

プラスミド DNA の細菌間水平伝達に及ぼす藻類代謝産物の影響

千葉工業大学 正員 村上和仁

1. はじめに

バイオテクノロジー技術の発展に伴い、光るメダカのような観賞目的や組換えダイズ・組換えトウモロコシといった農作物をはじめとして、非閉鎖系における利用を目的とした遺伝子操作生物 (Genetically Modified Organisms ; GMO) が創成され、その有効利用が期待されている。一方、このような GMO による生物多様性への悪影響が懸念されるようになってきており、これを受けて 2000 年 1 月の生物多様性条約特別締結国会合再開会合において「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」が採択され、わが国においても「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法) が 2003 年 11 月に閣議決定され、2004 年 2 月に発効されている。

現在、わが国では GMO の非閉鎖系での利用はなされていないが、バイオレメディエーションなど環境修復の分野で有用な GMO が開発されたり、海外から輸入されるなどして、利用されていく可能性が高いと考えられる。しかしながら、非閉鎖系に放出された GMO が遺伝情報の垂直・水平伝達を含めてどのような挙動を示し、既存の生態系の生物多様性にどのような影響を与えるかについては十分な検討がなされていない。本研究では、遺伝子操作の際に広く利用される環状 DNA であるプラスミドに着目して、植物プランクトンの代謝産物がプラスミド DNA の細菌間水平伝達に如何なる影響を及ぼすかについて、実験的検討を行った。

2. 方法

2.1 供試細菌

プラスミド DNA 受容菌として、大腸菌 *Escherichia coli* HB101、*E. coli* C600、*E. coli* S17-1、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1、枯草菌 *Bacillus cereus* MC の 5 種を、プラスミド DNA 供与菌として、*E. coli* HB101/pBR325、*E. coli* C600/RP4、*E. coli* S17-1/pSUP104 の 3 種を用いた。ここで、プラスミド pBR325 (C^{mr}、T^{cr}、A^{pr}) は非伝達性、RP4 (A^{pr}、T^{cr}、K^{mr}) は伝達性、pSUP104 (C^{mr}、T^{cr}) は可動化伝達性のプラスミドである。

2.2 供試植物プランクトン

代謝産物を供与する植物プランクトンとして、藍藻類 *Microcystis aeruginosa*、珪藻類 *Melosira varians*、緑藻類 *Scenedesmus quadricauda* を用いた。これらの植物プランクトンは、富栄養化湖沼として知られる手賀沼 (千葉県我孫子市) から採取し、ピペット洗浄法にて単離・無菌化して用いた。

2.3 培地および培養法

細菌の前培養は、必要に応じて抗生物質を所定量添加した TP (Taub + polypepton) 培地を 500ml 容三角フラスコに 200ml 注入し、細菌を平板培地上のコロニーから白金耳で植菌した後、暗所、30℃、振とう条件下で 12 時間おこない、対数増殖期にある細菌を実験に供試した。その後、遠心集菌 (5,000rpm、6 分間) し、M/750 リン酸緩衝液で洗浄後、20ml のリン酸緩衝液に懸濁し、細菌懸濁液を作成した。

植物プランクトンの前培養は、手賀沼から採水した湖沼水をオートクレーブで滅菌した後、ろ過滅菌したろ液に K₂HPO₄ と NaNO₃ を適量添加して調整した培地に単離株を植種し、3,000lux、25℃、静置条件下で 10 日間おこなった。培養後、培養液をろ過滅菌し、得られたろ液を植物プランクトン代謝産物溶液とした。

2.4 実験条件

プラスミド DNA 供与菌と受容菌の植菌量は等量とし、植物プランクトン代謝産物の濃度を段階的に調整した TP 培地にて競争培養をおこない、経時間的にサンプリングして選択培地法にて生菌数 (CFU) を計測した。培養は、細菌の最大増殖能が得られる条件を考慮して、暗所、30℃、振とう条件下でおこなった。また、対照実験として、代謝産物の代わりに有機物としてポリペプトンを添加した系も作成した。得られた生菌数から、プラスミド DNA 供与菌と受容菌の割合を算出し、植物プランクトン代謝産物濃度がプラスミド DNA の細菌間水平伝達頻度に及ぼす影響を検討した。

