

F-7 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究

(1) 遺伝子組換え微生物の微生物多様性への影響評価手法の開発に関する研究

② 遺伝子発現応答の解析による迅速な微生物多様性の影響評価手法の開発

独立行政法人国立環境研究所

生物多様性研究プロジェクト分子生態影響評価研究チーム 岩崎一弘

平成 15～17 年度合計予算額 30,719 千円

(うち、平成 17 年度予算額 9,582 千円)

※上記の予算額には、間接経費 7,089 千円を含む

[要旨]

近年のバイオテクノロジー技術の発展に伴い遺伝子組換え生物の利用用途、利用形態の多様化が進んでいる。このような背景の下、2000 年 1 月に生物多様性条約に関連するカルタヘナ議定書が採択され、これまでの人に対する安全性評価に加え新たに生物多様性への悪影響を防止することを目的とした生態系影響評価が求められている。

そこで本研究では、短期間で組換え微生物の評価が可能な生態系影響評価技術の開発を最終的な目標とし、まず組換え微生物接種に対する環境微生物数およびその遺伝子の応答を調べた。

霞ヶ浦の湖心より採取した湖水試料を用いて模擬環境としてのマイクロコズムを作成した。菌体を接種しない系を対照とし、各系は三連用意した。マイクロコズムより経時的にサンプリングを行い、各種選択培地で組換え微生物、非組換え微生物および環境微生物のコロニー計数を行った。また、サンプリングした試料より total DNA を抽出し、16S rDNA をターゲットとして PCR 法により増幅を行い、DGGE 分析により解析した。平板法による細菌の計数結果においては、組換えおよび非組換え微生物の影響は認められなかった。一方 PCR-DGGE 分析による解析の結果、無接種の対照系と比べて組換えおよび非組換え微生物の接種による微生物多様性への影響は認められなかった。

[キーワード]

微生物生態、遺伝子組換え、16S rRNA 遺伝子、PCR 法、DGGE 分析

1. はじめに

近年のバイオテクノロジー技術の発展にともない、遺伝子組換え生物の利用形態、利用用途の多様化が進んでいる。特に農業、食品、工業、製薬等の分野においては、除草剤耐性組換えトウモロコシ、ウイルス耐性組換えジャガイモ、また低温発酵性能を付与した組換えパン酵母、さらにプロテアーゼ酵素を生産する組換え微生物、組換え大腸菌によるヒトインターフェロン等の製造等種々の組換え植物、微生物が創生され実用に供されている。しかしながら一方では、組換えダイズのアレルギーの問題、組換えトウモロコシの標的外生物への毒性等に起因する組換え生物のリスクが大きな関心事となっている。1992 年 5 月の地球サミットで生物多様性の保全を目的

とする生物多様性条約が採択され、遺伝子組換え生物の使用による生物多様性への悪影響を防止することを目的とした「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」が2000年1月に生物多様性条約特別締結国会合再開会合において採択された。これを受けて日本においてもこの担保法「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が2003年11月に閣議決定され、2004年2月に施行されわが国でもこの問題に対処しなければならない状態となっている。

これまでわが国では組換え生物の開放系利用に関しては、農林水産省、経済産業省のガイドラインでリスク評価がなされてきており、宿主、導入遺伝子、組換え体のヒトへの毒性、毒素の生産、環境への影響を評価することが決められていた。しかしながら、いずれも遺伝子組換えによって生じた生理的、生化学的な変化を中心に短期的な調査や分析の結果に基づくものであり、生物多様性の評価を対象とするものではない。このため従来のガイドラインではカルタヘナ議定書に対応できず、新たな視点からの生物多様性への影響を評価する手法の開発が求められている。

2. 研究目的

現在、わが国では遺伝子組換え微生物の野外利用はなされていないが、近い将来環境浄化微生物等の有用な組換え微生物が開発あるいは海外より輸入され利用されていくと予想される。従って、利用申請された組換え微生物の生態系影響をなるべく短期間で評価可能な生態系影響評価手法の開発が急務の課題である。一方、これまで十分に解析できなかった微生物生態系の構成員である個々の微生物を評価するための分子生物学的技術の開発が盛んに研究されてきている。そこで本研究では、近年開発されてきた分子生物学的手法により組換え微生物の微生物多様性への影響を迅速に評価する技術の開発を最終目標とした。茨城県霞ヶ浦湖心より採水した湖水試料を用いて水系マイクロコズムを作成し遺伝子組換え微生物の生態系影響評価試験を行い、まず組換え微生物接種に対する環境微生物数およびその遺伝子の応答を調べた。

3. 研究方法

(1) 供試菌株

これまで環境中での挙動を追跡するためのマーカーを導入した各種組換え微生物を作成している¹⁻³⁾。これらマーカー付き組換え微生物のなかで、環境中に幅広く生息しており、また「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」第二条第十三号の文部科学大臣が定める認定宿主ベクター系として掲げられている *Pseudomonas putida* の組換え体、*P. putida* PpY101/pSR134 (組換え微生物) およびその宿主である *P. putida* PpY101 (非組換え微生物) を実験に使用した。本組換え体は、広宿主域ベクター pSUP101 にマーカーとして水銀還元遺伝子群(*mer* オペロン)を導入し作成した組換えプラスミド pSR134 を保持しており、水銀化合物の浄化能を有している。宿主 PpY101 は抗生物質 (ナリジキシン酸) 耐性、また組換え体 PpY101/pSR134 は同抗生物質と塩化第二水銀耐性を有しており、容易に環境中に土着の微生物と区別して検出することが可能である。

