

非伝達性プラスミド pBR325 の細菌間水平伝達に及ぼす生物間相互作用の影響

千葉工業大学 正員 村上和仁

1. はじめに

現在、わが国では GMO (Genetically Modified Microorganisms) 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まっている。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ベクタープラスミドである非伝達性の pBR325 をモデルとして、自然生態系を構成する重要な因子である生物間相互作用が pBR325 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 供試プラスミド

非伝達性プラスミドである pBR325 を用いた。pBR325 は Cm^r、Tc^r、Ap^r をコードし、EcoRI、BamHI、HindIII、SalI サイトをもつ遺伝子操作では広く用いられる 5.9kb のベクタープラスミドである。

2.2 供試細菌

プラスミド DNA 供与菌として大腸菌 *E.coli* HB101/pBR325 を、プラスミド DNA 受容菌として大腸菌 *Escherichia coli* HB101 (グラム陰性) 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (グラム陰性) 枯草菌 *Bacillus cereus* MC (グラム陽性) の 4 種を用いた。

2.3 供試植物プランクトン

生物間相互作用として植物プランクトンの代謝産物の影響に着目し、代謝産物を供与する植物プランクトンとして、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・無菌化した藍藻類 *Microcystis aeruginosa* を用いた。

2.4 供試動物プランクトン

生物間相互作用として動物プランクトンの捕食作用の影響に着目し、細菌捕食性動物プランクトンとして、手賀沼から採取し、ピペット洗浄法にて単離した原生動物繊毛虫類 *Tetrahymena* sp. を用いた。

2.5 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 TR (Taub's solution + 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て実験に供試した。

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 *M.aeruginosa* 代謝産物溶液とした。

動物プランクトンの前培養は、M/750 リン酸緩衝液に手賀沼から単離した細菌を懸濁した細菌懸濁液にて、暗所、20℃、微攪拌条件下で 10 日間おこなった。培養後、対数増殖期にある *Tetrahymena* sp. をピペットにて採取して供試した。

2.6 実験条件

1) 植物プランクトン代謝産物の影響評価試験：プラスミド DNA 供与菌と受容菌の植菌量は等量とし、*M.aeruginosa* 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 生物間相互作用 バイオレメディエーション

〒275-0016 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 047-478-0474

2) 動物プランクトン捕食作用の影響評価試験：プラスミド DNA 供与菌と受容菌の植菌量は等量とし、*Tetrahymena* sp.の初期個体数を $100 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるよう調整した TP 培地にて捕食圧の存在する条件下で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。

3. 結果および考察

3.1 細菌間水平伝達に及ぼす植物プランクトン代謝産物の影響

E.coli HB101/pBR325 + *E.coli* HB101、*E.coli* HB101/pBR325 + *E.coli* C600、*E.coli* HB101/pBR325 + *Paeruginosa* PAO1、*E.coli* HB101/pBR325 + *B.cereus* MC の組合せについて、*M.aeruginosa* の代謝産物溶液を段階的に希釈 ($\times 0$ 、 $\times 1$ 、 $\times 2$ 、 $\times 10$) した上で添加し、競争培養した。その結果、*M.aeruginosa* の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* の代謝産物は同種・異種にかかわらず非伝達性プラスミド pBR325 の細菌間水平伝達を促進する作用を示した。このことより、植物プランクトンの代謝産物は、組換え DNA を含有する GMO の生残に対して正の影響 (促進効果) を与えるものと考えられ、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。なお、非伝達性プラスミドである pBR325 が細菌間で水平伝達された機構については、宿主細菌の死滅・溶菌に伴うプラスミドの細胞外への放出と受容菌の増殖に伴う細胞内への取り込みが考えられるが、詳細については今後の検討が必要である。

3.2 細菌間水平伝達に及ぼす動物プランクトン捕食作用の影響

E.coli HB101/pBR325 + *E.coli* HB101、*E.coli* HB101/pBR325 + *E.coli* C600、*E.coli* HB101/pBR325 + *Paeruginosa* PAO1、*E.coli* HB101/pBR325 + *B.cereus* MC の組合せについて、*T.pyriformis* の個体数を $100 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるよう調整した上で供試し、競争培養した。その結果、*Tetrahymena* sp.はいずれの系においても良好な増殖を示し、すなわち、いずれの細菌も *Tetrahymena* sp.の好適な食物源となることがわかった。培養液中に生残している細菌の生菌数の割合から pBR325 の伝達頻度を算出したところ、いずれの系でも伝達頻度の著しい増加は認められず、pBR325 の保有の有無にかかわらず、いずれの細菌も捕食作用を受けて減少した。このことより、動物プランクトンの捕食作用は、組換え DNA を含有する GMO の生残に対して負の影響 (抑制効果) を与えるものと考えられた。

自然生態系では、生産者としての植物プランクトンと消費者としての動物プランクトン、さらには分解者としての細菌類が共存して系を構築していることから、GMO の生残は生物間相互作用の複合的な影響により支配されるものと考えられるが、本研究では、植物プランクトンと動物プランクトンではプラスミド DNA の細菌間水平伝達、すなわち GMO の生残に対して、逆向きの影響を与えることが示された。

4. まとめ

1) *M.aeruginosa* の代謝産物は、同種のみならず異種の細菌間においても、非伝達性プラスミドである pBR325 の伝達頻度を増加するように作用し、植物プランクトンの代謝産物は GMO の生残に対して正の効果を与えることが示された。

2) *Tetrahymena* sp.の捕食作用により、pBR325 の保有の有無にかかわらず、いずれの細菌も減少し、動物プランクトンの捕食作用は GMO の生残に対して負の効果を与えることが示された。

3) 自然生態系では、生産者としての植物プランクトンと消費者としての動物プランクトンが共存して系を構築していることから、GMO の生残は生物間相互作用の複合的な影響により支配されるものと考えられた。

参考文献 1) Y.Inamori, K.Murakami, R.Sato, N.Tanaka, R.Sudo, Y.Kurihara : Interactions between GEMs and Indigenous Microorganisms in Aquatic Ecosystem, *Water Science and Technology* **34** (7-8) 397-405 (1996). 2) 植木昌也、松井一彰、Choi Kwangsoon、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 (2004). 3) K.Murakami : Plasmid DNA Transfer between Different Bacterial Strains with Phytoplankton in Eutrophicated Lake, *Proceedings of IWA 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2007)*, 323 (2007).