

〔特別講演〕

バイオ・テクノロジーに関する 2, 3 の話題

大阪大学工学部 合 葉 修 一

1. まえがき

バイオ・テクノロジーとは広義に解釈すれば高等動植物をはじめ微生物を含む生物体一般の潜在的な優れた機能を人類の福祉増進に役立たせる技術の総称である。もっと分かりやすく言えば我々の食生活に密着している味噌醤油をはじめとする各種醸造製品などは、微生物の代謝活性を巧みに利用した先祖伝来の技術すなわちバイオ・テクノロジーに他ならない。しかし、これら古来からの優れた技術をさしおいて近年、遺伝子組換え、細胞融合、組織培養、バイオ・リアクター……などの呼び声のもとに次世代基盤産業の一つとしてバイオ・テクノロジーが世間の注目するところとなっているのは何故だろうか？ 一例をあげれば人間を含む高等動物由来の、あるペプチドホルモンとしてのインシュリンの遺伝子を大腸菌という下等な微生物内でクローン化し従来、ごく微量にしか生産されなかった物質を生命現象の根幹であるDNAをめぐる操作によって大量生産させている事実にて代表される様に、生命科学の急速な進歩に対応して生物現象の、より具体的な産業への応用が考えられるに至ってバイオ・テクノロジーがにわかにクローズ・アップして来たとも思われ、DNAという分子レベルでの技術がすべてバイオ・テクノロジーにつながるかのような、ややもすれば暴走的な傾向さえも感ずるこのごろである。

さて、都市下水、産業廃水の処理あるいは特殊有害物質例えばパークロビフェニルとか水銀化合物の分解による公害除去などをはじめとして湖沼、河川の汚濁防止または富栄養化への対策などに関する多くの技術的課題を研究討論する本会でもその対策にはその程度の差はあろうが何らかの形で生物の働きに負うところがあるうかと考えられるがゆえに、本会に御参集の諸兄も最近のバイオ・テクノロジーとくに遺伝子操作をめぐる最新の技術に関心をおもちのことと想像している。

産業廃水の生物処理を直接の目的として生物とくに微生物の性質をその目的に適う様に遺伝子操作を利用して改良してこれが現実に役立っているという具体例を挙げるのは未だ困難な現在ではあるが、上述の様な経緯からして、本研究会の直接の目標とはいささか、隔っていることを承知のうえで主として醗酵工業という場における最近の2～3の話題を提供しようとするものである。さて、この課題に至るまえに、遺伝子操作をめぐる最近の話題と生物化学工学の研究との関係についてその科学史的な位置づけをごく簡単に解説することからはじめたいと思う。

2. 分子生物学と遺伝子操作…とくに生物化学工学の視点から…

2.1 バイオ・テクノロジーの年譜

まず、図-1をみていただきたい。今世紀後半



図-1 バイオ・テクノロジーの年譜 (その1)

におけるバイオ・テクノロジーの発展にとって見過すことが出来ないのは、ペニシリンをはじめとするいわゆる抗生物質工業の出現であって、微生物の大量深部培養技術の導入、工場レベルにおける無菌操作法の確立など戦前のバイオ・テクノロジーのレベルにとって画期的であったその意味づけは現在も変わらない。

一方、図-1であきらかなように同じく20世紀後半の生命科学の発展の原点は生命現象とくに遺伝情報発現の根源が化学物質としてのDNA(デオキシ・リボ核酸)であるとの発見であり分子生物学は今を去る約30年前、ワトソンとクリックによって実証され、かつ提唱されたDNAの2重らせんモデルを軸として発展して来た。生命科学の分野では遺伝情報の発現に関するオペロン説、DNAの塩基配列の特定部位を認識してこれを切断する制限酵素、また切断した部位を修復し2重らせん構造に戻すような酵素(リガーゼ)の発見などが1970年代に至るまでつづき、さらに大腸菌、枯草菌などに異種生物由来のDNAを移入する、いわゆる形質転換法が開発され、また、DNAを構成する塩基対の同定法の確立などその進歩の速さは正にどう目に値するものがある。

生命科学の基礎が以上のように今世紀後半急速に展開されると共に、染色体外の自律増殖因子としてのプラスミドの発見がある。各種の抗生物質を不活化する……換言すれば抗生物質がきかない……耐性菌から分離したプラスミドにこれらの耐性因子がコードされているという発見と相まって、遺伝子操作技術の重要な柱がうちたてられたと言えよう。プラスミドとその薬剤耐性因子とが何故に遺伝子操作上、重要な段階を画したかについては後述するが、ここで図-2に進もう。

図-2の年譜右側には図-1で記述した生命科学の発展に関し主要な項目をカッコ内に、また、新しい抗生物質生産の工業化が成功した時点とか、不溶化酵素の工業的応用研究の開始時期などバイオ・テクノロジーの発展をみる場合の重要な項目が記してある。バイオ・テクノロジーの中で応用微生物学と化学工学との両方の性格が重複し学際的な領域とも考えられる生物化学工学のこの年代における研究の流れを示す上で代表的と思われる研究対象例を図の中央線の左側に示してある。