(2) マイクロコズム

比較的試料の処理が容易な環境水を用いた模擬環境 (マイクロコズム) を作成し (図 1)、影響

評価試験を実施した。供試環境水として、河川よりも滞留時間が長い湖沼水を用いた。また、組換え微生物を環境中で利用する際には、まず人間生活に近い地域で適用されていくものと予想されるため、いわゆるきれいな湖沼（貧栄養湖）ではなく水質汚染の進んだ湖沼（富栄養湖）を供試水とすることにした。そこで、国立環境研究所で定期的に全域調査を行い、水質並びに生物学的なデータが豊富である茨城県の霞ヶ浦を対象とした。また、なるべく排水その他の人間活動に影響を受けにくい湖心より採取した表層水試料を実験に用いた。平成 15 年 6 月に採水した試水を用いて第 1 回影響評価試験を実施した。試験の再現性、供試水の季節変動また試験期間の影響を検討するために、第 2 回影響評価試験を平成 15 年 12 月に採水した試水を用いて実施した。さらに、微生物グループの共同研究として、平成 16 年 11 月 9 日に採水した試水を用いて、第 3 回影響評価試験を実施した。



図 1 水マイクロコズム

第 1 回及び第 2 回影響評価試験は、DNA の吸着が少ないプラスチック製 2 L 容三角フラスコに試水 1 L を分注しマイクロコズムとした。ここに組換え微生物 PpY101/pSR134 を接種した系（G-1～G-3）、また組換え微生物のみに起因する生態系への影響を評価するために宿主である PpY101 を接種した系（H-1～H-3）および何も接種しない系（C-1～C-3）を対照として作成し、各系は三連用意した。これらを暗所、20℃の恒温室に設置し、60 rpm で緩やかに振とうし、影響評価試験を行った。

第 3 回影響評価試験は、上記と同様の組換え微生物 PpY101/pSR134 を接種した系、宿主である PpY101 を接種した系および無接種の対照系に加えて、本プロジェクト微生物グループで開発された組換え体あるいは手法を利用した共同研究としての位置づけで実施した。実験系については後述する。今回の試験では、プラスチック製 500-ml 容三角フラスコに試水 200 ml を分注しマイクロコズムとし、各系は二連用意した。これらを上記と同様の条件で影響評価試験を行った。

（3）組換え微生物及び環境微生物の定量法

各マイクロコズムを手で十分に攪拌した後、試水を 5 ml ずつサンプリングした。この試水 1 ml

を滅菌水 9 ml で希釈し、得られた希釈水をさらに適当な濃度まで希釈して、各種微生物の検出に用いた。

組換え体の検出には以下に示す軟寒天重層法¹⁻³⁾を用いた。あらかじめ塩化第二水銀を 20 ppm になるように分注しておいた乾熱滅菌済み小試験管に 56℃で保温状態にある LB 軟寒天(0.7 % 寒天)培地 2 ml を加え、ここにマイクロコズム試水の希釈水 0.1 ml を分注し、攪拌した後すばやく 250ppm のナリジキシン酸を添加した LB 平板培地に撒いた。非組換え体の検出は、水銀を添加せずに同様の手法により行った。これらの平板培地を 30℃、48 時間培養し生育したコロニーを計数した。

一般従属栄養細菌、グラム陰性菌、シュードモナス属細菌、耐塩性菌、放線菌について、上述の軟寒天重層法を用いて環境中の微生物の生菌数を計数した。滅菌水に寒天 0.7 % を添加した水軟寒天 2 ml に、希釈した試水 0.1 ml を加え、攪拌後すばやく各種選択平板培地に撒いた。20℃、7 日間暗所で倒置培養した後、生育したコロニーを計数した。

(4) PCR-DGGE 分析による微生物 DNA の解析

本研究では培養によらない微生物群集解析手法として近年急速な発展を遂げている分子生物学的手法の一種である PCR 法による微生物 DNA の増幅および DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 分析により、組換え微生物の微生物多様性への影響評価を試みた。PCR-DGGE 法により環境微生物群集構造を解析するにあたり、使用する試料に最適な微生物 DNA 抽出法、PCR 条件、DGGE 条件を検討し、解析可能なきれいな DGGE バンドパターンの得られる実験法を確立する必要がある。本研究で使用する霞ヶ浦湖水試料を用いて各種条件検討を行い、PCR-DGGE 分析手法の最適化を行った。

①PCR-DGGE 分析の基本原理解⁴⁾

DGGE 分析は DNA 変性剤の濃度勾配により塩基配列の異なる複数の二本鎖をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離する方法である。環境中の微生物群集から抽出した DNA を鋳型にして、標的遺伝子を PCR 反応により増幅させる。その際一方のプライマーの 5' 末端に GC に富む塩基配列 (GC クランプ) を付加することにより、その増幅産物は片側に GC に富む二本鎖フラグメントとなる。G-C 間の水素結合は A-T 間に比べて強いため、高い変性剤濃度においても GC クランプ部分は二本鎖構造を保持することができる。PCR により増幅された二本鎖は上方 (マイナス極) から下方 (プラス極) へ変性剤 (尿素、ホルムアミド) 濃度が高くなるように形成されたポリアクリルアミドゲルで泳動させるが、その融解点に相当する変性剤濃度において二本鎖が解離し始め、それにともない移動度が減少し、ついにはほぼ停止する。これは、二本鎖の PCR フラグメントが二本鎖構造を保持した GC クランプ部分を有する分岐構造を形成し、ポリアクリルアミドのゲルマトリックスを物理的に移動できなくなることによる。従って、塩基配列の異なる長さのほぼ同じ複数の二本鎖 DNA は異なる変性剤濃度で解離し、その結果移動度に差が生じ、分離が可能になる。分離された DNA フラグメントは適当な色素で染色することにより、バンドとして容易に検出することが可能となる。得られたバンドパターンからサンプル中の微生物多様性を評価することが可能となる。

