

(17) 遺伝子操作微生物の環境中での生残性
に関する基礎的研究

第二報 富栄養マイクロコスムと貧栄養マイクロコスムにおける外来遺伝子の消長

STUDY ON SURVIVAL POTENTIAL OF GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISMS IN
NATURAL ENVIRONMENT.....2. Prosperity and decay of the foreign gene in
eutrophic and oligotrophic microcosms.

遠藤銀朗*, 及川栄作**

Ginro ENDO, Eisaku OIKAWA

ABSTRACT: Survival behavior of a genetically engineered microorganism (GEM) was investigated by using an eutrophic microcosm and an oligotrophic microcosm. *E. coli* HB101 was transformed with recombinant plasmid pBK9 (pBR322 inserted with kanamycin resistant gene (kan) from plasmid pUC4K at the Eco RI site). The logarithmical decrease of the GEM was observed after introduction of the engineered *E. coli* into the eutrophic microcosm. The decay in the microcosm was expressed as follows: $\log(n) = -0.211(x) + 6.21$ (correlation coefficient= 0.901, n =viable cell number of GEM/ $m\ell$, and x =time in days), when nutrient was not fed to the microcosm after the introduction of the GEM. The same phenomenon was also observed in the oligotrophic microcosm when nutrient was not fed, and the equation of the decay of the GEM was as follows: $\log(n) = -0.272(x) + 5.72$ (correlation coefficient=0.931). In the microcosms in which nutrient broth for the GEM was continuously fed after GEM introduction, long term survival of the GEM was observed, despite eutrophic or oligotrophic. However, the GEM existed in higher viable number in the eutrophic microcosm fed with rich nutrient (about 3×10^5 cell/ $m\ell$) than the oligotrophic microcosm fed with poor nutrient (about 10^3 cell/ $m\ell$). From these results, it was elucidated that nutritional condition for introduced GEM was an important factor for GEM's survival in mixed microbial ecosystems.

KEY WORDS: Genetically engineered microorganisms (GEM), survival potential, microcosm, nutritional condition, and environmental condition.

1. はじめに

DNA組換え体のような外来遺伝子を有する生物を汚染制御技術の中で利用するためには、DNA組換え体の生理的特性が重要であるばかりでなく、それが導入される環境生態系における組換え体の挙動についても十分な情報を得ておく必要がある。環境工学分野において遺伝子工学を活用するための研究は、難分解性

* 東北学院大学工学部土木工学科 Department of Civil Engineering, Tohoku Gakuin University

** 東北大学遺伝生態研究センター Institute of Genetic Ecology, Tohoku University

物質の生物分解に関する研究を中心として進展しつつある。また組換えDNA技術によって改変された微生物を開放環境で利用する場合の効果についての基礎的研究も開始されつつある。一方、開放環境中でDNA組換え体を利用するに当たっては、その技術的效果を把握しておくことと同時に生態系に及ぼす影響と安全性について十分な配慮が必要と言える。

本研究においては、大腸菌（以下 *E. coli* と記す）のプラスミド pUC4K 由来のカナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) を汎用性クローニングベクタープラスミド pBR322 に繋いでアンピシリン、テトラサイクリンおよびカナマイシンの3種の抗生物質に耐性の多剤耐性プラスミド pBK9¹⁾ を作成するとともに、これによって形質転換した *E. coli* HB101 を安定した閉鎖微生物生態系であるマイクロコズムに導入した際の生残性について検討を行なった。環境中でのDNA組換え体の挙動を評価する方法としてのマイクロコズムの利用方法の一例を示したとともに、得られた実験結果よりマイクロコズムの栄養条件と組換え体の生残性の関係について考察した。

2. 実験材料、装置、及び方法

(1) 実験材料

(大腸菌) : *E. coli* HB101 東北大学農学部 神尾好是先生より譲渡していただいた。

(プラスミドおよびDNA) : pUC4K (ファルマシア), pBR322 および λ -DNA (宝酒造)

(制限酵素) : *EcoRI* および *HindIII* (東洋紡)

(その他の制限酵素) : リゾチーム (シグマ), T-4 DNA リガーゼ (宝酒造)

(2) 実験装置

実験に用いたマイクロコズム装置を図-1に示した。このマイクロコズム装置は1ℓの滅菌三角フラスコをシリコ栓によって封じたもので、培養液量を500mlとしマグネチックミキサーによってゆるやかに攪拌して好气的状態を保ったものである。この装置全体を20℃の恒温槽に入れ一定温度と遮光条件を保った。