ここで言いたいことは、生物化学工学が1960年代から1970年代前半にかけては微生物の培養方法に例をとるならばその微生物をとりまく環境を最適化する、いわばマクロ的な研究とその具体化にあったすう勢は漸次、微生物内部に目をむけたいわばミクロ的研究にも移行しつつあることであろう。すなわち工学的センスからして微生物自体をいわゆるブラック・ボックスに見立て、その外部からの刺激に対する応答から工学的に内部の状況を推測するのにとどまらず、積極的にブラック・ボックスの中味の解明にもその興味を移しはじめているといえるが、その解明の手段の一つとして遺伝子操作技術が登場して来たことと、微生物の中味の解明のみが生物化学工学の目的ではなくその中味の情報を微生物代謝の制御へ、すなわちミクロからマクロへフィード・バックすることに

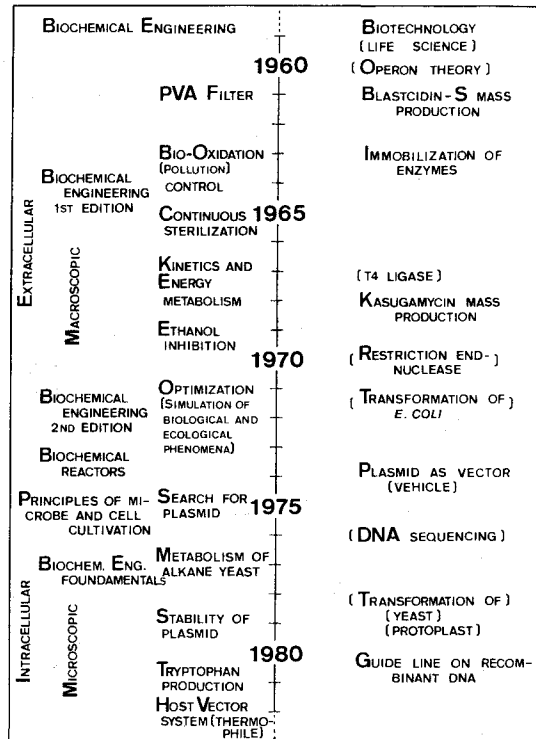


図-2 バイオ・テクノロジーの年譜(その2)

生物化学工学の使命と目的
 が在ることを強調したいものである。

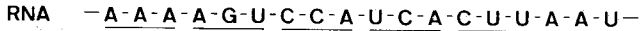
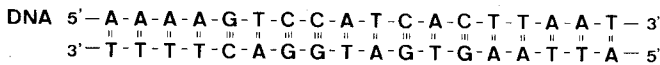
2.2 DNAと遺伝子操作

DNAとは、すでに広く知られている様に(図-3の例)ポリヌクレオチドの2本鎖である。そのうち1本鎖DNAはデオキシリボースという5炭糖の1'炭素にA(アデニン), G(グアニン), T(チミン)またはC(シトシン)(いずれも含窒素有機塩基)が結合しかつ5炭糖はその3'及び5'の水酸基がリ

生物の遺伝情報発現に際しては2本鎖DNA中の1本鎖が鋳型となってRNA(リボ核酸)が、ある酵素の存在下で転写される。この場合DNA中のA→U(ウラシル)という塩基に、G→C、C→G及びT→Aに読み変えられ、このRNA(メッセンジャーRNA)(以後、mRNAと略記)中の遺伝文字は他の種類のRNAの共同作業でアミノ酸として読み取られmRNA上でのアミノ酸のペプチド連鎖が進行して蛋白質(酵素)の合成に至る(遺伝文字の翻訳)。

制限酵素とはDNAの塩基配列の中から、特異的配列(例えばGAATTC、図-4参照)を認識しかつ一定の塩基間、図-4の例ではG-A間で2本鎖DNAを切断する酵素、一般的に言えば異種DNAの侵入に際し生物が示す自己防衛…制限現象…に参与する

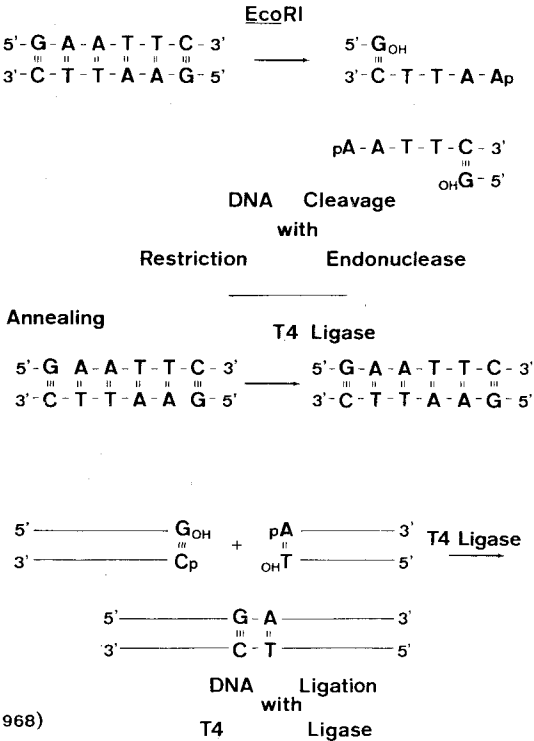
酵素である。この特異的塩基配列の認識と切断とが遺伝子操作でまず必要な事項である。次に、制限酵素による