②PCR-DGGE 分析の条件検討

本研究での微生物 DNA の抽出には、なるべく実験者の技術に左右されず再現性のよい結果を

得るため、市販のキット（Fast DNA Spin Kit for Soil, BIO 101 ; Qbiogene 社製）を用いた。まず、微生物細胞の回収法を検討した。ミリボア社製メンブランフィルター(pore size 0.22 μ m により霞ヶ浦湖水をろ過して 10、50、100、200 倍に濃縮した。得られた濃縮湖水試料から上記のキットを用いて微生物 DNA を抽出した結果、10 倍濃縮湖水試料以外はアガロースゲル電気泳動により確認できた。

得られた微生物 DNA 試料の PCR 条件を検討した。本研究では、近年微生物生態系の解析に頻繁に用いられている 16S rRNA 遺伝子上の V 3 領域を含む約 600 bp をターゲットとした GC clamp 付加 universal Primer⁵⁾を用いた。PCR の温度条件を検討し、より多くの PCR 産物が得られた条件、すなわち annealing 温度を 60℃ から 50℃ まで 2 サイクル毎に 1℃ 下げて、その後 50℃ で 40 サイクル行うタッチダウン法とした。各濃縮湖水試料から抽出した微生物 DNA の原液およびその 10 倍希釈溶液を鋳型として標的領域の増幅を行ったところ、全ての試料について PCR 産物が検出された。そこで、マイクロコズム内の微生物生態系を解析するために必要十分なサンプリング量について検討した。その結果、マイクロコズムからのサンプリング量を 20 ml とし、20 倍濃縮湖水試料より抽出した total DNA の 10、100 倍希釈溶液を PCR の鋳型として使用することに決定した。

DGGE 分析は世界中で広く使われている D-code universal mutation detection system(BIO-RAD 社製)を用いて行った。DGGE 分析では変性剤濃度が非常に重要であるが、条件検討の結果、変性剤濃度勾配は 35–50%、またサンプルアプライ量を 10 μ l とした。以上の検討により霞ヶ浦湖水試料の PCR-DGGE 分析条件の最適化がなされた。

③マイクロコズム試料の DGGE 分析

各マイクロコズムから試水 20 ml をサンプリングし、上述の方法で微生物細胞を回収した。フィルターを乾熱滅菌済み試験管内に移し、1 ml 滅菌水中に懸濁した。環境微生物細胞懸濁液は 2.0 ml 凍結保存チューブに移し、以下の操作を行うまで -80℃ で保存した。次いで微生物 DNA を抽出し、PCR-DGGE 分析に供した。

(5) クローンライブラリー法—シーケンス決定による微生物 DNA の解析

前述の PCR-DGGE 分析は、微生物群集構造を網羅的に解析してプロファイリングする方法として非常に優れているが、個々の微生物を同定していくことは比較的難しい。そこで PCR-DGGE 分析と同じ PCR 条件で得られた産物をランダムにクローニングして、さらにそのシーケンスを決定し、各系で優占していると予想される微生物を同定した。

クローニングは TOPO TA Cloning kit for sequencing と One Shot TOP10(Invitrogen Corp. ,CA)を用いて、常法に従って遺伝子導入株を作出した。得られたクローンが目的とする PCR 産物を保持しているかどうかのインサートチェックは、ベクター抽出法、コロニー PCR 法、ダイレクトコロニー PCR 法により行った。試験開始前 (0 日)、46 日後、96 日後の組換え微生物接種系 (G)、非組換え微生物接種系 (H) および対照系 (C) のマイクロコズム試料から、各系 100 クローン以上 (計約 800 クローン) のシーケンスを決定した。決定した塩基配列については、相同性検索プログラム FASTA (DNA Data Bank of Japan [DDBJ]) を使用して、近縁な既知配列を検索した。塩基配列データの多重アライメントと系統樹作成には、系統樹推定のもととなる進化距離の計算には Kimura のモデルを使用し、また系統樹作成には比較的信頼度が高いとされる距離行列法の一つである近隣結合法 (neighbor joining method) を用いている CLUSTALX を使用した。Bootstrap values

は、1000 回の系統樹作成において再現された値を使用した。TreeView (version1.6.5) を用いて系統樹を描画した。

(6) ダイレクトコロニーPCR 法—シーケンス決定による培養可能な微生物群集の解析

第 2 回影響評価試験では後述するように、組換え微生物および非組換え微生物接種の系で対照系と比べてグラム陰性菌数が少なく検出された。このグラム陰性菌計数用選択平板培地で生育してきたコロニーを分離し、16SrDNA のシーケエンシングによりプロファイリングを行い影響を受けた微生物の同定・分離を試みた。

試験開始前 (0 日)、10 日後、246 日後の組換え微生物接種系 (G)、非組換え微生物接種系 (H) および対照系 (C) のマイクロコズム試料から上記グラム陰性菌計数用培地で生育してきたコロニーをレプリカし、コロニーライブラリーを作成した。各コロニーをテンプレートとしてダイレクトコロニーPCR 法により 16SrDNA の一部を増幅し、得られた PCR 産物から直接シーケンスを決定した。塩基配列データの処理は上記と同様に行った。

