

[討議・回答]

越川博元
井上直子 共著
大河内由美子
寺島 泰

「脱ハロゲン化酵素遺伝子を導入した大腸菌への固定化法の適用とその効果」への討議・回答

(土木学会論文集, No. 664/VII-17 2000年11月掲載)

▶ 討議者 (Discussion)

遠藤銀朗(東北学院大学)

Ginro ENDO

これまでアメリカを中心にしてなされてきた分子生物学や遺伝子工学を基礎とする環境保全技術の開発^{1),2),3)}は、1990年代後半になって日本においても本格的に開始されるようになってきた。このような環境保全のためのバイオ技術は、今日においては「環境生物学(Environmental Biotechnology)」と呼ばれる工学分野を形成するようになってきている。かつて、環境生物学は生態系を扱う生態工学(Ecological Engineering)とは別のものとして対比して論じられてきたが、むしろ環境生物学と生態工学は融合し包含しあうことによって、人間社会にとってより有用な新しい環境技術として実用できるという状況が生まれてきている。自然界から分離し培養された微生物や遺伝子工学的に育種された微生物を用いて汚染環境を浄化する技術、いわゆるバイオレメディエーション技術等は、生物学と生態工学の融合技術の典型的な例である^{4),5)}。このような状況はこれまではなかったもので、1990年代以降のバイオテクノロジーの急速な進歩がきっかけになってもたらされたものであるといえる。

本論文は、遺伝子工学を用いて作製された遺伝子組み換え微生物を、環境汚染物質である有機塩素化合物を分解除去する技術として応用するための研究の成果をまとめたものである。特に、遺伝子組み換え微生物が組み換えた遺伝子を保持しつつ有機塩素化合物を安定して分解できるようにすることを目的として、この組み換え微生物を包括固定化して適用することを試みたもので、その研究の着眼点および目的は独創性がありかつ新規な研究の成果と新規な発見を含んでいると考えられる。しかし、研究成果の一部にはさらに再検討を必要とする内容を含んでいるとみなされるので、今後の環境バイオテクノロジーの研究をより高度なものとして発展させるために、ここでいくつかの点について著者と討議しておくことは有益と考えられる。

著者の考えを質したい点は以下のとおりである。

①遺伝子組み換え微生物の野外利用に関する基本的考え方：

遺伝子組み換え微生物を浄化を目的として環境中で利用する場合には、従来の「封じ込め利用」の概念は適用しえない。したがって、解放環境に意図的に漏出させて利用すること(開放系利用)を前提としなければ、環境生物学は基本的には成立しないと考えられる。著者らが述べているように、確かに環境中への漏出が少ないことは望ましいことではあるが、例えば組み換え微生物が1細胞でも環境中に漏出しそこで増殖するようなことがあれば、漏出する量が問題となるのではなく漏出すること自体が問題となるといえる。漏出しないことを前提としての組み換え微生物の野外利用は、その基本的考え方において否定されるのではないだろうか。

②固定化微生物技術を環境バイオテクノロジーに適用することの意義：

上記の点を再検討することによって、微生物を固定化して環境バイオテクノロジーに適用することの意味をさらに深く考えてみる必要がある。特に、遺伝子組み換え微生物を固定化微生物として環境生物学技術に利用することの意義を明確にしておく必要があると考えられる。著者は組み換え微生物の環境への漏出の抑制と組み換えプラスミドの保持およびその発現による活性の維持能力を高めることを意義として示しているが、それ以外に、例えば固定化することによって組み換え微生物を環境中または浄化プラント内の土着微生物との競合から保護して、組み換え微生物の生残性と浄化活性の維持を図ること、などの別の意義は考えられないだろうか。

③固定化微生物の残存活性の評価方法：

著者が示した固定化後の微生物の残存活性は、初期値としての絶対活性が極めて低いもの(特にアクリルアミドゲルによって固定化した場合)についての残存

活性であることには問題が残されているといえる。微生物の固定化による活性の極端な低下を防止して固定化後の初期活性を高める方法の確立と、それを高めることが可能になった場合にもその後の残存活性が同様に維持されるかどうかについての検証はどうしても必要なのではなかろうか。

④実験方法についてのマイナーな意見として著者の見解を求めたい事項：

1) 脱ハロゲン化活性が固定化後に大きく低下する(特にアクリルアミドゲルによって固定化した場合)ことを改善する方法として、もしゲル化後も微生物がゲル化剤による毒性作用を受けているのであれば、固定化後の微生物の増殖を可能にする基質等を用いて前培養を行うなどの方法を採用して実験を行ってはどうであったろうか。

