

## 別紙 HP 公開資料

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－インド 研究交流）

1. 研究課題名：「ニトロ芳香族系殺虫剤汚染環境のバイオレメディエーションとそれらを検出するワイアレスモニタリングシステムのためのポータブル検出器の開発」

2. 研究期間：平成20年4月～平成24年3月

3. 支援額： 総額 15,760,000 円

4. 主な参加研究者名：

### 日本側

	氏名	所属	役職
研究代表者	武尾正弘	兵庫県立大学大学院工学研究科	准教授
研究者	根来誠司	兵庫県立大学大学院工学研究科	教授
研究者	加藤太一郎	兵庫県立大学大学院工学研究科	助教
研究者	内海裕一	兵庫県立大学大学院工学研究科	教授
研究者	柴田直樹	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	准教授
研究者	片山 誠	Innovation CORE SEI, Co.	社長
参加研究者 のべ 7 名			

### インド側

	氏名	所属	役職
研究代表者	Rakesh Kumar Jain	インド国立微生物工学研究所	所長代理兼環境バイオテクノロジー部門・部門長
研究者	Suresh Korpole	インド国立微生物工学研究所	研究員
研究者	Dhan Prakash	インド国立微生物工学研究所	上級技術員
研究者	Archana Chauhan	インド国立微生物工学研究所	研究員
研究者	Manickam Natesan	インド国立工業毒性学研究所	研究員
研究者	Sudhir Gupta	インド国立微生物工学研究所	PhD学生
参加研究者 のべ 6 名			

## 5. 研究・交流の目的

インドでは有機リン酸系殺虫剤が農薬として大量に散布されてきたため、その分解物としてニトロフェノール類が高濃度に土壌に蓄積しています。ニトロフェノール類は強い生物毒性を有するため、安全な方法で早急に土壌から除去する必要がありますが、コストがかかるのであまり進んでおりません。微生物の能力を活用して環境汚染物質を分解する、バイオレメディエーション（生物学的環境浄化技術）と呼ばれる方法が、安価で実施できることから注目されていますが、その研究はまだその途についたばかりです。

そこで、本研究では、インドのニトロフェノール汚染土壌をバイオレメディエーションで浄化するために、インド国立微生物工学研究所（IMTECH）と共同研究を実施いたします。まずその基礎研究として、土壌でニトロフェノールの分解に関わる微生物（分解菌）の能力（分解に関わる遺伝子や酵素、分解経路など）を詳しく調べ、学術的にその能力を解明することを目的にしています。次いで、そのような情報に基づいて、分解菌を実際に土壌に添加してニトロフェノール汚染土壌を効果的に浄化することを目的にしています。また、本研究は、マイクロリアクターと呼ばれる極めて小さな装置に酵素免疫測定法を適用し、現場で簡便に汚染物質を測定できる携帯型検出器の開発も目的にしています。インド側の持つ汚染された環境や分解菌を取り扱う技術、日本側が得意とする遺伝子や酵素を扱う生化学・遺伝子工学技術、微小装置を製造する放射光、電気・電子、光学、情報分野の技術を用いて、相互に補完しながら、幅広い分野の専門家が集まり、研究交流を行うことを目的にしています。

## 6. 研究・交流の成果

### 6-1 研究の成果

本事業では、まず、インドでの主な土壌汚染物質である p-ニトロフェノール（PNP）の微生物分解機構を、日本側は *Rhodococcus* sp. PN1 株、インド側は *Burkholderia* sp. SJ98 及び *R. imtechensis* RKJ300 株と呼ばれる分解菌を使って研究し、それぞれの菌株の PNP 分解経路、分解遺伝子や分解酵素の姿を明らかにすることに成功し、国際的に評価の高い学術雑誌に研究成果を公表することができた。これらのうち、いくつかの論文は共同研究の成果として共著で出版した。PNP の分解に関わる一部の重要酵素については、その結晶構造解析に成功し、分子のレベルで分解機構を議論できるところに到達した。

次に、主にインドにおいて、PNP の汚染土壌を用い、研究室でのポットを用いた浄化実験、小さな土壌区画での露天屋外実験、アッサム地方にある実汚染土壌の浄化実験のいずれでも、PNP 分解菌の導入で短期間に PNP のほぼ完全な浄化に成功した。この際、遺伝子などの情報に基づき、分解菌の消長や他の微生物相に与える影響を評価したが、コーンコブ（トウモロコシ穂軸粉末）を添加剤として導入すると分解菌の生存と PNP 分解が促進されることがわかった。また、PNP 分解菌を土壌に導入しても一定期間経過すると微生物相にほとんど影響を与えないことも明らかとなった。