4. 結果・考察

(1) 第 1 回影響評価試験

① 生残性

霞ヶ浦湖水中での、組換えおよび非組換え微生物の生残性試験の結果を図 2 に示した。両者は試験開始後 10 日目まで急激に減少し、その後は緩やかに減少していった。組換え微生物は、32 日目以降も減少していき 66 日目には検出限界に達したのに対し、非組換え微生物は約 10^3 CFU/ml で安定し、試験終了時にもその値を維持した。以前の研究¹⁾から環境水中の組換え体の生残性には原生動物による捕食が非常に大きな影響を及ぼすことが示されており、今回の試験開始後の組換えおよび非組換え微生物の急激な減少も湖水中の原生動物の捕食によるものと考えられる。組換え微生物と非組換え微生物の減少の傾向に大きな違いは認められなかった。

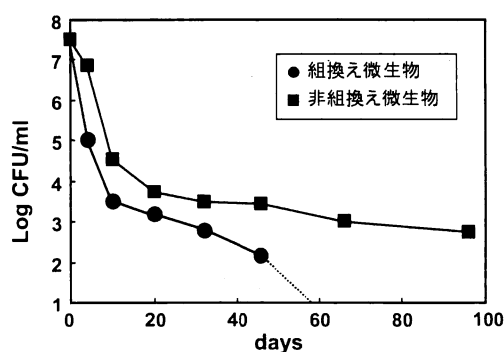


図 2 第 1 回影響評価試験 (生残性)

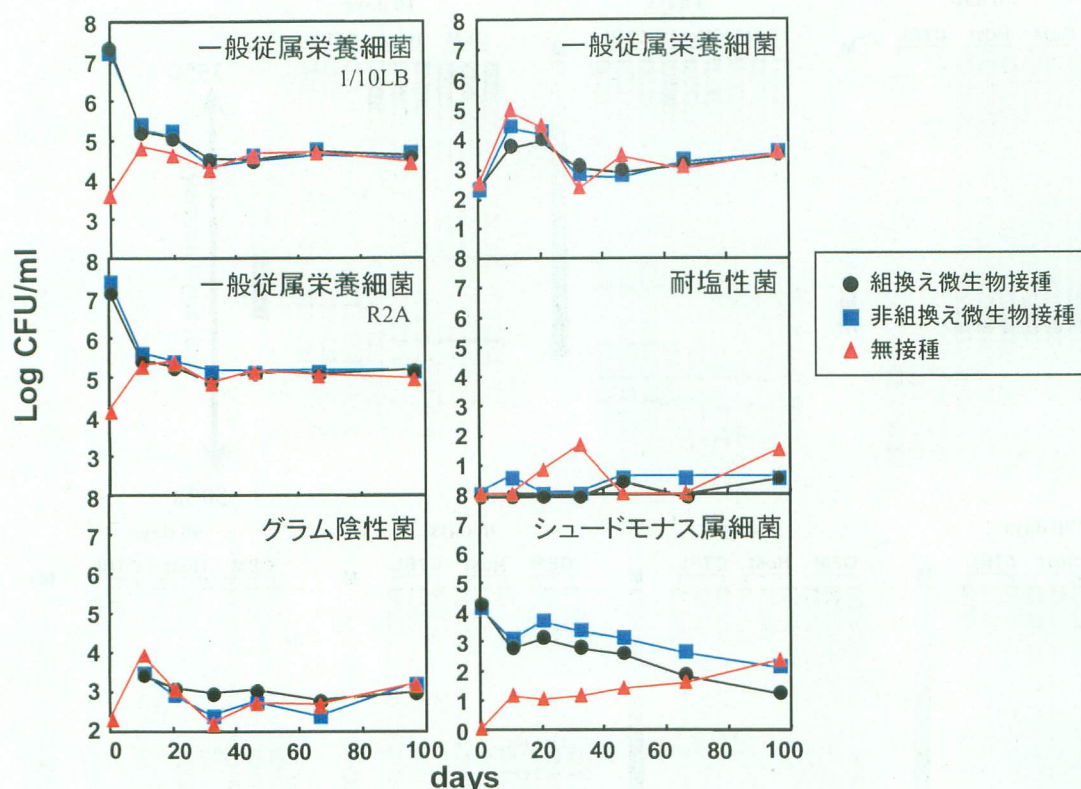


図3 第1回影響評価試験（各種環境微生物の生菌数への影響）

②環境微生物数への影響

各種選択平板培地による環境微生物計数結果を図3に示した。一般従属栄養細菌、グラム陰性菌、放線菌、耐塩性菌に関してはこれまでの知見¹⁻³⁾と同様に組換え微生物接種による環境微生物数への影響は認められなかった。今回使用した霞ヶ浦湖水ではシュドモナス属細菌が比較的少なく、接種した組換えおよび非組換え微生物が検出されたため、これらを接種したマイクロコズムでは無接種の対照系よりも高い菌数が示された。

③PCR-DGGE 分析

PCR-DGGE 分析によるバンドパターンの経時変化を図4に示した。これらの結果の中から試験開始時（0日）、初期（10日後）、中期（46日後）、終了時（96日後）を選抜してバンドパターンを解析した。バンドプロファイル間の非類似度係数を算出し、多次元尺度法による統計処理を行い、微生物群集構造間の類似性の相関について評価した。2次元平面上に配置されたプロットは各マイクロコズムを表しており、プロット間の距離が近いほど類似性が高い事を意味する。この距離を基準に全マイクロコズム間の類似性の相関について解析したところ、各系3連内の類似性は非常に高いことが明らかになった。これにより、本研究において評価した水マイクロコズム中微生物群集構造の高い再現性が確認された。

