

Ⅱ—96 γ -BHC 分解遺伝子の回収に関する実験研究

東北学院大学 学生員 ○岡島宏二
東北学院大学 正 員 石橋良信
東北学院大学 内山剛吉

1. はじめに

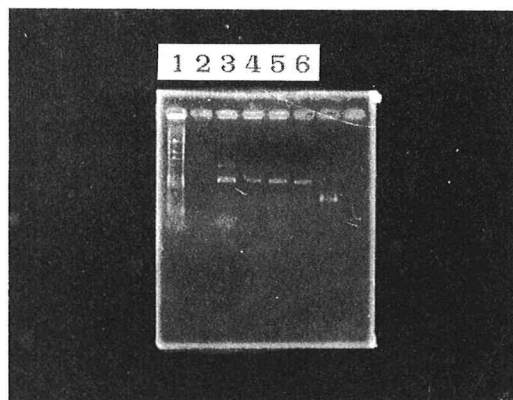
環境の状況診断や浄化を対象にした遺伝子工学の適用例が近年多くみられるようになった。PCBやトリクロロエチレンなどの難分解性物質の分解、除去、また6価クロムの浄化がその例である。本研究室では、簡易な表現であるが、水中、土壤中の微生物から回収した核外遺伝子であるプラスミドを必要に応じてポリメラーゼ・チェーン・レクション（PCR）法で増幅した後、ある発現系を持つDNAプローブとハイブリダイゼーションさせ、特異な化合物や重金属などの分解に係わる微生物の存在を確かめたり、この微生物が多く存在する地域の特定を行おうとしている。本稿では、その手始めとして有機塩素系殺虫剤として知られる γ -BHCの分解菌について、分解菌およびマイクロコズム内の混合菌からのプラスミドの回収法について記する。

2. 菌株および実験方法

γ -BHCの分解能はプラスミド pIMA2の上にコードされている。はじめに大腸菌 HB101に pIMA2をトランスフォーメーションし、この菌株よりプラスミドを回収することを試みた。プラスミドの回収プロトコールは東北大学遺伝子実験施設で改良された方法¹⁾に準拠、さらに改良して行った。

一方、水中、土壤中から微生物を分離し、その菌からプラスミドを抽出する手法は未だ確率されていない。

Atlas らの方法²⁾等があるが、手順が煩雑で再現性をもってプラスミドを回収することは難しい。今回モデル汚泥として活性汚泥から育成したマイクロコズムの菌と HB101に pIMA2を導入した菌株とを比率を変えて混合し、その混合液からの pIMA2の回収を検討した。回収されたプラスミドは電気泳動にかけ、その存在を確認するとともに、 γ -BHCの分解能を有し、プラスミド上にある linA を lin A のプローブを用いてハイブリダイゼーションさせ、さらにその存在を確認した。



1 サイズスタンダード
(λ -DNA, Hind III)
3 4 5 6 プラスミド pIMA 2

3. 実験結果および考察

種々の pIMA2の回収のための検討

図—1 ミクロコズム混合液からの回収プラスミド

を試みたが、上記の回収法がもっとも従来の方法に比べ迅速かつ簡便に回収できることが判明した。HB101純菌からの pIMA2の回収の結果、4,400 Kb付近に再現性よく pIMA2のバンドを見ることができた。

一方、マイクロゾウムから採取した菌群と HB101に pIMA2を導入した菌株との比率をかえて混合した試料からの pIMA2の回収を試みた。図-1に混合比を9:1に設定したときの状況を示す。よって、HB101の存在量がわずかでも本回収法によりプラスミドを抽出することが可能であると思われる。また、PCR法で増幅するなどの手法をとればさらに希薄な場合でも回収できる可能性は高いと考えられる。図-2は、lin Aをプローブ化してハイブリダイゼーションさせた結果を示す。図-1と比較することにより、プラスミド pIMA2の上に γ -BHCの分解能を有するlin Aがコードされているのがわかる。

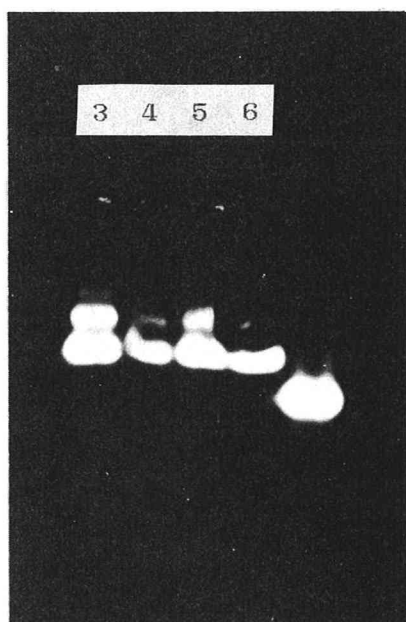


図-2 ハイブリダイゼーションによる lin A の反応
(レーン番号は図-1に対応)

4. おわりに

今回使用した pIMA2を含む大腸菌 HB101、またマイクロゾウム混合菌の中から簡便法でプラスミドを容易に回収できることを確認した。今後の方向性としては、 γ -BHC分解遺伝子であるlin Aの環境中での挙動を追跡すること、また、実際に当たって他の微生物にlin Aが伝達されていく可能性の追求することを試みたい。一方、環境診断の観点から、環境中にいかなるプラスミドが存在し、その種類と量を把握するとともに、プラスミドの生態系での役割りと有害物質等が多く存在する特殊な地域、水域の特定を行うことなどを目標にしている。

最後に本研究は、遠藤銀朗助教授との共同研究であり、また有意義な助言を受けた。記して感謝する。

参考文献

- 1) 東北大学遺伝子実験施設: private communication.
- 2) Atlas et al.: (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. AEM, Vol.54, No.12, 2908-2915.