一方、主に日本側で開発した積層型マイクロリアクター（通常のマイクロリアクターは二次元平面上に展開するが、本マイクロリアクターは三次元に展開し、マルチ多段リアクターとして使える）を用いて、抗原抗体反応を利用した酵素免疫測定法（ELISA）で微量濃度の PNP あるいは環境ホルモン・ノニルフェノールの測定を実施した。この分析系では、放射光により微細加工したマイクロフィルターをマイクロリアクターに設置し、これに測定対象物質に対する抗体を固定化して分析に使用していたが、種々の問題により、新たに抗原を化学結合したマイクロフィルターを開発し、これを分析系に使用した。また、データのバラツキを抑制するために、送液や検出を全自動で行うシステムを完成させ、これを用いてノニルフェノールを測定したところ、市販 ELISA キットの定量下限値の 1/10 以下の濃度領域で検量線の作成に成功し、さらにその変動係数を市販分析装置に匹敵する数値に

押さえることに成功した。これにより、全く新規の分析系の原理検証に成功した。現在、PNP測定用の抗原結合型樹脂の改良を進めており、この自動ELISA分析系に近日、適用する。

## 6-2 人的交流の成果

本事業により、約4年間の事業期間中（初年度、ムンバイでのテロ事件のため、派遣を取りやめた）に、日本側から延べ人数7名の研究者がインド国立微生物学研究所（IMTECH）を訪問・滞在し、研究発表や研究打ち合わせを行った。また、インド側から兵庫県立大学に3名の研究者が訪問・滞在し、共同研究、研究発表及び研究打ち合わせを行った。訪問滞在者数は少なかったが、そのうち、Dr. R. K. Jain（インド側研究代表者）は2ヶ月、もう1名のDr. D. Prakashは1ヶ月滞在し、兵庫県立大学にて共同で実験を実施した。また、大きなシンポジウム等は開催しなかったが、Dr. R. K. Jainとともに山梨大学、理研 JCM、関西大学、大阪大学を訪問し、講演を実施するとともに同分野の研究者との濃密な研究交流を行った。

2011年3月にインド側研究代表者のDr. R. K. Jainが急病により死去するショッキングな出来事が起こったが、その後、インド側研究代表者を引き継いだDr. S. Korpoleとともに研究交流を続け、本事業終了時に新たに2件の共同研究課題を決定するに至った。また、IMTECH側のDr. M. Shanmugamがこのために、2012年度8ヶ月間兵庫県立大学に滞在することが決定し、Dr. D. Prakashが2年間兵庫県立大学に滞在することを計画中である。

## 7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	M.Takeo, M.Murakami, S.Niihara, K.Yamamoto, M.Nishimura, D.Kato, and S.Negoro. Mechanism of 4-nitrophenol oxidation in <i>Rhodococcus</i> sp. strain PN1: Characterization of the two-component 4-nitrophenol hydroxylase and regulation of its expression., <i>J. Bacteriol.</i> , 190,7367-7374 (2008).	
論文	A.Ghosh, M.Khurana, A.Chauhan, M.Takeo, A.K.Chacrabarti, and R.K.Jain. Degradation of 4-nitrophenol, 2-chloro-4-nitrophenol, and 2,4-dinitrophenol by <i>Rhodococcus imtechensis</i> RKJ300., <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 44,1069-1077 (2010).	共著
論文	K.Yamamoto, M.Nishimura, D.Kato, M.Takeo, and S.Negoro. Identification and characterization of another 4-nitrophenol degradation gene cluster, <i>nps</i> , in <i>Rhodococcus</i> sp. strain PN1. <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 111,687-694 (2011).	
論文	J.Pandey, H.J.Heipieper, A.Chauhan, P.K.Arora, D.Prakash, M.Takeo, and R.K.Jain. Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by <i>Burkholderia</i> sp. SJ98. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 92,597-607 (2011).	共著
論文	K.Yamamoto, M.Sonoyama, K.Miyanaga, D.Kato, S.Negoro, R.K.Jain, and M.Takeo. Biodegradability of 3-methyl-4-nitrophenol by 4-nitrophenol-degrading bacteria., <i>Jpn. J. Water Treat. Biol.</i> , 47, 19-27 (2011)	共著