

培養モデルと数理モデルによる遺伝子組換え細菌の挙動解析

千葉工業大学 正員 ○村上和仁

1. はじめに

近年、バイオレメディエーション技術をはじめとして、環境修復の分野で有用な GMO (Genetically Modified Microorganisms) 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きた。しかしながら、非閉鎖系に放出された GMO が散布後に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、有用細菌の開放系利用における生態系影響評価に関する基礎的知見を得ることを目的として、散布後に有用細菌が遭遇する生物間相互作用として微小動物との捕食被食関係に着目し、細菌種間競争と微小動物の捕食作用の影響について、培養モデルと数理モデルによる解析をおこなった。

2. 方法

2.1 供試微生物

遺伝子組換え細菌のモデルとして遺伝子操作に広く用いられている大腸菌 *Escherichia coli* HB101/pBR325 (グラム陰性菌) を、土着細菌のモデルとして土壌および水環境中に普遍的に存在する *Bacillus cereus* MC (グラム陽性菌) を、また、これらの細菌の捕食者としての微小動物として河川・湖沼などの自然生態系や活性汚泥・生物膜などの人工生態系に一般的に存在するワムシ類 *Philodina erythrophthalma* を供試した。なお、pBR325 は非伝達性であり、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 培養モデル

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'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。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 14 日間おこなった。培養後、対数増殖期にある *P.erythrophthalma* をピペットにて採取して供試した。*E.coli* HB101/pBR325 と *B.cereus* MC の植菌量は等量とし、*P.erythrophthalma* の初期個体数を $10 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 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、暗所、25℃、振とう条件下で競争培養をおこなった。

2.3 数理モデル

数理生態系モデルは、生物間相互作用として Lotka - Volterra 被食 - 捕食型モデル、競争型モデルとして被食者 2 種 - 捕食者 1 種の場合を想定して検討した。細菌、微小動物の挙動を簡略し定式化すると、それぞれ [1]、[2] [3] 式ようになる。

$$\frac{dA_i}{dt} = \mu_{i,j} A_i (1 - A_i + a_{ij} A_j / K_i) - K_d A_i - r G_i A_i Z \quad [1]$$

$$\frac{dA_j}{dt} = \mu_{j,i} A_j (1 - A_j + a_{ji} A_i / K_j) - K_d A_j - r G_j A_j Z \quad [2]$$

$$\frac{dZ}{dt} = \mu_{z,i} Z / K_z + \mu_{z,j} Z / K_z - K_d z \quad [3]$$

ここで、 $\mu_{i,j}$: 比増殖速度 (= $\mu_{\max} \times \Phi_{\text{COD}} \times \Phi_{\text{DO}} \times \Phi_t$)、 $\mu_{\max}$: 最大比増殖速度 [day^{-1}]、 Φ_{COD} : 基質に関する影響関数、 Φ_{DO} : 酸素濃度に関する影響関数、 Φ_t : 水温に関する影響関数、 a_{ij}, a_{ji} : $j(i)$ に対する種間競争係数、 G : 捕食率、 $K_{dA,Z}$: 死滅係数 [day^{-1}]、 $A_{i,j}$: 細菌 i, j の個体数 [ml^{-1}]、 $\mu_{z,i,j}$: 比増殖速度 (= $\mu_{i,j \max} \times \Phi_t G_{YA}$)、 Z : 微小動物の個体数 [$\text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$]、 Y : 収率 [V / V]、 $K_{i,j,Z}$: 環境許容量、である。

増殖に関するパラメータは既往の文献を参考に設定した。また、*P.erythrophthalma* による捕食選択は *E.coli*、*B.cereus* をそれぞれ摂食したときの最大増殖速度 $\mu_{\max}$ の比で表し、捕食選択係数 r を $r_1=1$ 、 $r_2=0.88$ とした。なお、シミュレーション期間は培養実験と整合性をもたせるために 30 日間とした。

キーワード: バイオレメディエーション 有用細菌 生物間相互作用 培養モデル 数理モデル

〒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 047-478-0474

3. 結果および考察

3.1 培養モデルにおける細菌種間競争に及ぼす捕食作用の影響

(1) *E.coli* HB101/pBR325 を食物源とした場合: *Perythrophthalma* は *E.coli* HB101/pBR325 を食物源として良好な増殖を示し、 $\mu_{\max} = 0.35 \text{ day}^{-1}$ 、 $N_{\max} = 2,800 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。すなわち、遺伝子操作で広く用いられている *E.coli* HB101/pBR325 は、野外利用に導入・散布されても微小動物の捕食作用を受けて減少するものと考えられた。

