

B-20 Gene Biomanipulationを想定したモデル生態系における導入プラスミドの挙動解析

○村上 和仁^{1*}・小浜 暁子²

¹千葉工業大学工学部生命環境科学科 (〒275-8588 千葉県習志野市津田沼2-17-1)

²東北工業大学工学部環境エネルギー学科 (〒982-8577 宮城県仙台市太白区八木山香澄町35-1)

* E-mail: kazuhito.murakami@p.chibakoudai.jp

1. はじめに

人為的な操作によって湖沼の水質浄化や生態系の管理を行うことを、Biomanipulation (生物操作) という。Biomanipulationは個体レベルでの生物の既存の生態系への導入であり、例えば、汚染物質除去などの環境改善を目的とした遺伝子組換え細菌の導入もこれに該当する。しかしながら、導入先の生態系への宿主細菌の不適合など、導入した組換え細菌が導入先の生態系で有用な遺伝子情報を発現できない可能性もあり、この原因である宿主細菌の現場適合性という問題を排除する目的で、有用遺伝子そのものを直接導入するGene Biomanipulationが注目を集めている。

本研究では、有用遺伝子を直接的に現場に導入するGene Biomanipulationを想定して、微生物生態系モデルであるマイクロコズムに非伝達性プラスミドpBR325およびpBR325を保持する*Escherichia coli* HB101 (*E. coli* HB101/pBR325) を接種し、マイクロコズム構成微生物との生物間相互作用の存在下での導入遺伝子の挙動を検討した。

2. 実験方法

(1) 供試プラスミド

Gene Biomanipulationを想定した導入プラスミドとして、非伝達性プラスミドpBR325 (Cm^r, Tc^r, Ap^r) およびpBR325を保持する*Escherichia coli* HB101 (*E. coli* HB101/pBR325) (Sm^r, Cm^r, Tc^r, Ap^r) をマイクロコズム培養開始16日目の安定期に接種し、マイクロコズム構成微生物との生物間相互作用の存在下での導入プラスミドの挙動について検討した。なお、pBR325は、遺伝子操作で広く用いられるpBR322 (Tc^r, Ap^r) に、トランス

ポゾンTn9によるCm^rを付加された、*Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Sal* Iサイトをもつ5995bpのサイズのベクタープラスミドである。

(2) 供試マイクロコズム

本研究では、分解者として4種の細菌類*Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp., coryneform bacteria, 生産者として2種の緑藻類*Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda*, 1種の糸状藻類*Tolythrix* sp., 捕食者として1種の原生動物纖毛虫類*Cyclidium glaucoma*, 2種の後生動物輪虫類*Lecane* sp., *Philodina erythrophthalma*, 1種の後生動物貧毛類*Aeolosoma hemprichi*の組合せからなるGnotobiotic型マイクロコズムを用いた。なお、このマイクロコズムは高い安定性と再現性を有するモデル微生物生態系であり、下水試験方法—1997年版—に生態系影響評価試験の方法として記載されている。

(3) 培養方法および測定項目

マイクロコズムの培養は、ポリペプトン濃度を100mg・L⁻¹となるよう調整したTP培地200mlを300ml容三角フラスコに入れ、2ヶ月間継代培養しているマイクロコズムを種として5ml接種した後、25℃, 2,500lux (明12hr/暗12hr), 静置条件とした。培養開始後、0, 2, 4, 7, 14, 16, 18, 20, 23, 30日目にマイクロコズムから試料をサンプリングし、細菌類は希釈試料を作製して平板培養法にてCFUを計数し、藻類は試料を超音波破碎して血球計数盤にて、微小動物はグリッド付き界線スライドグラスを用いて光学顕微鏡下で計数し、生物相の変遷 (構造パラメータ) を観察した。導入プラスミドであるpBR325については、各種抗生物質を添加した選択培地にて検出した。