2) 寒天ゲルによる微生物の固定化では低温融解アガロースを用いて、微生物を高温に曝すことを避けることが可能である。これによって固定化における微生物の生残性を高めかつ脱ハロゲン化酵素の残存活性を高く維持することが可能と考えられるが、この研究の場合このような方法を採用することによる改善効果はどのようなものと考えられるであろうか。

3) 著者らが用いた組み換え微生物は大腸菌である。この組み換え微生物の脱ハロゲン化酵素活性の温度依存性を *in vivo* で測定しているが、大腸菌の増殖の至適温度である 35°C~37°Cでの活性測定の実験データがあれば、酵素そのものの温度依存性か微生物細胞としての温度依存性かが理解できたのではなかろうか。10°C刻みの測定データからはその検証は困難とは考えられないか。

▶回答者 (Closure)

——越川博元(京都大学)・井上直子(兵庫県)・大河内由美子(国立環境研究所)・寺島 泰(大阪産業大学)
Hiromoto KOSHIKAWA, Naoko INOUE, Yumiko OHKOUCHI and Yutaka TERASHIMA

「脱ハロゲン化酵素遺伝子を導入した大腸菌への固定化法の適用とその効果」に対して討議をいただき、感謝申し上げます。本論文は遺伝子組み換え微生物に対して固定化法を適用し、その活性に対する固定化法の効果を検討したものである。早速ではあるが、頂戴した討議について次のように回答申し上げます。

①遺伝子組み換え微生物の野外利用に関する基本的考え方

遺伝子組み換え微生物の浄化を目的とした利用において、例えば膜分離などの技術を適用してもそれらが環境中に全く漏出しないという前提が成立すると考えるのは困難であり、むしろ漏出するものであるということ

4) 実験に基質として用いた 2-CPA は低分子であることを著者は記述しているが、同時にそれが微生物を固定化するためのゲル内で移動しにくいことも指摘している。しかし、この2つの点は矛盾するのではないだろうか。低分子のものほどゲル中の拡散は容易と考えられるので、この基質または反応生成物のゲル素材への吸着や化学的結合などによって移動が阻害されるということであろうか。この点についての著者の説明は十分ではないと考えられるがいかがであろうか。

以上、遺伝子組み換え微生物を用いて環境バイオテクノロジーの研究を行っている立場から、いくつかの疑問という形で討議を起した。これらに対する著者からの回答を含めて、この討議が読者に有用な工学的情報を提供することになれば幸いと考える。

参考文献

- 1) Omenn, G. S.: *Environmental Biotechnology*, Plenum Press, New York, 1988.
- 2) Glick, B. R. and Pasternak, J. J.: *Molecular Biotechnology*, ASM Press, Washington D. C., 1994
- 3) Moo-Young, M., Anderson, W. A. and Chacrbarty, M. M.: *Environmental Biotechnology; Principles and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996.
- 4) 矢木修身, 岩崎一弘: バイオレメディエーション技術の現状と今後の課題, 環境科学会誌, Vol. 12, No. 4, pp. 413-420, 1999.
- 5) 大竹久夫: 水域富栄養化防止のためのバイオテクノロジー, バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 57, No. 5, pp. 309-312, 1999.

(2001.5.17 受付)

とが前提であると考えられ、これはご指摘のとおりである。したがって遺伝子組み換え微生物の環境浄化を目的とした野外利用についてはその環境影響、遺伝的影響、社会的影響等を詳細に検討する必要があるが、著者らの知る範囲ではかかる研究例をほとんど見えない。

②固定化微生物技術を環境バイオテクノロジーに適用することの意義

遺伝子組み換え微生物はプラスミド DNA ないしは染色体 DNA に人為的な改変が加えられた結果、宿主に新たな形質が与えられているとはいえ、生育・増殖などといった基本的な特性は宿主のそれに依存してい

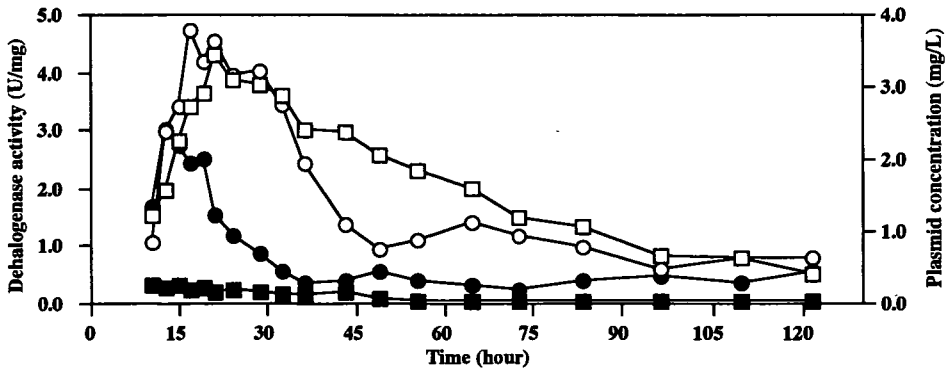


Fig. 1 Time course of dehalogenase activity and plasmid concentration in the presence (□: Activity, ○: Plasmid) or absence (■: Activity, ●: Plasmid) of bromoacetate.