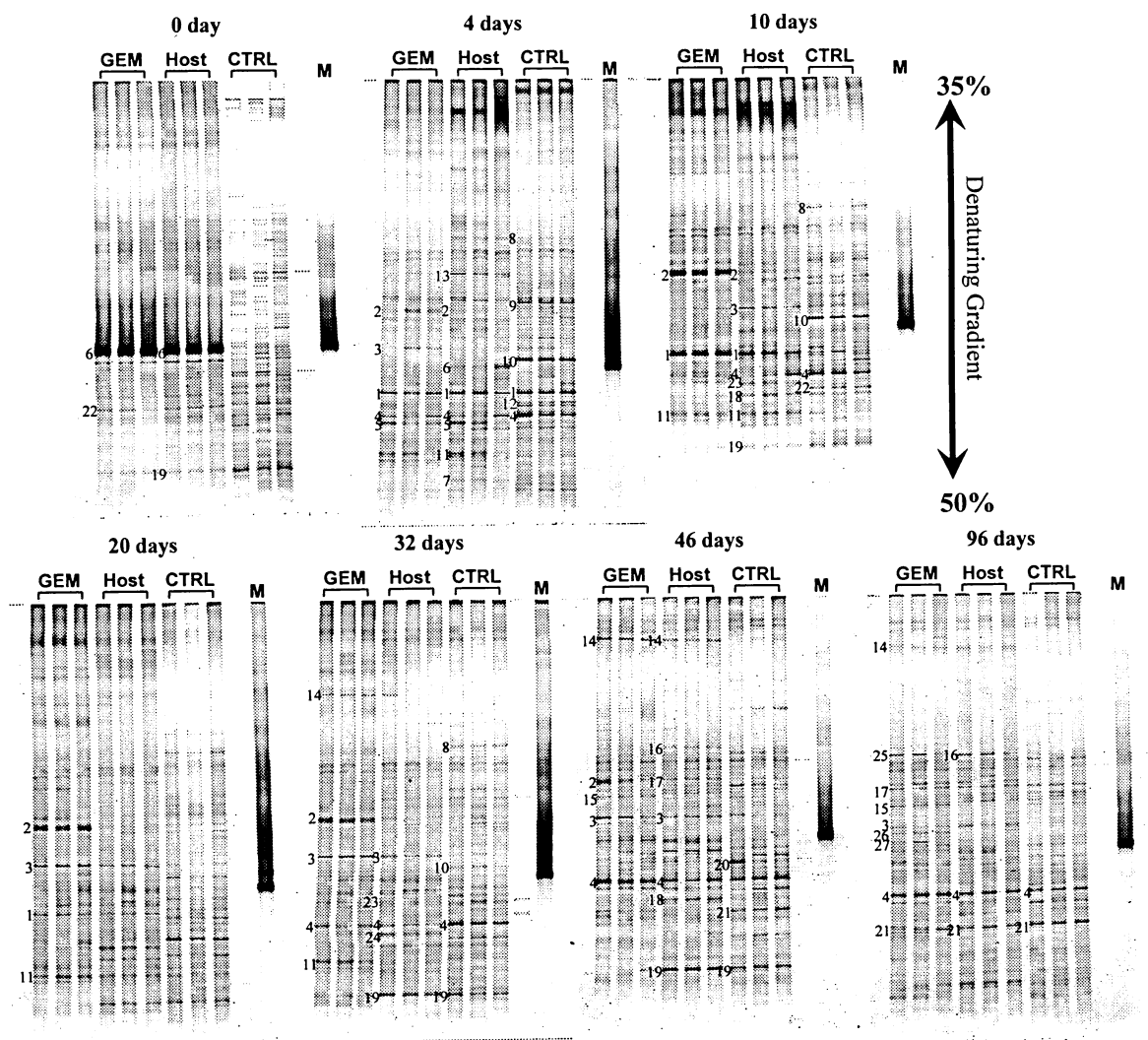


図 4 PCR-DGGE 分析による微生物多様性の解析

(図中の番号はシーケンスを決定したバンドを示す。表 2 参照)

再現性が確認された各系 3 連の PCR 産物を混合し DGGE に供した結果を図 5 に示す。このバンドプロファイルを基に、各系の微生物群集構造の経時的な変動を解析した。全サンプルのバンドプロファイル間の非類似度係数を算出し、多次元尺度法による統計処理を行い、各マイクロコスラム中の微生物群集構造の類似性の相関を評価した結果を図 6 に示す。培養開始時に接種菌由来の非常に強度の高いバンドが検出されたため組換え微生物および非組換え微生物接種系の微生物群集構造が大きく変動したが、10 日目以降は双方とも同様の微生物群集構造を経由して変動していき、試験終了時には菌体無接種の対照系と類似した構造に収束することが示された。しかしながら、何度も繰り返し PCR-DGGE 分析した結果、やはり菌体接種の影響を受けたと考えられるバンドが認められた。そこで、後述する微生物生態系の構成メンバーの把握ができるクローンライブラリー法による解析を行った。