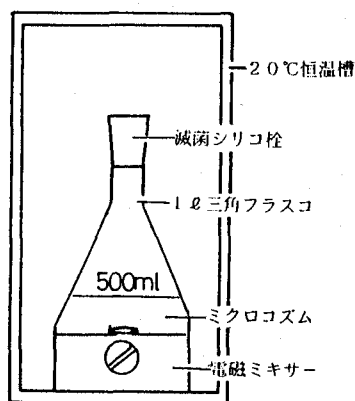


図-1 ミクロコズム実験装置

(3) 実験方法^{1), 2)}

(多剤耐性プラスミドの組換えDNA技術による作成と形質転換)

(イ) *EcoRI* による pUC4K の切断 ;

マイクロ遠心管に ddH₂O, pUC4K 5 μ g, 反応緩衝液, *EcoRI* 28 unit を入れ 37℃ で2時間反応させて pUC4K から *kan* を切り取る。

(ロ) *EcoRI* による pBR322 の切断 ;

同様に ddH₂O, pBR322 3.9 μ g, 反応緩衝液, *EcoRI* 14 unit を入れ 37℃ で2時間反応させて直さDNAに切断する。

(ハ) *EcoRI* 切断プラスミド pBR322 と *kan* とのスプライシング ;

制限酵素をフェノール・クロロホルム処理によって失活させた後、各々の制限酵素切断プラスミドおよび遺伝子をエタノール沈殿によって回収し、 $10\mu\text{l}$ のTE緩衝液に溶解する。それらの液を混合し、DNAリガーゼ反応緩衝液 $160\mu\text{l}$ を添加した後、 $20\mu\text{l}$ のT4DNAリガーゼを加え 16°C で1時間反応させて多剤耐性プラスミドpBK9を作成する。

(二) pBK9による*E. coli* HB101の形質転換：

OD₆₅₀が約0.4になるまで新たに培養した*E. coli* HB101株を常法通りMg, Caで処理してコンピテントセルを得る。この $200\mu\text{l}$ に(ハ)のライゲーションミクスチャー $40\mu\text{l}$ を加えて 0°C で30分放置し、その後2分間 42°C のヒートショックを加えた後にL-ブロスに植え 37°C で2時間振とう培養したうえでアンピシリン、テトラサイクリンおよびカナマイシンが各々 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 入ったL寒天平板に塗抹し一夜培養してコロニーの形成を見る。

(プラスミドpBK9形質転換株のスクリーニング)

上記(二)において得られた形質転換株には、多様なプラスミドが含まれる可能性がある。この中からpBR322の1分子にkan 1分子が結合したプラスミド(これをpBK9と呼ぶ)のみを保有する組換え体を得るために、得られた形質転換株のコロニーすべてを3種の抗生物質の入ったL-ブロスで培養した後、リゾチーム処理、エタノール沈殿などによってプラスミドを回収し、アガロースゲル電気泳動によってプラスミドの大きさをチェックしてpBK9保有組換え体をスクリーニングする。

このスクリーニング時に行なった電気泳動写真の一例を図-2に示した。

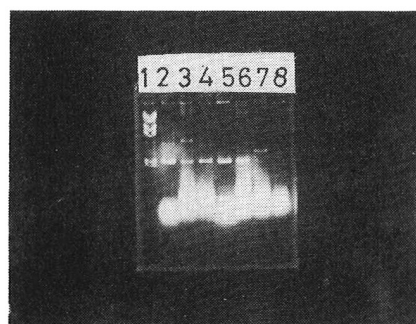


図-2 クローニングされたプラスミドの電気泳動写真
 レーン1： λ DNA/HindIII切断
 (サイズマーカー)
 レーン7：pBK9のみを持つ組換え体からのプラスミド

(マイクロゾムの作成方法)

下水処理場より採取した活性汚泥 500ml を 1l の滅菌三角フラスコ(スターラー攪拌子入)に分注し滅菌シリコ栓で封じる。この三角フラスコを2つ用意し、1つには 40ml のL-ブロスを週3回の頻度で無菌的にフィルアンドドローする。もう1つには $1/100$ に希釈したL-ブロスを同じ 40ml ずつ週3回の頻度で無菌的にフィルアンドドローする。この操作を6ヶ月以上にわたって繰り返し、安定な富栄養マイクロゾム(前者)と貧栄養マイクロゾム(後者)を得る。

(マイクロゾムへの組換え体の導入と、組換え体生残数の測定)

カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリンの3種の抗生物質を各々 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むL-ブロスでOD₆₅₀が0.4になるまで培養した大腸菌HB101のプラスミドpBK9(このプラスミドはKm^r, Am^r, Tm^rをコードする遺伝子を含んでいる)による形質転換の培養液 10ml を各マイクロゾムに移植した。移植した後 1ml をサンプリングし、 9ml の滅菌生理食塩水中に加え、無菌的に超音波処理(40W , 10sec)し、以後10倍希釈法で希釈して上記抗生物質の入った4枚のL-寒天プレートに $200\mu\text{l}$ ずつ塗抹して一夜培養後出現するコロニーを計数した。以下同様に移植後の経過日数に従ってpBK9