3. 結果および考察

(1) *E. coli* HB101/pBR325接種系

E. coli HB101/pBR325はマイクロコズム培養開始後16日目に $5.2 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ で接種した後、2日後 $7.1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、4日後 $1.2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と減少し、14日後には $9.6 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となった。マイクロコズム構成微小動物である原生動物*C. glaucoma*は接種時に $1.1 \times 10^1 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ であったのが接種後2日目に $3.1 \times 10^3 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、4日目に $3.9 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ に増殖した後、7日目には $1.7 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ に減少し、その後14日目には $1.2 \times 10^3 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ になった。

Peruthrophthalma, *Lecane* sp., *A. hemprichi*といったその他の微小後生動物は僅かに増加傾向にあった。緑藻類の*Chlorella* sp., *Squadracauda*および糸状藍藻類の*Tobrythrix* sp.はほとんど影響を受けずに非添加系と同程度の個体数密度で推移し、土着細菌類も大きな変化はなく、 $10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度の個体数で安定していた。

このように、マイクロコズム接種後、選択培地 (Sm^r , Cm^r , Tc^r , Ap^r) による生菌数計測では*E. coli* HB101/pBR325は急速に減少し、マイクロコズム内の微小動物群の個体数が増加したことから、導入した*E. coli* HB101/pBR325の挙動は土着の微小動物の捕食作用により支配されているものと考えられた。

(2) pBR325接種系

pBR325を直接接種した系では、*E. coli* HB101/pBR325接種系のような微小動物群の個体数増加は観察されなかったが、選択培地 (Sm^r , Cm^r , Tc^r , Ap^r) 上のコロニー数は増加傾向にあり、導入したプラスミドpBR325が非伝達性であるにもかかわらず土着細菌に取り込まれて形質発現していることが示された。

既往の研究より、アオコ形成藍藻類である*Microcystis aeruginosa*の代謝産物は、同種のみならず異種の細菌間においても、非伝達性プラスミドであるpBR325の伝達頻度を増加するように作用すること、および*C. glaucoma*と同様に原生動物繊毛虫類である*Tetrahymena* sp.の捕食作用により、pBR325の保有の有無にかかわらず、いずれの細菌も減少することが示されている。すなわち、自然生態系では、生産者としての植物プランクトンと消費者としての動物プランクトン、さらには分解者としての細菌類が共存して系を構築していることから、GMOの生残は生物間相互作用の複合的な影響により支配され、植物プランクトンと動物プランクトンではプラスミドDNAの細菌間水平伝達、すなわちGMOの生残に対して、逆向きの影響を与えることが報告されている。

(3) *E. coli* HB101接種系

宿主細菌である*E. coli* HB101はマイクロコズム内では有効なマーカーをもたないため、マイクロコズム接種後

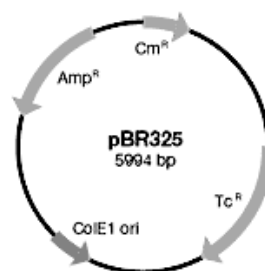


図-1 非伝達性プラスミドpBR325



図-2 微生物生態系マイクロコズム

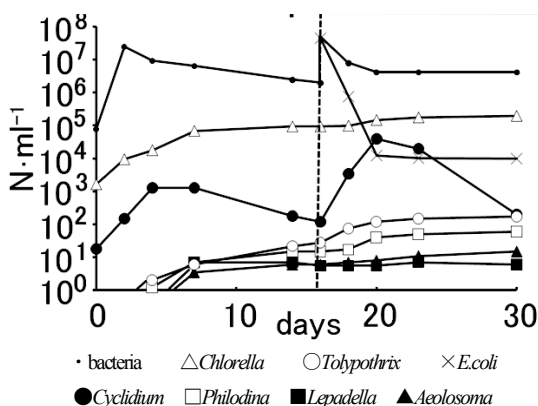


図-3 *E. coli* HB101/pBR325接種系におけるマイクロコズム構成微生物群の挙動

の挙動を追跡できなかったが、土着微生物、特に原生動物*C. glaucoma*の*E. coli* HB101接種直後の動態から推察すると、*E. coli* HB101も*E. coli* HB101/pBR325と同様の挙動を示したものと考えられた。マイクロコズム構成微小動物である原生動物*C. glaucoma*は接種時に $1.1 \times 10^1 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ であったのが接種後2日目に $3.5 \times 10^3 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、4日目に $3.8 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ に増殖した後、7日目には $1.5 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ に減