(2) *B.cereus* MC を食物源とした場合: *Perythrophthalma* は *B.cereus* MC を食物源として良好な増殖を示し、 $\mu_{\max} = 0.31 \text{ day}^{-1}$ 、 $N_{\max} = 2,600 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。すなわち、土壌・水環境中に普遍的に存在する *B.cereus* MC は、微小動物の捕食作用を受けて減少し、一定の個体数を維持しているものと考えられた。

(3) *E.coli* HB101/pBR325 と *B.cereus* MC を同時に食物源とした場合: *Perythrophthalma* は *E.coli* HB101/pBR325 と *B.cereus* MC を食物源として同時に与えても良好な増殖を示し、 $\mu_{\max} = 0.32 \text{ day}^{-1}$ 、 $N_{\max} = 2,600 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。すなわち、*E.coli* HB101/pBR325 は野外利用に導入・散布されても土着細菌である *B.cereus* MC と区別なく微小動物の捕食作用を受けて減少するものと考えられた。

3.2 数理モデルによる細菌種間競争に及ぼす捕食作用の影響の解析

(1) 種間競争を考慮しない場合: バクテリア両種の種間競争係数の比 a を 0 としてシミュレーションを行った。このケースでは、*E.coli* と *B.cereus* は同じ挙動を示しており、30 日後には個体数 $40,000 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度で推移している。また、*Perythrophthalma* は 30 日後に $700 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度まで増加しており、さらに増加する傾向にある。

(2) 弱い種間競争を考慮した場合: 細菌両種の種間競争係数の比 a を $a_{12} = 1.125$ 、 $a_{21} = 0.75$ としてシミュレーションを行った。このケースでは、*E.coli* は 5 日目まで個体数が減少し再び増殖する。*B.cereus* とは異なる挙動を示しており、30 日後には *E.coli* は $28,000 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、*B.cereus* は $50,000 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度と個体数に差が生じている。また、*Perythrophthalma* は 30 日後に $100 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度の個体数まで増加しており、さらに増加する傾向にある。

(3) 強い種間競争を考慮した場合: 細菌両種の種間競争係数の比 a を $a_{12} = 1.5$ 、 $a_{21} = 1.0$ としてシミュレーションを行った。このケースでは、*E.coli* は 3 日目には個体数が 0 になり、*B.cereus* では、30 日後の個体数は $62,000 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度と弱い種間競争を想定したケースと比較して、増殖後の個体数変動は小さいものであった。また、*Perythrophthalma* は 30 日後に $100 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度の個体数まで増加しており、弱い種間競争を想定したケースと同じ傾向にある。このことから、細菌間の種間競争係数により微小動物の増殖にも影響が及んでいることがわかる。これは、被食者である細菌が互いに影響することにより食物源供給の不安定化が生じ、*Perythrophthalma* が増殖しにくい環境になったためと考えられる。

4. まとめ

培養モデルと数理モデルの結果より、*E.coli* HB101/pBR325 は開放系に導入されても微小動物 *Perythrophthalma* の好適な食物源となり、捕食作用の影響を受けて減少することが予測された。同時に、細菌種間の競争が *E.coli* の消長に大きく影響を及ぼしており、種間競争がない場合は挙動変化が少なく個体数が安定し、種間競争がある場合は導入細菌と土着細菌が共存できる環境か、土着細菌のみ生存できる環境の 2 つのケースが存在することがわかった。今後、種間競争を想定した培養モデルを構築してさらなる検討をおこなう必要がある。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり、当研究室の卒論生である松尾尚昭氏はじめ卒論生諸氏の熱意ある協力を賜った。ここに記して感謝の意を表す。

参考文献 1) 村上和仁、稲森悠平、林 紀男、須藤隆一: 微小動物の増殖に及ぼす微生物農薬の影響、日本水処理生物学会誌、**29**(1)31 - 38(1993)。 2) 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)。 3) 松尾尚昭、村上和仁: バクテリア種間競争を考慮した被食 - 捕食系数理生態系モデル、第 36 回土木学会関東支部技術研究発表会講演要旨集、第 部門、CD-ROM (2009)。