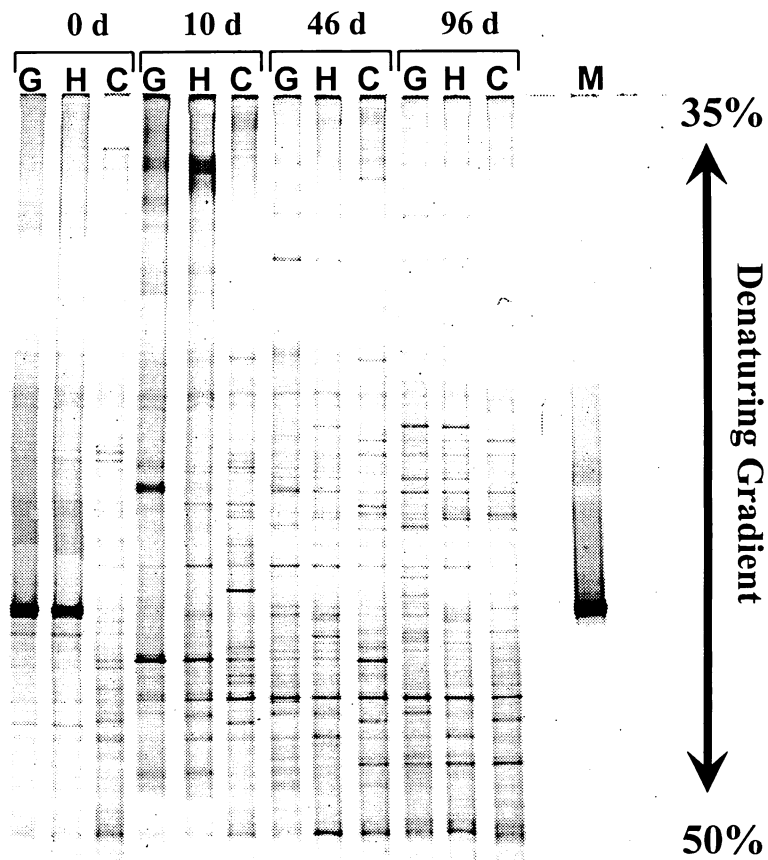


図5 PCR-DGGE 分析による微生物多様性の解析（バンドパターンの経時変化）

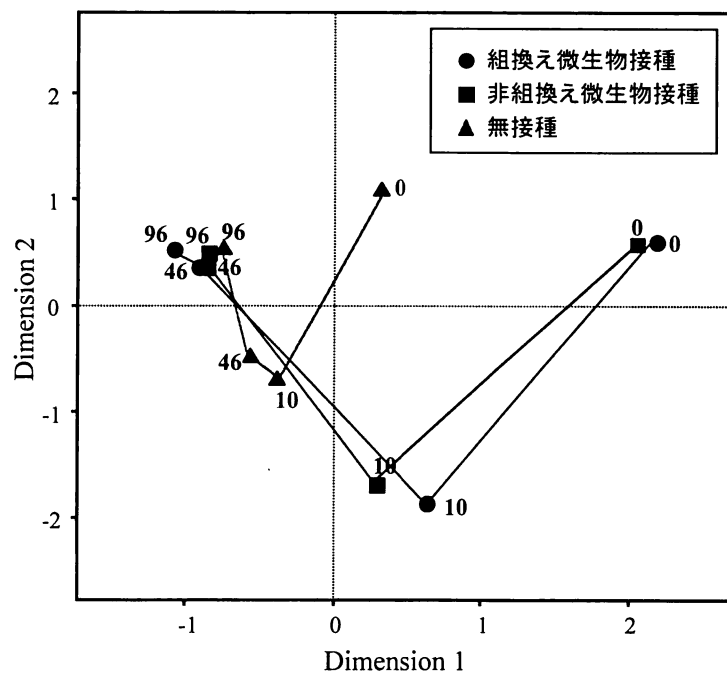


図6 多次元尺度法による PCR-DGGE バンドパターンの統計処理

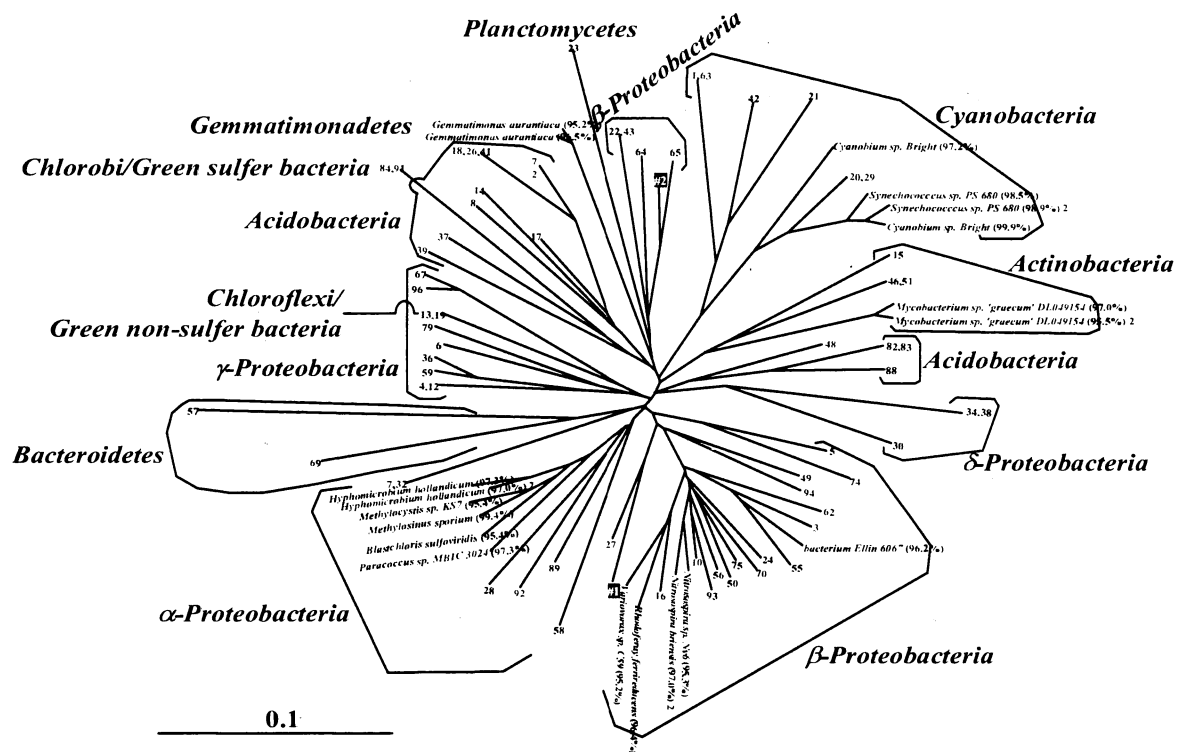


図 7 クローンラブラリー解析によって作成した無根系統樹（無接種 0 日）

表 1 クローンラブラリー法による解析結果まとめ

	C -0days	C 46days	C 96days	G-46days	G-96days	H-46days	H-96days
<i>a-Proteobacteria</i>	12%	4%	17%	22%	23%	14%	24%
<i>b-Proteobacteria</i>	29%	56%	34%	25%	23%	23%	14%
<i>g-Proteobacteria</i>	14%	9%	1%	30%	38%	34%	26%
<i>d-Proteobacteria</i>	1%	5%	6%	1%	2%	5%	5%
<i>C/F/B group(Bacteroidetes)</i>	2%	3%	0%	4%	3%	2%	2%
<i>Chlorobi/Green sulfur bacteria</i>	2%	0%	0%	0%	0%	2%	2%
<i>Chloroflexi/Green non-sulfur</i>	2%	0%	2%	1%	0%	0%	1%
<i>High G+C Gram</i>	7%	13%	23%	2%	8%	1%	6%
<i>Low G+C Gram positive</i>	0%	1%	1%	0%	0%	1%	4%
<i>Verrucomicrobia</i>	0%	0%	1%	3%	0%	2%	0%
<i>Planctomycetes</i>	1%	1%	0%	2%	0%	1%	1%
<i>Nitrospira</i>	0%	0%	0%	10%	0%	1%	1%
<i>Gemmatimonadetes</i>	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Acidobacteria</i>	12%	7%	7%	0%	3%	13%	14%
<i>Cyanobacteria</i>	12%	0%	2%	0%	0%	0%	0%

④クローンライブラリー法—シーケンス決定

各系の 0、46、96 日の DNA サンプルから得られた PCR 産物をランダムにクローニングし、1000 以上のクローンを得た。これらクローンに導入された DNA を確認し、約 800 クローンのシーケンスを決定し、系統解析を行った。1 例として無接種 0 日の試料で作成した無根系統樹を図 7 に示した。

