

Ⅱ－99 環境における遺伝子情報の伝達に関する 基礎的研究

－遺伝子操作微生物の接合によるプラスミドの伝達－

東北学院大学工学部 学正員 〇山川 勝義

同上 関川 司

同上 正 員 遠藤 銀朗

1. はじめに

自然環境においては、生物の親子間の遺伝子情報の伝達だけでなく、生物個体間の遺伝子情報の伝達（水平伝達）がなされており、これが環境生態系の持つ特殊な機能（例えば、汚染物質分解能力）に変化を及ぼすことが考えられる。しかし、このような遺伝子情報の水平伝達が、環境生態系の中でどのようになされているかに関する科学的情報は不足しており、その全容はほとんど知られていない。本研究は、このような遺伝子情報の水平伝達のうち、微生物細胞間の接合によるプラスミドDNAの伝達に注目して、大腸菌同志の二者培養における接合伝達の様式と、模擬水系生態系であり、かつ生物学的水処理プロセスとしても重要な活性汚泥マイクロコスムにおける接合伝達についての基礎的知見を得ることを目的としてなされた。また、遺伝子情報の伝達を遺伝子DNAを追跡することによって調査するため、核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション法の利用について検討を行なった。

2. 研究方法

抗生物質クロラムフェニコール耐性遺伝子をコードする伝達性プラスミドpCRO1を保有する大腸菌（*E. coli* S17-1株）を遺伝子情報供与体とし、抗生物質ストレプトマイシンをコードする非伝達性プラスミドpBH100を保有する大腸菌（*E. coli* C600株）を遺伝子情報受容体として、二者培養による接合伝達の場合と活性汚泥マイクロコスム内での接合伝達の場合について、いずれもプロスメーティング法による実験を行なった。また、これらの対照として、伝達性プラスミドRP4を有する*E. coli* C600株（供与体）とプラスミドを持たない*E. coli* HB101（受容体）の組み合わせでも同様な実験を行ない比較検討した。

二者培養における接合伝達実験においては、伝達を生じさせる際の温度を15℃～30℃に変化させて、温度の影響を調べた。活性汚泥マイクロコスムにおける接合伝達実験においても、同様な温度範囲において、接合伝達実験の経過時間を追跡した。マイクロコスム内に選択のための抗生物質に対する耐性菌が存在しない場合には、接合伝達の結果出現する抗生物質耐性細菌を選択寒天プレート上で計数したが、マイクロコスム内にすでに耐性細菌が存在する場合には選択寒天プレートだけでは検出できないため、プラスミドpCRO1を制限酵素BamH1およびHindⅢによって切断した際に得られる約1500bpのDNA部分を化学発光試薬によって標識したDNAプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法によって接合伝達体を計数した。

3. 実験結果

表-1に各大腸菌の組み合わせによる接合伝達頻度を示した。この結果より、同じ大腸菌の間でも接合伝達による遺伝情報の伝達の様式は大きく異なることが知られた。図-1に接合伝達が行なわれた菌の温度による増殖数の違いについて示した。受容株に、*E. coli* C600 (pBH100)、供与株には、*E. coli* S17-1 (pCR01)を使用した。ここでは、菌株が増殖しやすい37℃付近よりも低い25℃での伝達が最も高頻度でなされた。図-2に上記したものと同じ菌株の組み合わせによる、初期における接合伝達が行なわれた菌数の経時変化を示した。伝達が行なわれた菌の増殖がないものと仮定すると、最小二乗法により次式 $y = 1.03 \times 10^7 x + 10^{6.19}$ が求まり、その伝達速度は約 1×10^7 Cell/hrであった。図-3に20℃のマイクロズム内において接合伝達が行なわれた菌数の経日変化を示した。菌株の組み合わせは上記のものと同じ。この場合、二者培養でのメーティングとは異なり20℃での伝達が高頻度に行なわれた。図-4に15℃のマイクロズム内で接合伝達が行なわれた菌数の経日変化をコロニーハイブリダイゼーション法によって追跡したものを示した。このように、当方法により特定の微生物の検出が高い感度で可能であり同法が発現形質によって微生物を選択検出できない場合の有効な検出手段になると考えられる。

	使用した菌 (<i>E. coli</i>) とプラスミド	伝達率
供与菌	C600/RP4	4×10^7
受容菌	HB101	
供与菌	S17-1/pCR01	≈ 1
受容菌	C600/RP4	

表-1 実験に使用した菌の組み合わせと伝達率

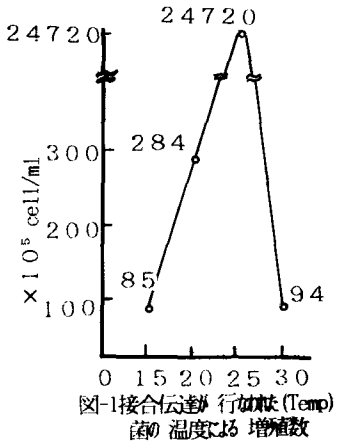


図-1 接合伝達が行なわれた菌の温度による増殖数

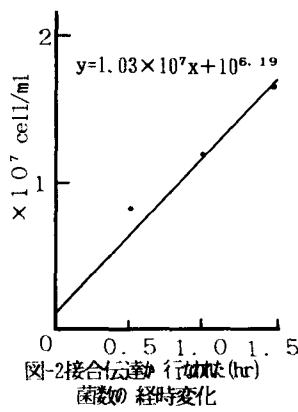


図-2 接合伝達が行なわれた菌数の経時変化

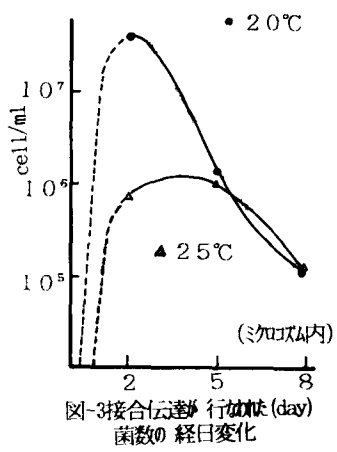


図-3 接合伝達が行なわれた菌数の経日変化 (20℃, 25℃)

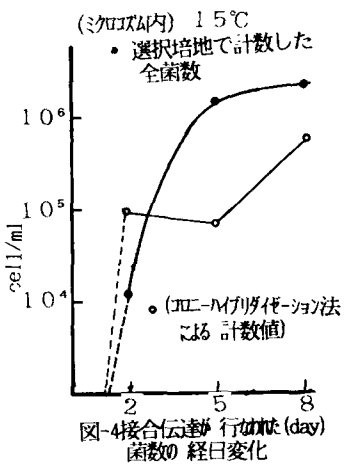


図-4 接合伝達が行なわれた菌数の経日変化 (15℃)