<u>E.coli</u>	Chromosomal DNA :	2.4 × 10 ⁹ daltons
	1 Gene :	1,000 base pairs
	1 Gene :	M.W. 600 × 1000 = 0.6 Md
	Chromosomal :	2.4 × 10 ⁹ / 0.6 × 10 ⁶ = 4 × 10 ³ Genes
	Plasmid :	~ 10 ⁶ daltons ;
		(3 ~ 7 Md) ; (5 ~ 12 Genes)

(1953)

図-3 DNAとは？ その略図の例



(1968)

図-4 DNAの切断と修復

DNA鎖の切断後この鎖を連結修復する酵素が必要であるが、図-4の下段のようにDNA鎖を加熱後徐冷し（アニリング）1本鎖DNA部分の塩基がそれぞれの相手を求めて結合した後、T4リガーゼで処理しこの例ではG→Aの結合を完了する。図-4の例では説明の便宜上、連結するDNA断片を同一DNA鎖由来のものとしたが、遺伝子操作ではもちろん連結する相手のDNA断片は外来のものである。制限酵素（図-4ではEcoRIの例）および、T4リガーゼはいわば遺伝子操作における“はさみ”と“のり”にたとえてみてもよく、ここに述べた操作は遺伝子組換えにおける一つの基本型を示したにすぎない。

遺伝子操作とは要するに異種生物由来の特定の遺伝子（平均して10³塩基対）を、ベクターとして例えばプラスミドに乗せて他の生物（微生物）へ移入し、本来持ち合わせない性質をこの微生物に賦与することとし、その操作上問題となる箇所を概念的に示したのが図-5である。円形で代表した組換えプラスミドに異種（微生物）からの遺伝子を太く画いてある。前述の“はさみ”と“のり”は既にこの組換えプラスミドを用意する段階で必須であるが、用意した組換えプラスミドが他の微生物中に入るためにはまず、種の障壁の一つとしてこの遺伝子が核酸分解酵素で分解されないことが必要であり、たとえこの障壁を逃れて首尾よく細胞質内に移行できても宿主菌の増殖に際してそのプラスミドが同調し娘細胞への伝達がうまく行われる必要がある。また、問題とする遺伝情報が転写、翻訳を経て目的の酵素（蛋白）の合成に至る過程での宿主菌による、この蛋白質の修飾とか分解、あるいは図-5中にあるように、真核生物遺伝子の場合には、介在配列を除去し、必要部分のmRNAを連結する（スプライニング）など種々の壁があり、これらの障壁を乗り越えてはじめて目的とする形質が正常に発現するはずのものである。

図-5では組換えプラスミドのうち目的とする遺伝子を太線で略記したが、あるベクターにこの様に遺伝子を連結しこれが宿主菌に移行しかつ宿主菌の複製（増殖）に見合ってこの遺伝子が正常に維持、複製されるような状態がクローン化

