

PCR 法を用いて得られた DNA 断片は、0.7%アガロース電気泳動を行うことで、目的の遺伝子であるフィターゼ遺伝子の予想される塩基長を確認した後、*Bsp* HI 及び *Nco* I を用いて消化した（フィターゼ遺伝子の確認には、更に複数の制限酵素でこの PCR 産物を消化することによって得られる DNA 断片のサイズを調べることも行った）。フィターゼ遺伝子の開始コドン及び終止コドンを含む完全長のフィターゼ遺伝子と思われるこの DNA 断片は、フェノール処理、エーテル処理、エタノール沈澱を行い、滅菌水に溶解して 0.1 ug/ul とした。この DNA 断片は、大腸菌及び乳酸菌のシャトルベクターである pKT の *Nco* I サイトに挿入するために、pKT を *Nco* I で消化後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、*Nco* I の粘着末端を脱リン酸化した。この *Nco* I で消化した pKT とフィターゼ遺伝子を含む DNA 断片を DNA リガーゼで連結し、形質転換用大腸菌 DH10B に導入してクローニングを行った。

## （3）フィチンの分解を調べるためのマウス糞便の採取と保存

フィターゼ遺伝子を導入した乳酸菌がフィターゼ活性を示すかを検証するために、マウスの糞便を採取した。マウスの糞便は、飼育環境が厳密に管理されている施設内の週齢の等しいマウスから得た。糞便はマウスが飼育されているケージ内全ての糞便を採取し直ちに、プラスチック製の容器に入れた後、-20℃にて使用するまで保存を行った。保存しておいた糞便は、室温に戻した後、一定量の滅菌水に懸濁させ、遠心分離を行って得られる上清をリン酸定量用の試料とした。

## 4. 研究成果

健康なブタ糞便から単離した大腸菌を用いてフィターゼ遺伝子の獲得を行った。コロニーダイレクト PCR 法を用いてフィターゼ遺伝子の増幅を試みたところ、完全長のフィターゼ遺伝子と等しい約 1,300 bp の PCR 産物が得られた。この PCR 産物をいくつかの制限酵素で消化し、得られる DNA 断片のサイズを調べたところ、GenBank で公開されている配列と同様のサイズの断片が得られたことから、この PCR 産物はフィターゼ遺伝子であることが推測された。

このフィターゼ遺伝子が大腸菌及び乳酸菌のシャトルベクター pKT にクローニングするためにフィターゼ遺伝子は *Bsp* HI 及び *Nco* I で消化し、*Nco* I で消化した pKT に連結した。pKT の *Nco* I サイトの上流には大腸菌及び乳酸菌内で機能するプロモータが存在す

るため、このサイト内に導入された遺伝子は、両細菌で発現させることが可能になる。まず、フィターゼ遺伝子を pKT に導入したプラスミドを形質転換用大腸菌 DH10B にヒートショック法を用いて、形質転換を試みた。得られたいくつかの形質転換体をランダムにピックアップし、それらを培養後プラスミドを精製してフィターゼ遺伝子がクローニングされているかを確認した。確認は、いくつかの制限酵素を用いて消化し得られる DNA 断片のサイズを調べることで行った。その結果、ピックアップした全てのコロニーが持つプラスミドは、GenBank で公開されている配列で消化が可能な制限酵素で処理すると、消化できた酵素と出来ない酵素があった。同一の種で、同一の遺伝子の塩基配列は若干異なっている場合もあるため、今回 PCR で増幅された遺伝子は公開されている配列とは異なるフィターゼ遺伝子であるのではないかと予想したが、制限酵素で消化して得られる DNA 断片が予想されるサイズと異なったものも散見されることから、今回クローニングした遺伝子は、フィターゼ遺伝子ではない可能性も示唆された。まれではあるが、PCR 産物をクローニングする際には、目的の遺伝子がクローニングされないこともあるため、制限酵素処理によって理論的な DNA 断片が得られるプラスミドを獲得するために、何度も同様の方法で PCR を行ってクローニングを試みたが、公開されているフィターゼ遺伝子の配列と確認できるプラスミドは得られなかった。

今回用いた大腸菌はブタ糞便由来の大腸菌であり、この大腸菌のフィターゼ遺伝子の塩基配列は当然決定されていないことから、公開されているフィターゼ遺伝子の塩基配列とは完全一致するとは限らない。フィターゼ遺伝子の確認に用いた制限酵素は、公開されているフィターゼ遺伝子の塩基配列情報を基に消化が可能かどうかを調べているため、同定がしづらい可能性も考えられた。そこで、ゲノム解析が行われ、形質転換用の宿主細胞としても用いられている DH10B のフィターゼ遺伝子であればクローニングが容易になるのではないかと考え、DH10B からのクローニングを試みた。クローニングの方法は、ブタ糞便由来の大腸菌から行った時と同様の方法で PCR を行い、形質転換を行う宿主細胞も DH10B を用いた。その結果、薬剤耐性の形質転換体は得られるものの、完全長のフィターゼ遺伝子がクローニングされたクローンは得られなかった。これらの一連の実験を何度も繰り返して行ったが、PCR 産物については予想される塩基長の PCR 産物が得られているものの、この DNA を発現ベクター内にクローニングした後は塩基配列が異なってしまうように思われた。