各系で得られた結果をまとめると（表 1）、組換え体及び非組換え体接種の系では *γ-Proteobacteria* に分類される微生物が増加していることが示された。接種した組換え及び非組換え *P.putida* は、実験室内での培養微生物であるため霞ヶ浦の湖水に適応しておらず、増殖できずに原生動物の捕食を受けると予想される。やがて、*P.putida* の数が減少すると、原生動物の捕食圧も減少する。次に原生動物のフンや死骸を分解する微生物（スカベンジャー）が増殖してくる。このスカベンジャーが *γ-Proteobacteria* に分類される微生物であると考えられる。培養微生物である組換えおよび非組換え微生物の死滅が土着細菌の栄養源となり、その結果、特定の細菌に対する影響が現れてきたものと考えられる。しかしながら、再現性の確認の必要性などの問題点がでてきた。

このクローンライブラリー法は、微生物生態系の構造を解析する目的で、世界中で採用されており、生態系の構成メンバーを把握できる点で非常に優れている。しかしながら、データを得るために多大な労力が必要であり、本プロジェクトの目的のように組換え微生物のインパクトを非組換え微生物のそれと比較・評価するという多くのサンプルの処理が要求される場合には、適していない手法であろうと考えられる。

⑤PCR-DGGE による DNA バンドのシーケンス解析

③での PCR-DGGE の結果得られたバンドを常法によりゲルから切り出し、そのシーケンスを決定した。塩基配列データの処理は前述と同様に行い、分類学的グループ分けをした（表 2）。培養開始時の菌体接種系において最も強度が高いバンド（No.6）は接種した組換え微生物あるいは非組換え微生物に由来することが確認された。No.1 は培養開始後初期の全ての系において検出されたが、32 日目以降強度が低下し判別が困難になった。No.2 は、4 日目以降組換えおよび非組換え微生物接種系において検出された非常に興味深いバンドであるが、96 日目には検出されなくなった。No.10 は、培養開始後初期の菌体無接種系で高い強度を示したバンドであり、菌体接種により消失した特徴的なバンドである。一方、No.3、No.14 は菌体接種系にのみ検出された。No.4、19 は培養期間中全体に渡り全ての系で検出された。No.17 や No.21 は培養後期に全ての系において検出された。接種菌を除いた 26 種類のクローンのシーケンスと相同性の高い既知配列の分離源について考察すると、バンド No.15 を除く 25 種類が世界各国の水環境に由来するものであり、16 種類が湖沼環境で分離されていた。特に、湖沼学的特性が霞ヶ浦と似ていると考えられる琵琶湖（バンド No.1、2、11）や印旛沼（バンド No.8、9、10、11、28）を分離源とするものが多く見られた。本研究において影響評価を行った湖水微生物群集は、霞ヶ浦湖固有のものではなく、河川や湖沼といった淡水環境に典型的な浮遊性細菌群集とある程度の類似性を有し、また特性の似た富栄養化湖沼と共通の優占種を有すると考えられた。また、本研究結果からは組換え微生物による微生物多様性への影響は非組換え微生物と同等であることが示唆された。