少し、その後14日目には $1.3 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ になった。*P. eruthrophthalma*, *Lecane* sp., *A. hemprichi*といったその他の微小後生動物は僅かに増加傾向にあった。緑藻類の*Chlorella* sp., *S. quadricauda*および糸状藍藻類の*Tohyphothrix* sp.はほとんど影響を受けずに非添加系と同程度の個体数密度で推移し、土着細菌類も大きな変化はなく、 $10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度の個体数で安定していた。

このように、マイクロコズム接種後、マイクロコズム内の微小動物群の個体数が増加したことから、導入した*E. coli* HB101の挙動は土着の微小動物の捕食作用により支配されているものと考えられた。

4. まとめ

- ① マイクロコズム接種後、選択培地法による生菌数計測では*E. coli* HB101/pBR325は急速に減少し、マイクロコズム内の微小動物群の個体数が増加したことから、これらの捕食作用により支配されているものと考えられた。
- ② pBR325を直接接種した系では、微小動物群の個体数増加は観察されなかったが、選択培地上のコロニー数は増加傾向にあり、導入した非伝達性プラスミドが土着細菌に取り込まれて形質発現していることが示された。
- ③ 非伝達性プラスミドが生物間相互作用を有するマイクロコズム内で土着細菌に伝達され、さらに発現が確認されたことより、Gene Biomanipulationにおける既存の生態系への新規遺伝子（遺伝情報）の導入については分子生態学的な検討が必要であり、導入する遺伝情報についてより厳格な評価・管理が求められると考えられた。

追記 本研究の一部は、平成24～26年度科学研究費助成事業（挑戦的萌芽研究）（課題番号24651029）：移入種生物がもたらす生態系影響評価のためのモデルエコシステムの汎用化に関する研究（研究代表：村上和仁）として実施されたものである。

参考文献

- 稲森悠平, 村上和仁：マイクロコズムを用いた外来微生物導入の安全性評価, 環境技術, Vol.30, No.6, pp.426-434, 2001.
- Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F., Head, I.M., Van der Zijpp, A.J., van Elsas, J.D. : Molecular Microbial Ecology Manual, Springer, 1778pp., 2007.
- Murakami, M. : Fundamental Studies for Bioremediation; Horizontal transfer of plasmid DNA in aquatic model ecosystems including microbial interactions, *Proceedings of 3rd IWA-ASPIRE Conference and Exhibition*, USB memory stick, 2009.
- 村上和仁：バイオレメディエーションにおける導入有用細菌の遺伝子伝播と生物間相互作用, 土木学会海洋開発論文集, Vol.25, pp.485-490, 2009.
- 日本下水道協会：下水試験方法—1997年版—, 1997.
- Old, R.W., Primrose, S.B. : Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering 214pp., University of California Press, 1981.
- Prentki, P., Karch, F., Iida, S., Meyer, J. : The plasmid cloning vector pBR325 contains a 482 base-pair-long inverted duplication, *Gene*, Vol.14, No.4, pp.289-299, 1981.
- Primrose, S.B., Twyman, R. : Principles of Gene Manipulation and Genomics 7th Edition, 672 pp., Blackwell, 2006.
- Sudo, R., Inamori, Y., Murakami, K., Okada, M., Ohtake, H. : Effect of micro animals on prosperity and decay of plasmid DNA transconjugant, *Preprint of Poster Papers on Water Pollution Research and Control*, pp.331-334, 1990.