

II-132

各種水環境における遺伝子操作微生物の
挙動とモニタリング手法に関する研究

東北学院大学工学部

学生員 ○我妻 智

学生員 鈴木 崇

正会員 遠藤銀朗

1. 序 論

本研究では、環境汚染制御分野における遺伝子工学の技術的活用のための基礎として、環境中に放出された遺伝子操作微生物の挙動を調べる方法を確立することを目的とした。遺伝子操作微生物を様々な環境水を使用し、その温度条件を変化させ生残増殖試験を行い遺伝子操作微生物の環境中での挙動を調べ、開放系利用に係わる生態系影響評価試験確立のための検討を行った。また環境浄化微生物のモニタリング方法として、分子生物学的技術であるPCR法による特定微生物の検出法の開発を行った。

2. 実験方法および結果

2-1. 生残試験の結果

行った生残試験の結果の代表的な例を（図-1）から（図-4）に示す。遺伝子操作微生物はどの試験に対しても、大腸菌HB101株とS17株を使用した。西湖の場合の夏の実験結果（図-1）を見ると、初期の段階では導入した遺伝子操作大腸菌数は、一旦増加することが認められ、その後の減少の度合いも緩やかなことが分かる。そして冬に実験結果（図-2）の場合も緩やかに減少している。減少速度が遅いのは、西湖が人為的汚染が進み、栄養となる有機汚濁物質が多いためと思われる。また、冬期の初期の段階で増加しなかったのは、循環期となって温度躍層が壊れ、水質は表層まで一様に混合し、表層の有機物質が減少したことも関係していると思われる。

大井川の上流の場合の実験結果（図-3）を見ると、導入した大腸菌は比較的速く減少し、栄養となる有機汚濁物質の量が少ないことを示している。だが、下流の場合の実験結果（図-4）では、減少の度合いは緩やかである。これは、下流の水質改善が進んでいないことによると考えられる。

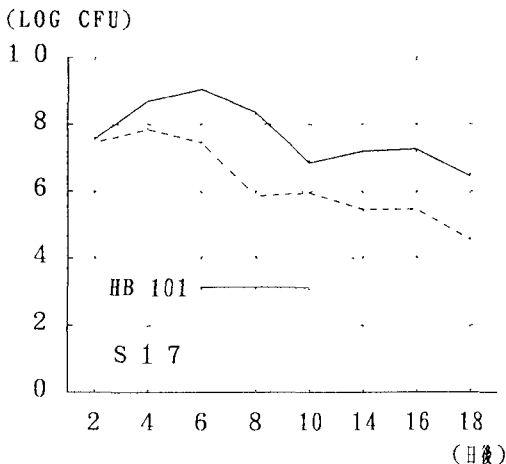


図-1 大腸菌の西湖における生残試験

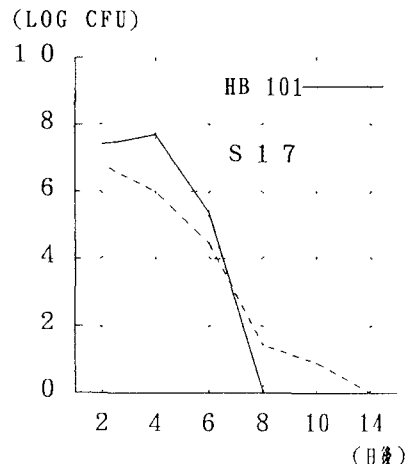


図-2 大腸菌の浜名湖における生残試験

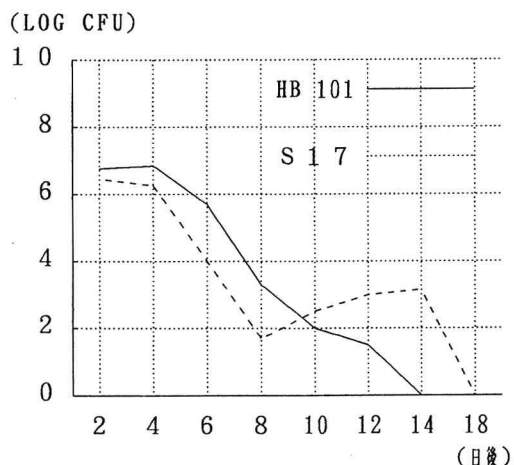


図-3 大腸菌の大井川上流における生残試験

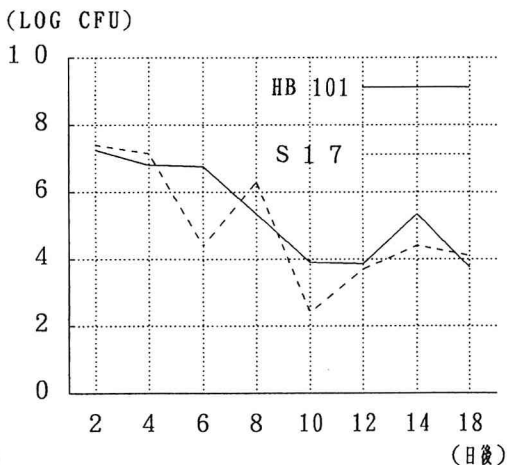


図-4 大腸菌の大井川下流における生残試験

2-2. PCR法の増幅結果

PCR法による遺伝子操作微生物の高感度検出方法の開発の研究については、PCR法によって増幅する際に、従来は抽出過程での損失が多く微生物の検出感度を上げることが難しかった(図-5)のに対して、以下の点を改良し操作の手順を簡略化することにより、(図-6)に示すようにほぼ1細胞の存在を確認できるまでに検出感度を上げることが可能となった。

- ① DNA抽出にDNA精製用の特別なマトリックス(Bio Rad製インスタージン)を使用する。
- ② PCR段階で反応液蒸発防止材としてアンプリワックスを使用することや、ホットスタート法およびマスターミクスチャーを使用する。

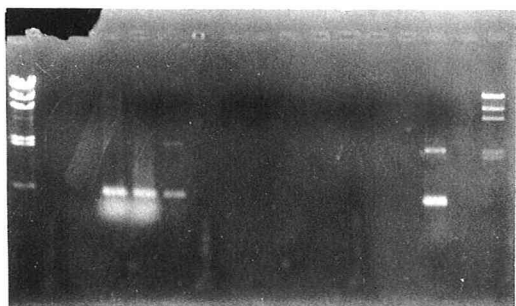


図-5 PCR法による増幅結果

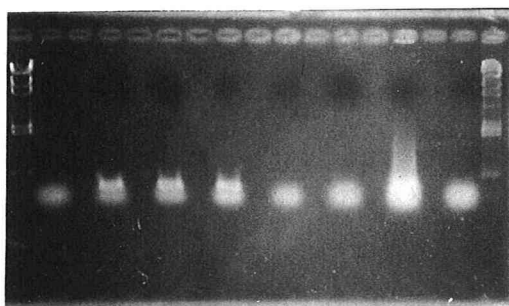


図-6 改良したPCR法による増幅結果

3. 結 論

- ① 環境水中に導入した遺伝子操作微生物の生残性は、環境水の水質のによって大きく影響されることが知られた。
- ② PCR法を用いて遺伝子操作微生物を高感度検出するための、遺伝子DNAの抽出回収方法、およびPCRの反応液調製方法を確立することができた。