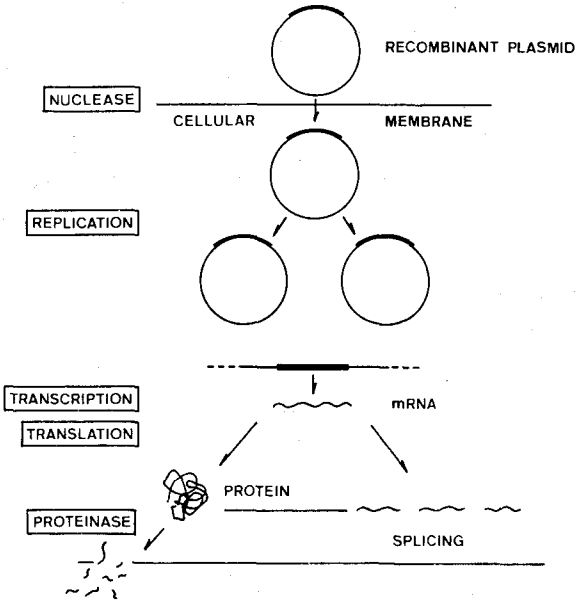


図-5 種の障壁

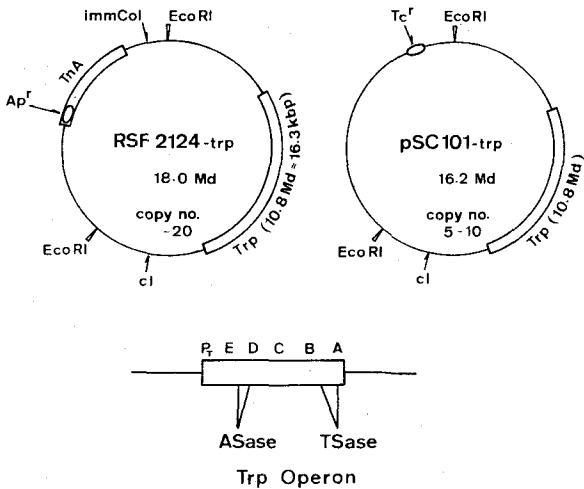


図-6 クローン化とは？

である。クローン化の例を図-6に示した。

図-6ではベクタープラスミドRSF2124及びpSC 101それぞれに大腸菌染色体上にオペロンを形成しているトリプトファン(必須アミノ酸の1種)の遺伝子を切り出してクローン化した、組換えプラスミドの例である。図中の下段にはトリプトファン遺伝子のオペロンの概念図を示してあるが、このオペロンはA~Eの遺伝子から成っており、E、Dはトリプトファン合成経路中、アントラニール・シンターゼの構造遺伝子であり、また、A、Bはトリプトファン・シンターゼという酵素に対応する遺伝情報をコードしている。ここで例示した組換えプラスミドはRSF2124-*trp*、pSC 101-*trp*につき分子量はそれぞれ18.0メガダルトン(Mdと記入)、16.2 Mdである。因みに大腸菌染色体の分子量は約 2.5×10^3 Mdであり、プラスミドがいかに小さいかは明らかである。図中にあるコピー数とはこれらの組換えプラスミドが宿主菌(大腸菌)の細胞1ヶ当りに存在する個数で、もしこれらのプラスミドが宿主菌の増殖に伴って安定にそのまま維持される限り、細胞1ヶ当り染色体1本と考えられる原核微生物(大腸菌)のトリプトファン合成能力は組換えプラスミドのコピー数に対応して増強される現象…遺伝子増幅効果…が期待されるところに、生物化学工学の立場からの、DNAと遺伝子操作をめぐる話題が生まれるとも言えよう。

3. 遺伝子操作の応用

3.1 大腸菌によるトリプトファンの生産

図-7を見ていただきたい。これは微生物によるトリプトファンの生合成の経路を示したものであるが、この経路は大筋において微生物の種類例えばバクテリアとして大腸菌(グラム陰性)、枯草菌(グラム陽性)などに拘らず微生物内部における炭素源の代謝経路を表現しているものと言えよう。細かいことは省略するとしても、炭素源(グルコース)はシキミ酸、コリスミン酸を経由して、その一部はアントラニル酸、インドール-3-グリセロール酸リン酸を経てトリプトファン・シンターゼの触媒作用で最終産物トリプトファンに至る。

ここで強調しておきたいことは、この生合成経路では最終生産物としてのトリプトファンが培養液中に蓄積されるに従って菌本来の性質として、

- (1) 図-7のトリプトファン・オペロンにコードされる5種類の酵素自体の発現が抑制されること、
- (2) トリプトファン・オペロンに限ってもその中でアントラニール・シンターゼおよびホスホリボシル・トランスフェラーゼ(PRTase)の活性がそれぞれ阻害されること、

さらに

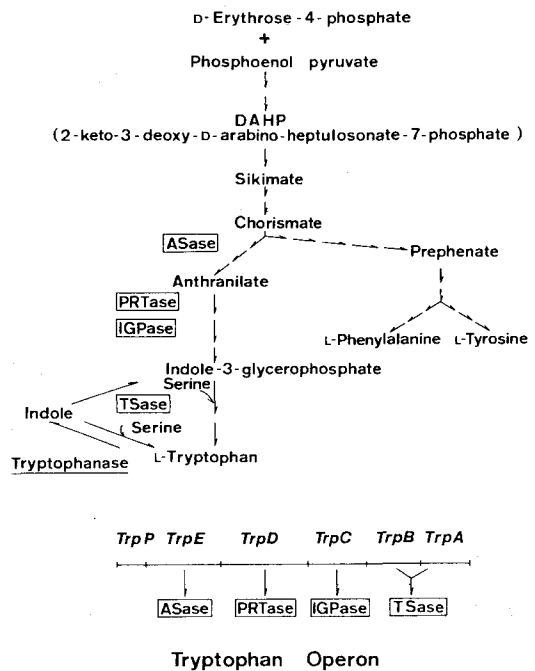


図-7 トリプトファンの生合成経路

(3) 大腸菌の場合、トリプトファンをインドール、ピルビン酸及びアンモニアに分解するトリプトファナーゼの活性があること、

である。微生物にはこれら3重にまたがる自己調節作用によってトリプトファンの過剰生産をおさえ不必要にある生産物を培養液中または自己の体内に蓄積しないような機構が備わっている。従って、トリプトファンを多量にこれらの微生物で生産しようとする場合には、菌自身にとっては不本意乍ら外部からこの自己調節機構をはずす必要があることをまず認識したい。

遺伝子操作の応用に至るまえに、ここ20年以上前から各方面で種々な微生物を用い上記のような調節機構をはずしながら(変異処理による菌の改良により)トリプトファンの生産性を上昇させようとした例は数多く発表されておりその状況を表-1に要約した。炭素源はグルコース、微生物にはグラム陰性、陽性菌を用い、また特殊な麦角菌を使用した例もあるが、その生産性は必ずしも満足できるものではなく、トリプトファン生産の現況はインドールとセリンを原材料とした合成法でありその価格も必須アミノ酸の中では最も高価(kg当り1万数千円)といわれている。