保有HB101株の計数を続けたが、この計数の期間中マイクロコズムにL-ブロス（富栄養と貧栄養各々のL-ブロス）を加え続けたものと加えずに計数したものと二つの方法で実験を行なった。

3、実験結果

(1) 栄養基質が供給されないマイクロコズムでの組換え体の生残性

図-3に富栄養マイクロコズムに導入された組換え微生物の生菌数の経日変化を示した。この結果は、組換え体導入後マイクロコズムに培養基質（通常濃度のL-ブロス）を加えずに組換え体の減少過程を追ったものである。得られた結果は、初めに組換え体の数が当初導入された数の約8倍に増殖した後、日数の経過とともに減少する傾向を示した。この減少過程は対数関数式：

$\log n = -0.211x + 6.21$ （相関係数 0.901, x = 経過日数, n = 組換え微生物の生菌数）に回帰することができ、この場合の組換え体の死滅過程は1次反応速度式に従う（比死滅速度 = 0.211/日）ことが知られた。

図-4に貧栄養マイクロコズムに同じ組換え体を導入した後同様に培養基質を加えずに経過を追った場合の組換え体の生菌の経日変化を示した。この際にも組換え体の生菌数は対数関数的に減少し次の式で表わすことができた。

$\log n = -0.272x + 5.72$ （相関係数 0.931）
したがって、この場合の比死滅速度は0.272 /日と富栄養マイクロコズムでの死滅速度よりもやや高くなることが知られた。

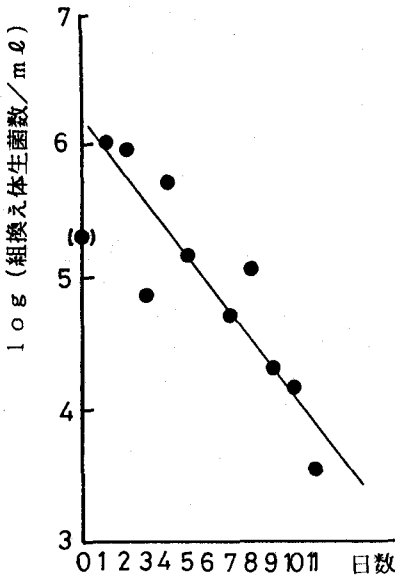


図-3 組換え体生残数の経日変化
（富栄養マイクロコズム、培地無添加）

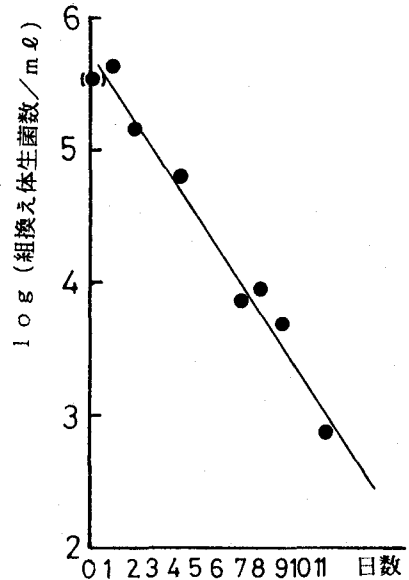


図-4 組換え体生残数の経日変化
（貧栄養マイクロコズム、培地無添加）

(2) 栄養基質が供給されるマイクロコズムでの生残性

マイクロコズムへの組換え体の導入の後、このマイクロコズムに組換え微生物の培養に用いるL-ブロスを供給し続けた場合の組換え体の生残数を調べた結果を図-5および図-6に示した。

富栄養マイクロコズムに組換え体を導入した後500mlのマイクロコズムに対して40mlのL-ブロスを毎日無菌的にフィルアンドローした場合には、組換え微生物の生残数が経過1日目で初期菌数の約1/50まで減少するものの、その後日数の経過とともにむしろ増加し 3×10^5 cell/ml 前後まで回復して以後

安定に生残することが知られた。

貧栄養マイクロコズムにおいても、一旦は急速な組換え体数の減少が見られたものの、初期の導入時の数に比べて大分減少はしているが(約 $1/5000$) 10^3 cell/ml が長期に亘って安定に生残する様子が見られた。

これらの実験結果から、組換え体の持つ特殊な形質発現(この場合は抗生物質耐性)の必要が無い場合でも、組換え微生物の増殖に適する栄養が導入された環境に存在する場合には、多種の土着微生物の混在下においても長期に亘って生存できる可能性が示唆された。