キーワード：プラスミド DNA 水平伝達 藻類代謝産物 バイオレメディエーション

〒275-8588 習志野市津田沼 2-17-1 (千葉工業大学生命環境科学科) TEL 047-478-0455 FAX 074-478-0474

3. 結果および考察

3.1 水平伝達に及ぼす植物プランクトン種の影響

(1) 同種細菌間の水平伝達

E.coli HB101 + *E.coli* HB101/pBR325、*E.coli* C600 + *E.coli* C600/RP4、*E.coli* S17-1 + *E.coli* S17-1/pSUP104 の組合せについて、a) *M.aeruginosa*、b) *M.varians*、c) *S.quadricauda* の代謝産物溶液を添加して競争培養した。その結果、同種の細菌間での伝達頻度の促進効果は、*M.aeruginosa* > *M.varians* > *S.quadricauda* の順に高く、植物プランクトン種によって影響が異なることがわかった。

(2) 異種細菌間の水平伝達

E.coli HB101/pBR325 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* HB101/pBR325 + *B.cereus* MC、*E.coli* C600/RP4 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* C600/RP4 + *B.cereus* MC、*E.coli* S17-1/pSUP104 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* S17-1/pSUP104 + *B.cereus* MC の組合せについて、a) *M.aeruginosa*、b) *M.varians*、c) *S.quadricauda* の代謝産物溶液を添加して競争培養した。その結果、伝達頻度の促進効果は、*M.aeruginosa* = *M.varians* > *S.quadricauda* となり、異種の細菌間であっても植物プランクトン種によって影響が異なることがわかった。

3.2 水平伝達に及ぼす代謝産物濃度の影響

(1) 同種細菌間の水平伝達

E.coli HB101 + *E.coli* HB101/pBR325、*E.coli* C600 + *E.coli* C600/RP4、*E.coli* S17-1 + *E.coli* S17-1/pSUP104 の組合せについて、最も高い伝達頻度を示した a) *M.aeruginosa* の代謝産物溶液を段階的に希釈 (×1、×2、×10) した上で添加し、競争培養した。その結果、すなわち、*M.aeruginosa* の代謝産物は同種の細菌間でのプラスミド DNA の水平伝達を促進する作用を示し、富栄養化湖沼における夏季のアオコ発生時には細菌間水平伝達が活発に生じている可能性が示唆された。また、代謝産物溶液の代わりにポリペプトンを添加した系においては、伝達頻度の増加傾向は認められなかった。

(2) 異種細菌間の水平伝達

E.coli HB101/pBR325 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* HB101/pBR325 + *B.cereus* MC、*E.coli* C600/RP4 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* C600/RP4 + *B.cereus* MC、*E.coli* S17-1/pSUP104 + *P.aeruginosa* PAO1、*E.coli* S17-1/pSUP104 + *B.cereus* MC の組合せについて、最も高い伝達頻度を示した a) *M.aeruginosa* の代謝産物溶液を段階的に希釈 (×1、×2、×10) した上で添加し、競争培養した。その結果、代謝産物濃度が高い系において伝達頻度が増加する傾向が認められた。すなわち、*M.aeruginosa* の代謝産物は異種の細菌間であってもプラスミド DNA の水平伝達を促進する作用を示し、富栄養化湖沼における夏季のアオコ発生時には組換え DNA を含有する GMO が宿主を替えながら生残する可能性が示唆された。また、代謝産物溶液の代わりにポリペプトンを添加した系においては、伝達頻度の増加傾向は認められず、代謝産物の量だけでなく質が関与していることが示唆された。

4. まとめ

- 1) 植物プランクトン代謝産物は、同種のみならず異種の細菌間においても、またプラスミドの伝達性・非伝達性にかかわらず、伝達頻度を増加するように作用することが示された。
- 2) 伝達頻度の促進効果は、*M.aeruginosa* > *M.varians* > *S.quadricauda* の順に高く、植物プランクトン種によって影響が異なることがわかった。
- 3) 植物プランクトン代謝産物の量が多くなるほど伝達頻度は高くなるが、ポリペプトンを添加しても伝達頻度は変わらないことから、代謝産物の量だけでなく質が関与していることが示唆された。

参考文献

- 1) 稲森悠平、村上和仁、角田美奈子、佐藤瑠佳、栗原 康：遺伝子組換え細菌と親株細菌の相互作用に関する研究、日本水処理生物学会誌 **29**(1)39-49(1993)。
- 2) Y.Inamori, K.Murakami, R.Sato, N.Tanaka, R.Sudo, Y.Kurihara: Interactions between GEMs and Indigenous Microorganisms in Aquatic Ecosystem, *Wat.Sci.Tech.* **34**(7-8)397-405(1996)。
- 3) 植木昌也、松井一彰、Choi Kwangsoo、川端善一郎：伝達性プラスミド pBHR1 の接合伝播に与える *Microcystis aeruginosa* の影響、第20回日本微生物生態学会講演要旨集 **20** 165。