表-1 醗酵法によるトリプトファンの生産

Microorganism	Cell conc.	Time (h)	Trp (g/l)	Productivity (g/l/h)	Reference
<i>Claviceps purpurea</i>	—	150	1.5	0.010	Malin and Westhead, 1959
<i>Escherichia coli</i>	OD=3	48	0.7	0.015	Kida and Matsushiro, 1965
<i>Hansenula anomala</i>	80 g/l	260	14	0.054	Ebihara <i>et al.</i> , 1969
<i>Bacillus subtilis</i>	OD=0.49 562	48	6.15	0.128	Shiio <i>et al.</i> , 1973
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	21 g/l	96	12	0.125	Hagino and Nakayama, 1975
<i>Escherichia coli</i>	2 g/l	12.5	1	0.080	Tribe and Pittard, 1979

さて、ここで解説する宿主・ベクター系は表-2のように大腸菌(*E. coli*)のC600系統のものであるが、注意していただきたい点は染色体からいずれもトリプトファン・オペロンを欠失したものをを用いたことのほかトリプトファン・リプレッサーを欠損したものの、さらにトリプトファナーゼを欠損したものの3種類を用意していることである。前述の調節機構をはずす観点から言えば抑制を解除したもの(Ram)、抑制とトリプトファナーゼとの双方を欠損したもの(Tna)を用いたことであるが、トリプトファンによる当該酵素活性阻害を除去したものはここに用いた組換えプラスミドに変異処理を施し後出のIという記号をつけたプラスミドである。

以上の事柄を概念的に分かりやすくするため図-8を用意した。*E. coli* でリプレッサーのみ、

表-2 トリプトファン生産における宿主と組換えプラスミド

Host strains			
<i>E. coli</i> W3110	<i>trpAE1</i>	(AE1)	
<i>E. coli</i> W3110	<i>trpAE1 trpRam27</i>	(Ram)	
<i>E. coli</i> W3110	<i>trpAE1 trpR tnaA</i>	(Tna)	
<i>B. subtilis</i> M1113	<i>arg15 trpC2</i>	$r_M^- m_M^-$	
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	Sm^r		
Recombinant Plasmids			
RSF2124- <i>trp</i>	$18.0 \cdot 10^6$	<i>Trp' Ap^r</i>	
pSC101- <i>trp</i>	16.2	<i>Trp' Tc^r</i>	
pMT- <i>trp</i>	11.9	<i>Trp'</i>	

またはトリプトファナーゼとリプレッサー双方を欠損し、かつトリプトファン・オペロンを染色体上から失った大腸菌を宿主としこれに pSC 101 というベクター・プラスミドにトリプトファンオペロンを組み込んだ(クローニングした)組換えプラスミドを用い宿主を形質転換している。形質転換後にこのプラスミドにトリプトファン耐性を与えていることは明らかであり、トリプトファンの生合成はそのコピー数 5~10 のプラスミド中のトリプトファン・オペロンで進行する筈である。

振盪フラスコでのこれら宿主-組換えプラスミドの培養試験結果の一例を表-3 に示した。培養液の組成は表-3 の下段に示したが培養条件は 37℃, pH 7 で振盪フラスコであるから pH の調節は間歇的に苛性ソーダでおこない、また、培養時間は 30~35 h である。

この表から明らかなように、トリプトファンの自己調節機構を 1 つずつはずすにつれてトリプトファンの蓄積濃度は増大しており、抑制、阻害および分解酵素の除外すべてを実現すれば対照条件つまり宿主として AE1, 組換えプラスミドに pSC 101-trp を用いた場合と比較しても約 50 倍の蓄積量増大が達成できている。

組換えプラスミドで宿主菌を形質転換した場合、このプラスミドが宿主菌内で安定に保持されるか否かは工業的応用を目的とする場合には特に看過できない課題である。プラスミドの安定性の定義は後述するが表-3 の例ではそのプラスミドの安定性は AE1 株については 100%, Ram 株 ついで Tna 株に至るにつれて 95~85% と低下している。しかし、この場合は実際上特に問題となる様な安定性の低下とは言えないと思われる。一般に、トリプトファンの生産を高めようとして、ある菌

に極度の負担をかけその本来の代謝の流れを、限度を越えて攪乱する場合には、かえってトリプトファンの生産には好ましい結果を与えないといわれており、具体的にはプラスミドのコピー数が極端に大きい場合とか、あるいはトリプトファンによる阻害除去の程度を高めすぎると、菌の増殖速度の低下とかプラスミドの消失、トリプトファン・オペロン部分の欠損などがおこり逆効果を招来するといわれている。

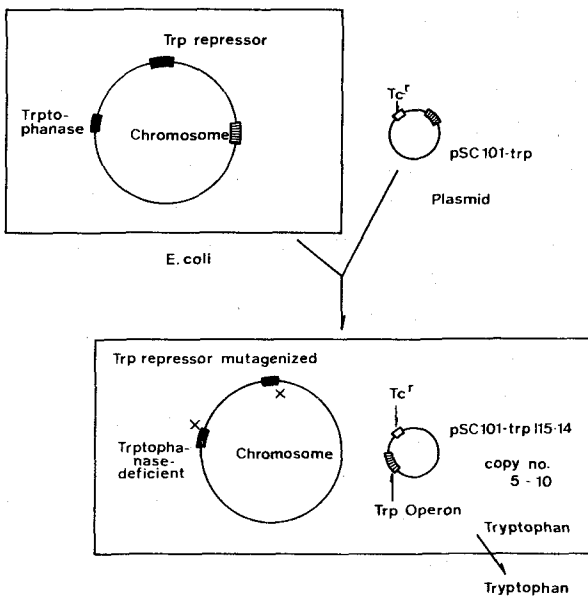


図-8 トリプトファン生産における遺伝子操作の応用概念図

表-3 トリプトファンの生産(その1)

