

II-83 ミクロコズムを用いた遺伝子操作微生物の生残性試験 ——分解系プラスミドおよびRプラスミドによって 形質転換した大腸菌の生残性——

東北学院大学工学部 学生員 ○野村 貢司
同 上 五十嵐 俊一
同 上 正 員 遠藤 銀朗

1. はじめに

遺伝子改変生物を用いた環境浄化技術を開発するにあたっては、まず特殊な能力をもつ生物の探索とその生物の持つ遺伝子の解析が必要とされる。さらに有効な改変の方法と改変生物の有効な活用技術の開発が必要とされる。しかし、これらの技術の開発のみでは十分とは言えず、遺伝子改変生物の生残性や伝播性といった混合生物システムを用いる環境浄化プロセス内での特有の現象を明らかにしておかなければならないと考えられる。

本研究においては、遺伝子工学を環境浄化分野で活用するにあたって必要と考えられるDNA組換え微生物の環境中での挙動を知るための基礎的研究として、種々の条件を与えたミクロコズムにおける分解系プラスミドおよびRプラスミドによって形質転換した大腸菌を用いた生残性のモデル実験を行なった。ミクロコズムの条件としては、通常の微生物によっては分解されない有機物を基質として与えた場合と与えない通常のミクロコズムの場合、及び淡水系及び海水系ミクロコズムを構成させて、それらに対応する組換え体の生残性を調べた。

2. 実験方法

γ -BHCを分解することのできる大腸菌LinA遺伝子を有する分解系プラスミドpIMA2によって形質転換した大腸菌MV1184株は東京大学農芸化学科矢野研究室より譲渡していただいた。このプラスミドはアンピシリン及びテトラサイクリン耐性の遺伝子マーカーを有してある。RプラスミドはクローニングベクタープラスミドpBR322のEcoRI切断点にプラスミドpUC4Kより同じくEcoRIで切り出したカナマイシン耐性遺伝子を接続して作成した、3種の抗生物質に耐性のRプラスミドpBK9を用いた。これを発現型とする大腸菌HB101株に形質転換して¹⁾、4種の抗生物質耐性を遺伝子マーカーとしてミクロコズムにおける生残性を調べた。

淡水系ミクロコズムとして下水処理場より採取した活性汚泥を500mℓをいれた1ℓの三角フラスコを滅菌シリコ栓で封じたもの（電磁スターラーで攪拌することで好氣的条件を保った）に1週間に3回の頻度で1年以上大腸菌兼用のLプロスをフィルアンドドローして培養し安定な微生物生態系を構成させた。淡水系ミクロコズムは通常濃度のLプロスで培養した富栄養ミクロコズムと1/100濃度のLプロスで培養した貧栄養ミクロコズムの2つを作成した。海水系ミクロコズムを作成するにあたっては、塩釜港及び蒲海海岸より採取した海水サンプルと底質サンプル合計500mℓを種として表-1に示した人工海水によって作成したLプロス（通常濃度及び1/100濃度Lプロス）を約5ヶ月間にわたってフィルアンドドロー培養して安定化させた。これらのミクロコズム装置はいずれも図-1に示したものである。分解系プラスミド（pIMA2）によって形質転換した大腸菌の生残性を試験するに当たっては、淡水系プラスミドを用いて、基質となる γ -BHCを供給した場合としない場合に

表-1 人工海水成分

NaCl	2.3g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.0g
Na ₂ SO ₄	0.4g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.15g
KCl	0.05g
d-H ₂ O	100mℓ

ついて比較検討した。Rプラスミド (pBK9) によって形質転換した大腸菌の生残性を試験するに当たっては海水系プラスミドを用いて行ない、昨年度報告した淡水系マイクロコズムでの試験結果¹⁾と比較した。