そこで、クローニングされた DNA 断片はど

のような配列なのかを調べるために、塩基配列の確認を行った。

塩基配列の確認は、クローニングに用いたシヤトルベクターの Nco I サイトの上流及び下流からそれぞれ複数の部位でプライマーを合成して行った。その結果、クローニングされていた遺伝子は、完全長のフィターゼ遺伝子ではなく、部分的なフィターゼ遺伝子の断片が繰り返し挿入されていた部分などで構成されていることがわかった。

大腸菌からフィターゼ遺伝子を獲得するために行った PCR では、得られる DNA 断片は制限酵素で消化される断片のサイズが理論的な大きさであることから、PCR で得られた DNA 断片は、完全長のフィターゼ遺伝子を含んでいると思われたが、この DNA をベクターに連結すると、宿主として用いる大腸菌内で別の配列に変異を起し、一部のフィターゼ遺伝子の配列は存在するものの、フィターゼ遺伝子としての機能をもたない配列になってしまったと推測された。

遺伝子のクローニングを行う際には、このようにクローニングしづらい遺伝子も経験的に存在する。このような場合は、形質転換した後の宿主細胞の培養温度を 37°C から 25°C 程度に下げ、穏やかな条件で培養することでクローニングできることがあるため、この 25°C による培養も行った。しかしながら、得られるプラスミドは全て完全長のフィターゼ遺伝子を持っていなかった。

更に、近年新しいクローニング手法であるインビトロジェン社の Gateway システムによるクローニングを行うために、PCR に用いるプライマーに Gateway システムに必要な配列を付加し、また、クローニングに用いるベクターも大腸菌専用の Gateway システムクローニングベクターを用いて実験を行った。しかしながら、これまで行って来た実験と同様に、完全長のフィターゼ遺伝子を持つ DNA 断片をクローニングすることはできなかった。

今回の一連の実験では、フィターゼ遺伝子のクローニングが研究の主体であると共に出発点でもあるため、本研究課題の実施期間中、上述したように様々な方法で精力的にフィターゼ遺伝子の獲得を試みたが、プラスミドにクローニングすることは出来なかった。

フィターゼは、大腸菌内に於いてリン酸の貯蔵物質であるフィチン（イノシトール 6 リン酸）を加水分解してリン酸を遊離させる酵素であり、大腸菌にとってリン酸の獲得のために重要な役割を担っている酵素であると考えられる。このフィターゼの遺伝子をプラスミドに連結して遺伝子組換え用の大腸菌に導入すると、このプラスミドは大腸菌内で複数コピーが複製され、細胞内でフィターゼ遺伝子の過剰発現が起こってしまい、その結果、このフィターゼ遺伝子が過剰発現してい

る大腸菌は正常に増殖できない可能性がある。今回クローニングに用いた pKT は、pBR322 の複製開始点を持っていることから低コピー型のプラスミドであるため、細胞当たり 50 コピー程度のフィターゼ遺伝子が大腸菌内に存在することになる。クローニングで一般的に用いられる高コピー型のプラスミドに比べれば、その細胞当たりのコピー数は 1/10 程度であるが、今回の実験結果からゲノムに存在するコピー数を越えてこの遺伝子が細胞内に存在すると、正常な代謝が行えないのではないかと推測された。クローニングを行っている研究者から、プロモータを持たないベクターに DNA 断片をクローニングしようと試みた時に、プロモータを持たないことから導入した DNA 断片は翻訳されないにもかかわらず、その配列そのものを宿主細胞が嫌う場合もあるとの私信も得た。

平成 20 年度でこの研究課題の研究機関は終了となったが、この課題は、遺伝子組換え技術の新しい環境分野への応用でもあり、また、新しい遺伝子発現方法（今回実施はできなかった）の開発につながる可能性もある。更に、今回の期間内で作成したいくつかの重要なプライマーも保存されており、今回実施できなかった項目についても実施できる準備は整っていることから、今後も本研究を継続していく価値は高いと考えられる。

今回の研究期間内で困難であったクローニングも、宿主細胞を乳酸菌としてみるなど、新たな戦略と研究協力者を得ることでその活路を見いだしていきたいと考えている。大腸菌を経ずに乳酸菌にクローニングする計画は、乳酸菌のゲノム中にはフィターゼ遺伝子がないことから、大腸菌で起こっていた不具合が解消できる可能性が高い。また、既にフィターゼ活性を測定できるよう、厳密に飼育環境を制御したマウスの糞便を得ており、そのリン酸量を定量出来るよう試料の長生とリン酸の定量のための条件設定も行っている。今後は、今回得たクローニングそのものが難しい遺伝子を研究対象として実施してきた研究から得た貴重な知見や研究の戦略を生かし、この研究課題の継続的な取り組みと新たな課題への挑戦を行っていききたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久松 伸 (HISAMATSU SHIN)

麻布大学・環境保健学部・講師

研究者番号：10198997

##### (2) 研究分担者

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI NAOMI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232

##### (3) 連携研究者

なし