Host	Plasmid	Repression Inhibition		Tryptophanase	Trp (mg/l)
AE1	pSC101-trp	+	+	+	7
AE1	pSC101-trp-II5	+	-	+	11
Ram	pSC101-trp	-	+	+	7
Ram	pSC101-trp-II5	-	-	+	70
Tna	pSC101-trp	-	+	-	8
Tna	pSC101-trp-II5	-	-	-	360

Shaken Flask Tests		37°C, pH 7.	
Culture Medium :		Glucose	3 %
		KH ₂ PO ₄	0.3 %
		K ₂ HPO ₄	0.7 %
		NH ₄ Cl	0.3 %
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 %
		Casamino acids	0.1 %
		pH controlled intermittently at around 7 by 2N NaOH.	
Culture Period		30-35 h.	

振盪フラスコ試験で最も有効にトリプトファンを生産するのは予期したように抑制、阻害および分解をそれぞれ排除した Tna 株と組換えプラスミド pSC 101-trp. I 15 であることを確かめたうえでこれを容量30ℓの小型培養槽を用いより現実的な環境で回分培養をおこなった一例を図-9に示した。ここに用いた培養液の組成は基本的には表-3下段のものと同じであるが、表-3下段よりも初発グルコース濃度を5%に高め、かつトリプトファンの前駆体としてアントラニール酸を0.5 g/ℓ添加し、培養の進行によりこれが減少した場合、ある時点から0.05g/ℓ・hの一定速度でこれを補給し培養液(37℃)のpHは7.0に制御している。

図-9によれば菌の増殖ははじめガザミノ酸を主な窒素源とするため増殖は速く、この窒素源がなくなればアンモニアが窒素源となるため2段階増殖の様相を呈している。また、炭素源(グルコース)の枯渇と共に菌の増殖も停止し、この例ではOD₆₆₀で約13 換算すれば約6.9 g/ℓが最終の菌濃度となっている。

ここで表-1に示した醗酵法によるトリプトファンの生産につき、各種の微生物を従来の突然変異技術を用いて造成した場合の実例のいくつかと比較してみよう。図-9との対比で明らかなことは従来の方法でグルコースを炭素源とした場合12g/ℓ~14g/ℓのトリプトファンを培地中に蓄積している例では培養時間が極めて長いか、または菌濃度が可成り濃い場合であるが、これに対し図-9の例では菌濃度は比較的にうすく而も短時間内で5.5 g/ℓのトリプトファンを蓄積している。いま、トリプトファンの最終濃度を、それ迄に経過した時間で除したものを単純な意味でこの回分培養の、トリプトファンの生産性を表わす尺度の一つと仮定すれば表-1に示した例ではその生産性は0.010~0.128 g/ℓ・hの範囲であるのに対し、図-9をもとにすればその尺度は0.229 g/ℓ・hであり、この程度の検討だけでも既に過去20年以上にわたる極めて多くの研究者によって報告されて来た生産性を優にうまわる成績を出しているところに、遺伝子操作の応用とくに、従来の醗酵工業では達成しにくかった技術の躍進に遺伝子操作を役立たせる意味があるろう。

言うまでもなく図-9に示した程度の培養成績が直ちに工業化にむすびつくとは考えられず、今後、培養液組成の工業的立場からの改良、改変、組換えプラスミドにおけるトリプトファン阻害耐性度の改良、さらに炭素源(窒素源)などの流加培養的手法の応用など多くの検討課題が残されている。また、アミノ酸生産における従来のグラム陽性菌の使用という経験的事実に立脚して大腸菌の使用を改めて検討する必要があるろう。

3.2 組換えプラスミドの安定性

トリプトファン・オペロンをクローン化した組換えプ

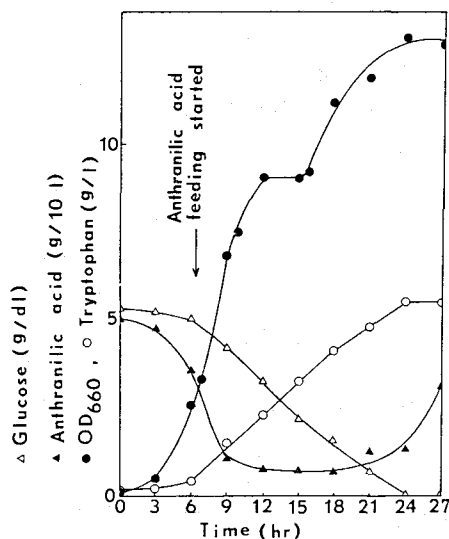


図-9 トリプトファンの生産(その2)

