

Ⅱ－８９ 富栄養マイクロコズムと貧栄養マイクロコズムにおける外来遺伝子の消長

東北学院大学 学生員 ○成田 圭毅
同 佐藤 芳朗
同 正 員 遠藤 銀朗

1、はじめに

開放環境中で、DNA組換え体のような外来遺伝子を有する生物を利用するためには、DNA組換え体そのものの生物学的特徴が重要であるばかりでなく、それが導入される環境および組換え体の生態系での挙動について十分な情報を得ておくことが必要と考えられる。また一方では、遺伝子DNAの追跡と定量的検出法の開発は、環境生態系を遺伝子レベルで解析するいわゆる「分子生態学 (Molecular Ecology)」なる新しい環境科学分野を開拓する可能性をもたらす。したがって現在組換え体の環境中での生残性と機能発現上のメカニズムに関する研究、および組換え体の挙動と遺伝子そのもののモニタリング方法について研究が始められつつある。

本研究では、環境中での組換え体の生残性を評価する方法としてマイクロコズムを用いることについて検討した。また得られた実験結果からマイクロコズムの栄養供給条件と導入された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、方法

(1) (実験材料)

組換え体の作成に用いた実験材料は、本発表会で及川らが示すものと同じである。

(2) 実験装置

マイクロコズム実験に用いたマイクロコズム装置を図－1に示した。マイクロコズムは、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たものである。

(3) 実験方法

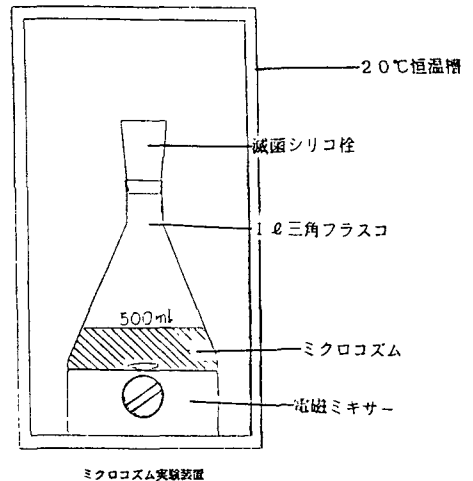
(イ) 組換え体の作成方法は、本発表会で及川らが示すものと同じである。

(ロ) マイクロコズムの作成；

下水処理場より採取した汚泥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のレーブロス（スターラー攪拌子入）を週3回の頻度でフィルアンドドロウする。もう1つには1/100に希釈したレーブロスを同じ40mlずつ週3回の頻度でフィルアンドドロウする。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コズム（前者）と貧栄養マイクロコズム（後者）を得る。

(ハ) 各マイクロコズ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50μg/ml含むレーブロスで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を各マイクロコズムに移植した。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（40



マイクロコズム実験装置

図－1

W, 10 sec) 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 μ 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 H B 101 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の二つの方法で実験を行なった。

3、実験結果

L-ブロス (培地) を加えずに行なったマイクロコズム実験の結果を図-2 に示す。富栄養マイクロコズム、貧栄養マイクロコズムとも日数の経過とともに DNA 組換え微生物に数は減少し、その減少はほぼ対数関数式で表現することができる。各関数式は富栄養マイクロコズムでは $\log n = -0.228x + 6.21$ (x = 経過日数、 n = 組換え微生物の生存数)、貧栄養マイクロコズムでは $\log n = -0.228x + 5.72$ であった。これらの式の傾きはいわゆる一次反応式の反応速度計数 (ここでは比死滅速度) であるため、ほぼ 0.22/日程度の同じ比速度で組換え体は消滅していくものと考えられる。

培地を加えながら行なったマイクロコズム実験の結果を図-3 に示す。この実験では富栄養マイクロコズム、貧栄養マイクロコズムともに初期には DNA 組換え体の急激な減少が見られるものの貧栄養マイクロコズムでは一旦増加し、最終的には約 1×10^3 /mℓ の濃度で組換え体が安定して生残する様子が知られる。一方、富栄養マイクロコズムでは再度増加し、マイクロコズムに組換え体を導入した直後とほぼ同じ 3×10^5 /mℓ ぐらいにまで回復して安定値となった。この結果より、抗生物質などによる選択圧が加えられない場合でも組換え体を導入した環境にその組換え体の基質となる物質が存在する場合には、他の微生物の混在下でも長期にわたって組換え体が生残できることが知られ、環境への意図的放出に当たっては組換え体が導入される側の環境条件についても十分に考慮に入れる必要があることが示唆された。

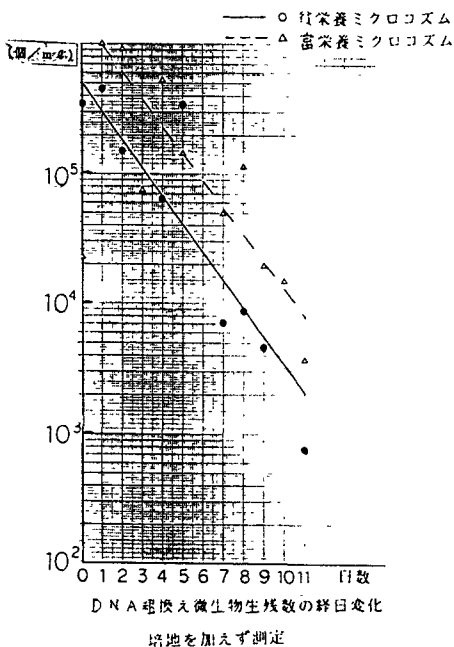


図 - 2

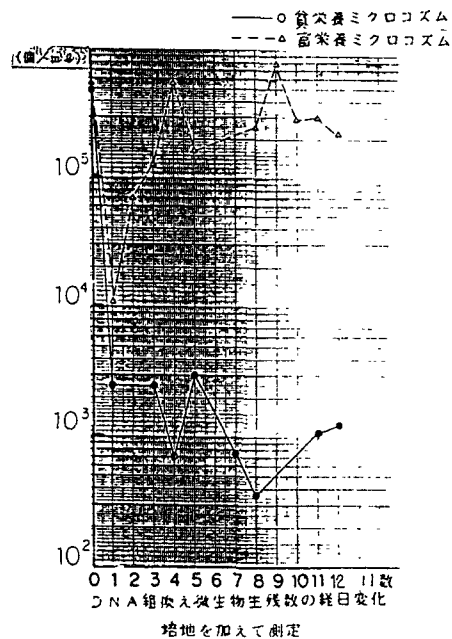


図 - 3'