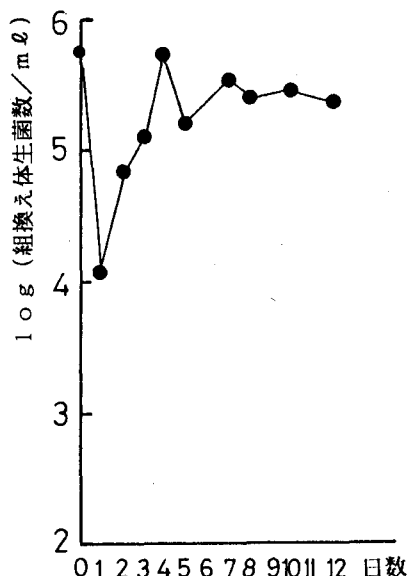


図-5 組換え体生残数の経日変化
(富栄養マイクロコズム, 培地添加)

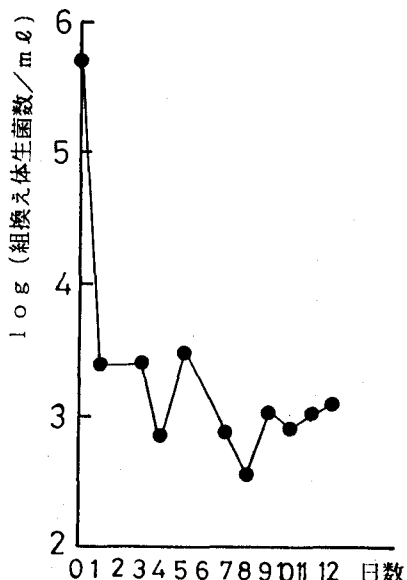


図-6 組換え体生残数の経日変化
(貧栄養マイクロコズム, 培地添加)

4. 考 察

プラスミド pUC4K 由来の kan を大腸菌用クローニングベクタープラスミド pBR322 に繋いで作られたプラスミド pBK9 は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリンの3種の抗生物質に対する耐性遺伝子を有している。また、このプラスミドは *E. coli* HB101 株でこれらの耐性形質を発現することができる。本研究は、この多剤耐性プラスミド pBK9 によって形質転換した *E. coli* HB101 株を、上記3種の抗生物質耐性を同時に示す微生物のまったく存在しないマイクロコズムに導入した後の生残性を調べたものである。マイクロコズムを作成する際に用いた L-ブ罗斯は *E. coli* を培養するための培地であるが、活性汚泥を「種」として約半年に亘って造り上げた富栄養マイクロコズムおよび貧栄養マイクロコズムとも顕微鏡観察的には多様な微生物の混在する混合培養系であった。したがって、これらのマイクロコズムは L-ブ罗斯を一次基質として馴養された安定した多種微生物の微小生態系といえることができる。

このようなマイクロコズムと組換え体 *E. coli* を用いた実験から得られた結果は、組換え DNA および形質転換によって付与された遺伝子の形質発現の必要が無い場合(すなわち付与された形質に対応する選択圧が存在しない場合)においても組換え体が導入された環境にその組換え体の増殖基質が存在する場合には、他の先住微生物の存在下においても長期に亘って生残できる可能性を示した。また、導入された組換え体の生残および死滅の経過状況は栄養基質の共存状態によっても異なっており、一般に栄養レベルが高いほど組換え体の生残性も高まることが知られた。

5. おわりに

本研究を通して、微生物生態系における特定微生物の生存状況を追跡するうえで遺伝子マーカーが役立つことを明らかにできたとともに、環境生態系における遺伝子組換え体の挙動を調べるための模擬実験としてマイクロズムを用いる方法の一例を示すことができたと考える。DNA組換え微生物を開放環境中に意図的に放出して環境浄化に利用しようとする場合には、ここに示したように意図的に放出される組換え微生物がその環境中で増殖可能であるか否かといった基本的現象の把握がまず必要とされる。組換え微生物が人間の健康にとって安全なものであるとともに生態系に大きな変化をもたらすことが無い場合には、この微生物がある程度生残しあるいは増殖することによって開放系導入の所期の目的を達成することが必要とされる場合が考えられる。また逆に、増殖や拡散を極力防ぐことが必要とされる組換え体も存在すると考えられ、その意味で組換え体の生存能力を事前に把握しておくことが必要とされる。本研究において得られた結果は、組換え体の生残能力が組換え体の特性だけでなく栄養条件のような受け入れる環境の側の状態によっても左右されることを示唆していると考えられることができる。

参考文献

- 1) 渡辺 格, 他: 組換えDNA実験技術講習会テキスト, 北里大学衛生学部, 昭和61年
- 2) 日本細菌学会教育委員会編: 細菌学技術叢書4, Rプラスミドの分子遺伝学的実験法, 菜根出版, 昭和58年