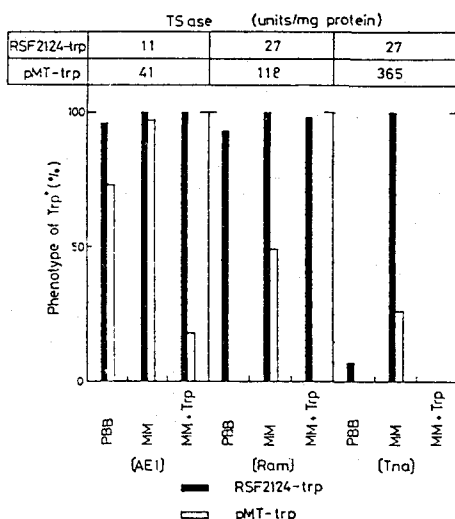


図-10 組換えプラスミドの安定性(その1)

ラスミドに関しての例で言うならば、これを宿主菌に移入したあと宿主菌を培養、約20世代経過後に具体的には Trp^+ の形質を示す株が全被検株中に占める割合で定義するとしよう。この安定性の実験例を図-10に示す。

この例では宿主として表-2で示した3種類の大腸菌をそれぞれ使用し、組換えプラスミドにはRSF2124-*trp*および pMT-trp を用いているが、形質転換株の培養には完全培地(PBB), 最少培地(MM) および最少培地にトリプトファンを添加した場合の組換えプラスミドの安定性を検討している。

- 図-10から言えることは、
- (1) トリプトファンを含む培地(PBB, MM+Trp)での培養では、 Trp^- 株(トリプトファン・オペロンを含むDNA断片のみか、または組換えプラスミド自体が脱落した株)が多く出現する、
 - (2) トリプトファン・リプレッサー欠損株(Ram, Tna)ではトリプトファン・シンターゼの活性が高い、
 - (3) Trp^- 株の出現頻度はトリプトファン・シンターゼ活性が高いほど大となる、
 - (4) トリプトファン・シンターゼ活性がいちじるしく高いTna(pMT-trp)の場合、完全寒天培地上でのコロニー形成で明らかに大、小2種類のコロニーが観察された。小コロニーは Trp^+ の形質であったが、大きいコロニーでは Trp^- であった。

これらの実験事実は組換えプラスミド保持株ではときとしてトリプトファン・オペロンの酵素群の発現量が過多となり菌の増殖に過度に負担を与える場合もあることを示唆している。培養中にたまたま派生した Trp^- 株は Trp^+ 株よりも増殖速度が大であるから培養時間の経過と共に Trp^- 株が全菌株中にある割合が増大する。つまり、プラスミドの安定性は減少する。

ここに例示したトリプトファン・オペロンをクローン化したプラスミドの有無による宿主菌の増殖速度の大、小関係は他のプラスミドについても一般的に言えることであり、表-4にはCol E1というプラスミドを宿主菌 *E. coli* JC7623 が含有するか否かで明らかにその比増殖速度が異なっている例を示した。

組換えプラスミドまたはベクター・プラスミド自体についてその複製機構とか、その脱落などに及ぼす各種因子の影響を順序立てて整頓し、その安定性向上乃至は脱落防止に役立つ方法を一般的に提起できるには今後にまつところが極めて大きい。現時点では培地中にそれらのプラスミドが普通持っている薬剤耐性因子に対応して薬剤を添加し、いわゆる選択圧力を加えること、換言すれば何らかの原因で宿主菌からプラスミドが脱落したものは培地中の薬剤のために生育できず、プラスミドを保持する株のみがその薬剤耐性因子を含むがゆえに培地中でも生育して来る現象を利用すること、およびプラスミドの有無で宿主菌の比増殖速度が多少とも影響される筈という事実を利用することである。すなわち、前者はより積極的なプラスミド脱落防止法であり後者は、どちらかといえば消極的な対策となろうがここでは、後者について以下にのべる様な仮定のもとでプラスミド脱落のパターンを解説しよう。

表-4 プラスミド保持菌の比増殖速度の例

Strain	Plasmid	Specific Growth Rate, hr ⁻¹		μ_2 / μ_1
		Plasmid (+) cells, μ_1	Plasmid (-) cells, μ_2	
<i>E. coli</i> JC7623	Col E1	0.92	1.19	1.29
	Col E1 Derivative TnA insertion			
	6-30	1.12	1.29	1.15
	3-12	0.95	1.28	1.35
	3-1	0.88	1.30	1.48
	7-12	0.87	1.34	1.54
	2-35	1.04	1.33	1.28
	Col E1 Deletion mutant			
	6-30:d6-6	0.92	1.52	1.65
	6-30:d6-6	1.22	1.30	1.07
	d0-11	0.98	1.04	1.06

Col E1 : 10-20 copies per chromosome ; Medium : L Broth.
(4.2 Md)

cited from : Inselburg, J. 1978
J. Bacteriol. 133 : 433-436

すなわち、ここで取り扱う現象を単純にするため、

(1) 宿主菌は対数的に増殖する、

(2) プラスミドには自己伝達能はなく、宿主菌の増殖(分裂)に同調して娘細胞に分配されるが、1回の分裂毎にプラスミドが宿主菌から脱落する確率は一様に p で表現できる、

とする。

従って

$$aS + P \rightarrow (2 - p) P + N \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$bS + N \rightarrow 2N \quad \dots\dots\dots (2)$$

但し、

S = 基質濃度, mg/ml

P = プラスミド保持菌の濃度, ヶ/ml

N = プラスミド脱落菌の濃度, ヶ/ml

a, b = 係数, 細胞数/ mg 基質

P および N の変化速度は

$$\frac{dP}{dt} = (1 - p) \mu_1 P \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = p \mu_1 P + \mu_2 N \quad \dots\dots\dots (4)$$