る。したがって遺伝子組み換え微生物に対する固定化技術の適用の意義・利点については従来の混合微生物系に対するそれと同様であると考えられる。したがって著者らが示した、遺伝子組み換え微生物の漏出防止、遺伝子組み換えプラスミドの菌体内保持とその発現による活性の維持のみならず、ご指摘いただいたように土着微生物との競合からの保護も重要な意義である。また、微生物濃度を高く保持するということがも包含固定化法の利点の一つでもあり、著者らが示した意義は一部でしかない。

③固定化微生物の残存活性の評価方法

ご指摘にあるように固定化操作直後の残存活性が低く、本研究の結果をより明確にするためにもより残存活性の高い固定化方法の確立は必要と考える。このため固定化方法の手順の最適化や固定化に供する試薬、それらの組み合わせによる残存活性の高効率化に関する検討が必要であろう。固定化技術については既存の知見も多く、本研究で採用した寒天、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコールだけでは包含固定化担体として充分網羅しているとは言えず、検討の余地があると考えざるを得ない。

固定化後の残存活性の推移についても検討が必要であったが、現在のところ実験が実施できていない。本論文で取り扱った遺伝子組み換え大腸菌は導入されたプラスミド DNA 上に脱ハロゲン化酵素遺伝子を持ち、その遺伝子は特にプロモ酢酸で誘導されて相当する脱ハロゲン化酵素を生産する。また、宿主の大腸菌は通常プロモ酢酸存在下では生育することができない。したがって固定化後の残存活性を維持・増強するには、その活性が必要とされる条件下におくこと、すなわちここではプロモ酢酸を添加することでそのプラスミド DNA の安定化と活性の発現が期待される。

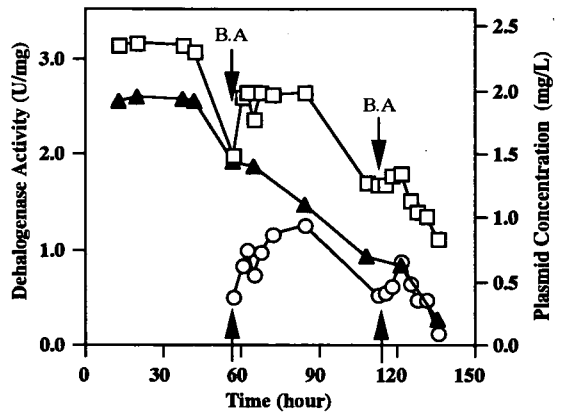


Fig. 2 Time course dehalogenase activity and plasmid concentration and effect of addition of bromoacetate (B.A.).

2mM bromoacetate was added at 53hours and 110hours.

□: Activity (bromoacetate was added)
 ▲: Activity (No bromoacetate was added)
 ○: Plasmid

Fig. 1 は本論文で取り扱った遺伝子組み換え大腸菌 *E. coli* JM 109 (pUCDEXL) を酵母エキス 0.5% を炭素源とした培地 (pH 7) で回分培養し、菌体濃度 1 OD₆₆₀ 当たりのプラスミド濃度および脱ハロゲン化酵素比活性に対するプロモ酢酸 (初期濃度として 2 mM) の影響を検討したものである。なお、*E. coli* JM 109 (pUCDEXL) は固定化されていない。

プロモ酢酸が培地中に存在しない場合、脱ハロゲン化酵素活性は極めて低い値を推移した。またプラスミド DNA は培養開始 13 時間後までは増加するものの、その後減少に転じ 40 時間後にはほとんど消失してしまっていた。これは選択圧がない場合でもプラスミドが存在する状態で菌体が増殖するものの、プラスミド DNA そのものが脱落するだけでなくプラスミドを持

たない菌体も増加し、結果として見かけのプラスミド DNA 量が減少することを意味している。またプラスミド DNA がある程度存在しても、誘導物質であるプロモ酢酸が存在しないため、目的遺伝子産物である脱ハロゲン化酵素は発現しなかった。

