助成番号 043379	6 － 2

研 究 成 果 報 告 書

（国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿）

研究テーマ（和文） AB	地下圏に存在する微生物資源並びに遺伝子資源の環境浄化に対する有効利用				
研究テーマ（欧文） AZ	Utilization of microbial and genetic resources that exist in the subsurface biosphere for restoring contaminated environments				
研究代表者	カタカナ CC	姓)オオニシ	名)コウヘイ	研究期間 B	2004 ～ 2006 年
	漢字 CB	大西	浩平	報告年度 YR	2006 年
	ローマ字 CZ	Ohnishi	Kouhei	研究機関名	高知大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	高知大学遺伝子実験施設助教授				

概要 EA （600 字～800 字程度にまとめてください。）

高知県土佐市浦ノ内湾の水深18mの地点から平成16年11月、17年4月、5月、8月、11月の5回にわたり海底土壌を採取した。浦ノ内湾は養殖に伴う富栄養化が進んでおり、海底土壌の酸化還元電位は低く、海底下数cmでも嫌気的である。この海底土壌の垂直方向では1グラムあたり10^6から10^7と細菌数にほとんど変動がなかった。一方季節変動がみられ、夏期に細菌数が減少する傾向が観察された。細胞からbeads beatingによって抽出したメタゲノムDNAをさらにphi29 DNA polymeraseを利用したmultiple displacement amplification (MDA)により増幅することが、高い質と量を持つメタゲノムDNAを得るために非常に効果的であることが示された。すなわち、環境サンプルに対してMDAが有効であることが証明された最初の例である。約2kbの挿入断片を持つメタゲノムライブラリー（ライブラリーサイズ4 X 10^6）を作製し、ランダムに挿入断片の性質を調べたところ、真生細菌と古細菌のそれぞれに相同性を示す新規な酵素遺伝子が見いだされたことから、作製したライブラリーの有効性が示された。今後は、このライブラリーから有用遺伝子の単離を行う。また、degenerate primerを用いたdirect PCRにより、メタゲノムから多種類のdissimilatory sulfite reductase（*dsr*）遺伝子の部分断片の増幅に成功したことから、今後は遺伝子の全長の獲得を目指す。

一方、海洋における嫌気環境の優占種である硫酸還元菌の単離も試みた。乳酸、酢酸、安息香酸、パルミチン酸、ステアリン酸を唯一の電子供与体とした集積培養により、新規な菌も含め種々のグループに属する硫酸還元菌を単離した。硫酸還元菌の中には芳香族化合物を電子供与体として嫌気的に分解する菌がいることが報告されている。安息香酸をモデル化合物として、単離した菌の芳香族化合物の嫌気的分解能の検定を行ったが、今回の研究では顕著の高い活性を持った株は得られなかった。

キーワード FA	海底土壌	メタゲノム	硫酸還元菌	PCR

（以下は記入しないでください。）

助成財団ｺｰﾄﾞ TA						研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC						シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
図書	著者名 HA								
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	
図書	著者名 HA								
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	

欧文概要 EZ

Marine sediments have been recognized as good natural environment to look for useful bacteria. It is true that very limited numbers of bacteria in the marine sediments are culturable in the laboratory condition. The best way to utilize bacterial resources in the marine sediments at this moment is to isolate useful genes from metagenome DNA. We found that metagenome preparation and multiple displacement amplification with phi29 DNA polymerase worked well for metagenome library construction from marine sediment at Uranouchi bay in Kochi. In this study, we tried to screen dissimilatory sulfite reductase (DSR) genes, *dsrAB*, from the metagenome using PCR. *dsrAB* gene fragments were amplified with degenerate primers designed on *dsrA* and *dsrB* genes and cloned using USER Friendly cloning system. Topology of phylogenetic trees based on deduced amino acid sequences of partial DsrA+DsrB and DsrA was same, indicating that no chimeric genes were formed in the PCR process. Among DSR clones, only two clones were clustered in the phylotypes of sulfate-reducing bacteria, and most of clones formed a clade of deeply branching DSR sequences related to environmental clones from marine sediments in Gulf of California. From this result, we concluded that gene fragments could be isolated from marine sediment metagenome.