ここに、

t = 時間, h

μ = 比増殖速度, h^{-1} 。

添字 1, 2 はそれぞれプラスミド保持菌および脱落菌を表わす。

$t = 0$ で

$$\left. \begin{array}{l} P = P_0 \\ N = N_0 \end{array} \right\} \quad \dots\dots\dots (5)$$

とすれば (3), (5) 式から

$$P = P_0 e^{(1-p) \mu_1 t} \quad \dots\dots\dots (6)$$

(4), (5), (6) 式から

$$N = N_0 e^{\mu_2 t} + \frac{p \mu_1 P_0}{(1-p) \mu_1 - \mu_2} \left\{ e^{(1-p) \mu_1 t} - e^{\mu_2 t} \right\} \quad \dots\dots\dots (7)$$

プラスミドの安定性 F は

$$F = \frac{P}{P + N} \quad \dots\dots\dots (8)$$

$N_0 = 0$ として回分培養の場合、 F は (6), (7), (8) 式から

$$F = \frac{e^{(1-p) \mu_1 t}}{e^{(1-p) \mu_1 t} + \frac{p \mu_1}{(1-p) \mu_1 - \mu_2} \left\{ e^{(1-p) \mu_1 t} - e^{\mu_2 t} \right\}} \quad \dots\dots\dots (9)$$

世代数 n は

$$n = \frac{\mu_1 t}{\ln 2} \quad \dots\dots\dots (10)$$

プラスミドの有無による比増殖速度の相異(既述)を表わすパラメータ α は

$$\alpha = \frac{\mu_2}{\mu_1} \dots\dots\dots (11)$$

(9), (10)および(11) 式から n 世代後のプラスミドの安定性 F_n は,

$$F_n = \frac{1 - \alpha - p}{1 - \alpha - p \cdot 2^{n(\alpha + p - 1)}} \dots\dots\dots (12)$$

$p = 0.01$ の場合, F_n 対 n の関係を α をパラメータとして図-11 に, また, F_{25} と α との関係は p をパラメータとして図-12 に示した。

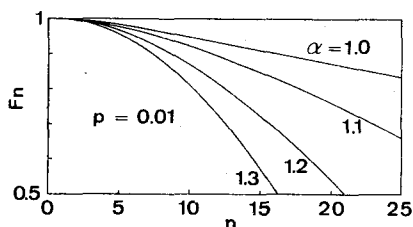


図-11 組換えプラスミドの安定性(その2)

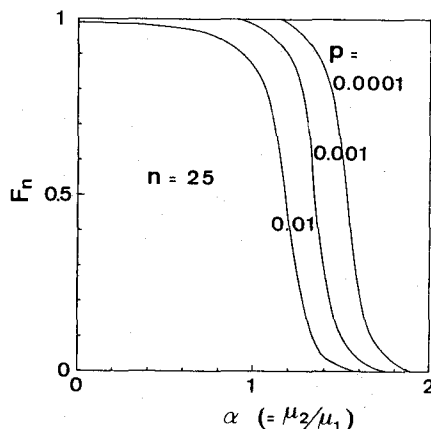


図-12 組換えプラスミドの安定性(その3)

図-11, 図-12 はともに単純な図表で p , α および n 相互関係を明らかとするものの, プラスミドの脱落防止対策を示すものではない。しかしながら, p をこれらの関係と実験データから推定出来れば, プラスミドの安定性を許容範囲内に収めるための培養上の指針は一応求められるであろう。

4. あとがき

異種生物由来の遺伝子を生物体内に移入し本来その生物が持たなかった形質をその生物に発現させる遺伝子操作技術そのものはほぼ完成の域に達している現在, この技術を如何に研究そのものへまたは実際面へ応用するかが今後大きく残されている課題である。応用上ではすでにまえがきでふれたような高等動物由来の遺伝子の微生物へのクローン化とその発現などをめぐって, ある物質(インシュリン)の量産などは実用段階に近づいている。本講ではこの様な背景のもとで, 遺伝子操作周辺のバイオ・テクノロジーに関しトリプトファン生産菌の育種とその具体化(工業化)に至る際の問題点とくに組換えプラスミドの安定性を中心にして解説したつもりである。

この様なアプローチが衛生工学の分野で可能かどうか, 検討の余地も多々あると思われるが, 従来やみくもの変異処理にのみ頼っていたとも言える微生物の育種, 造成が今や半ば計画的におこなわれるようになりつつある事実そのものは醗酵の分野をこえて広く応用につながるものと考えている。

なお, 微生物の増殖反応に関連した用語などの解説および遺伝子操作そのものの詳細な解説を望まれる向きは

- (i) 生物化学工学-反応速度論-(単行本)-科学技術社(発行所)(1975)
- (ii) バイオテクノロジー(新しい技術分野)…化学工学 46巻1号 26~32 (1982) (化学工学協会)
- (iii) バイオテクノロジーの発展とその位置づけ…化学と工業 35巻11号 756~759 (1982) (日本化学会)

解説記事の末尾にそれぞれあげた入門的和文の参考書を

を参照していただき度い。