3. 実験結果

図-2に、分解系プラスミドを有するE. coli MV1184を富栄養・貧栄養マイクロコズム (淡水系) に導入した後の生残性を示した。これらの図から知られるように分解系プラスミドをもつ組換え体は貧栄養条件下に置くより速やかに死滅することが知られる。また、このような分解系プラスミドを有する組換え体は分解対象となる特殊基質 (ここでは γ -BHC) が消費されつくすとマイクロコズム内の土着微生物によって淘汰され減少することが知られた。

富栄養マイクロコズムに導入されたRプラスミド形質転換大腸菌 (E. coli HB101) の生残性試験結果を、富栄養淡水系マイクロコズムで得られた結果とともに図-4に示した。これらの実験結果より、海水系マイクロコズムにおいても組換え体の死滅は一次反応式であることが知られたが、耐塩性に乏しい比死滅速度は海水系マイクロコズムにおけるものが淡水系マイクロコズムにおけるよりも約1.5倍 (貧栄養マイクロコズム) ~3倍 (富栄養マイクロコズム) 高い値であった。また富栄養と貧栄養のマイクロコズムにおける比死滅速度の比較では、富栄養に置けるものが約1.5倍高い値を示した。この結果は淡水系マイクロコズムにおいて得られた結果とは逆であった。

(参考文献)

- 1) 遠藤銀朗・川栄作, 環境システム研究
vol17, p107~112, 1989

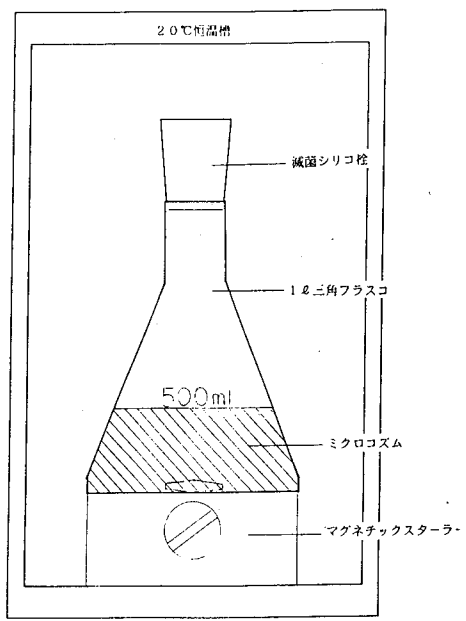


図-1 ミクロコズム実験装置

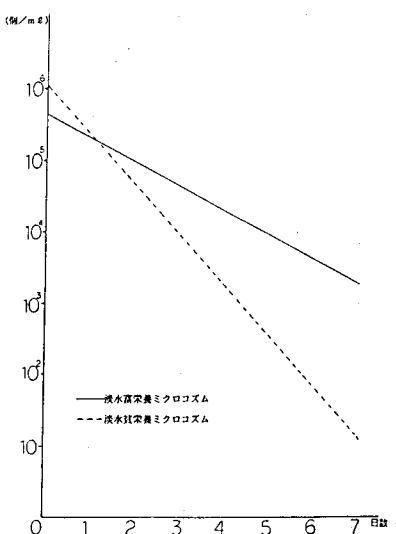


図-2 淡水系マイクロコズムにおける組換え体の経日変化

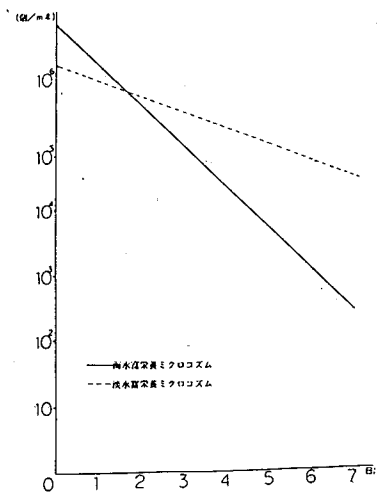


図-3 海水系及び淡水系マイクロコズムにおける組換え体の経日変化