一方、プロモ酢酸を培地中に添加した場合、最大でプロモ酢酸非添加時の約 1.5 倍のプラスミド DNA 量が得られ、プラスミド DNA 量の減少が始まる時期も約 10 時間遅れていた。プロモ酢酸存在下においては脱ハロゲン化酵素が発現していない大腸菌は生育することができないから、増加する菌体はプラスミド DNA を保持し、かつ脱ハロゲン化酵素遺伝子が発現していることがわかる。しかし脱ハロゲン化酵素活性が高まるにつれ、プロモ酢酸も分解されて結果として選択圧が失われ、その後の推移は実験初期よりプロモ酢酸が存在しなかった場合と類似していた。

固定化した場合においても同様にその活性が必要とされる条件下に固定化微生物をおくことで残存活性を維持したり、回復させることができるものと予想される。

④実験方法について

1) 固定化操作後の残存脱ハロゲン化活性の低下に対する改善方法として、前培養等によりその活性を回復させることは可能であると考えている。

Fig. 2 は固定化していない *E. coli* JM 109(pUCDEXL) をプロモ酢酸存在下で回分培養を開始し、活性の低下した 53 時間後および 110 時間後の時点でさらにプロモ酢酸 2 mM ずつを添加した場合の脱ハロゲン化酵素活性およびプラスミド DNA 量の変化を図に示したものである。対照としてプロモ酢酸を添加しなかった場合についてもその脱ハロゲン化酵素活性の経時変化を追跡した。本論文では *E. coli* JM 109(pUCDEXL) にとってプロモ酢酸は選択圧かつ脱ハロゲン化酵素の誘導物質であるという位置づけから、プロモ酢酸の追加によりその脱ハロゲン化酵素活性は回復し、培養槽内のプラスミド DNA 濃度も増加に転じていた。110 時間時間の時点でプロモ酢酸を添加した場合にも、小さかったもののその効果がみられた。

この結果を固定化 *E. coli* JM 109(pUCDEXL) について直ちに適用することは不適切であるが、固定化操作により残存活性が低下してもその活性を回復させることは可能であることを示唆するものとする。

2) 固定化担体としての低融点アガロースの適用

低融点アガロースは一般のアガロースや寒天より低い温度で融解するため、電気泳動で分離した DNA 断

片を回収するなどの目的で利用されている。逆に固定化操作においてはより低い温度で固定化できることとなり、微生物への熱的な影響が少ないことが予想されるため残存活性が高くなることが期待される。遺伝子組み換え微生物のみならず、通常の微生物にとっても好ましいことであり、今後の研究では担体として取り上げて参りたい。

低融点アガロースを用いてもその残存活性があまり向上しない場合には、固定化操作における熱による影響が少ないことを示していると考えられ、本論文で示したものは別の解釈が必要であろう。

3) 固定化組み換え微生物の脱ハロゲン化酵素活性の温度依存性

本実験は固定化することで、発現している酵素が持つ活性に対する温度特性が改善されるかどうかを検討することを目的としておこなったものである。また実験に供した固定化組み換え微生物は培養することなく、無機塩による緩衝液中でその酵素活性を測定した。したがって酵素そのものの温度依存性による影響がより大きいものと考えているが、ご指摘にあるように 10°C 刻みではなく少なくとも 25, 35, 45°C における活性も測定することが必要であったと考えている。

4) 2-CPA とそのアクリルアミドゲル内での移動について

反応の基質として使用した 2-クロロプロピオン酸 (2-CPA) は低分子であり、アクリルアミドゲル内での移動が困難であるとの表現はご指摘のとおり矛盾しており、削除して訂正させていただきたい。本論文中に示した Fig. 4 の実験条件では、反応は 100 mM Tris/硫酸緩衝液中でおこなっていること、組み換え微生物にとって炭素源となりうるのは 2-CPA が脱ハロゲン化されて生成した乳酸がほとんどであると考えられること、反応時間が高々 48 時間であることを考慮すると、反応性の違いは基質濃度や微生物量ではなく残存活性に依存しているものと考えられる。

遺伝子組み換え微生物を開放系で利用することは現時点では許されておらず、環境浄化への適用という工学的側面では現実的ではないが、目的とする活性やその遺伝子情報が明確なので、トレーサー微生物として利用することにより浄化機能と微生物との関連などがより容易に理解できる可能性があるものと考えている。このような観点も含め、ご指導やご批判を頂戴できれば幸いであり、そのきっかけとなる本討議に改めて感謝する次第である。

(2001.12.18 受付)