表 2 PCR-DGGE によって得られた DNA バンドのシーケンス解析結果

Band No.	Nearest match	Taxonomic group	Accession no.	Similarity (%)
1	<i>Paucibacter toxinivorans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	AY515384	98
2	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i>	AF410927	98
3	<i>Nitrospira</i> sp.	<i>Nitrospirae</i>	AJ224044	94
4	<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	AY363245	90
5	<i>Rhodobacter</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i>	DQ228136	97
6	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	DQ229317	100
7	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	AF382400	89
8	<i>Methylophilus leisingeri</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	AB193725	95
9	<i>Methylophilus</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	AY436797	96
10	<i>Limnobacter thiooxidans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	AJ289885	94
11	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	D16428	97
12	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	AY429704	98
13	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Bacteroidetes</i>	DQ279372	88
14	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	<i>Bacteroidetes</i>	AF382400	98
15	<i>Geobacillus pallidus</i>	<i>Firmicutes</i>	AB198976	85
16	<i>Brevundimonas bullata</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	AJ717389	83
17	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	AY005039	90
18	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	<i>Nitrospirae</i>	X82558	97
19	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>	AJ504438	88
20	<i>Variovorax</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	DQ279350	97
21	<i>Aquabacterium</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	AF035050	97
22	<i>Microthrix parvicella</i>	<i>Actinobacteria</i>	X93044	86
23	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	AJ415571	98
24	<i>Paracoccus marcusii</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	DQ298023	97
25	<i>Geobacter</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>	DQ086800	89
26	<i>Flexibacter flexilis</i>	<i>Bacteroidetes</i>	AJ871243	93
27	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i>	AY584571	96

微生物多様性への影響については組換え微生物による特別な影響は認められなかったが、一方で組換え微生物と非組換え微生物接種では強度の異なるバンドが観察された。特に、組換え微生物接種により No.2 のバンドに対応する微生物が増加したことが観察された。No.2 のバンドシーケンスは、DDBJ による相同性検索の結果、ドイツの Plussee 湖から分離された *Sphingomonas* sp.B18 と 98% の相同性を示した。*Sphingomonas* 属細菌は、一般的に非常に多様な代謝機能を有し、様々な環境に生息する能力を保持していることが知られている。No.2 と相同性の高い *Sphingomonas* 属細菌は、ドイツの他の湖沼からも分離されており、また日本の琵琶湖からも No.2 と相同性の高い DNA (99%) が報告されていることから、湖沼環境において広く分布する微生物であると推測された。しかし、系統学的な情報だけでは当該微生物の特性について具体的に検証することは不可能であため、本微生物の分離を目指して、以下に示す Plate wash - PCR-DGGE 分析法を考案し、これによる検討を加えた。

⑥Plate wash - PCR-DGGE 分析

前述の環境微生物の定量の際に、計数用とは別に平板培地を同数用意した。培養後、約 200～1000 個のコロニーが生育した平板培地上に 3 ml の滅菌水を滴下し、ディスポーザブル白金耳（SARSTEDT 社製）でコロニーを滅菌水中に掻き集めて回収し、Plate Wash 試料とした。これらの試料から前述の方法で DNA を抽出し、PCR-DGGE による分析を行った。Plate Wash - PCR-DGGE 解析の結果から、組換えおよび非組換え微生物接種による影響を比較したところ、両者ともに菌体無接種の対照系と類似性の高いバンドパターンを示すことが認められた。しかし、菌体接種により出現するバンドがいくつか確認された。影響が見られたバンドに加え、全てのレーンに共通なバンドについてもシーケンス決定を試み、7 種類のバンドのシーケンスを決定することが出来た（表 3）。その中でも、バンド No.1 のシーケンスは、⑤での解析において組換え微生物接種系で強度の増加が観察されたバンド（⑤での No.2）と 100%の相同性を示した。このバンドに対応する微生物の分離を試みたところ、マスタープレート上から同一のシーケンスを有する 2 個のコロニーを取得することが出来た。この微生物を平板培養および液体培養した結果からは、非常に強い凝集性を有することが明らかとなり、この微生物が組換え *P.putida* 接種により増殖した際に、原生動物の捕食圧を逃れる上で重要な役割を果たしていると推測された。

表 3 Plate wash - PCR-DGGE によって得られた DNA バンドのシーケンス解析結果

Band No.	Nearest match	Taxonomic group	Accession no.	Similarity (%)
1	<i>Sphingomonas</i> sp.	Alphaproteobacteria	AF410927	98
2	<i>Acidovorax</i> sp.	Betaproteobacteria	AY429704	98
3	<i>Caulobacter fusiformis</i>	Alphaproteobacteria	AJ227759	100
4	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	Betaproteobacteria	AF019073	100
5	<i>Acidovorax</i> sp.	Betaproteobacteria	AM084011	98
6	<i>Nocardioides kribbensis</i>	Actinobacteria	AY835926	97
7	<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	DQ205296	96

（２）第 2 回影響評価試験

①生残性

第 2 回影響評価試験での生残性を図 8 に示す。第 1 回のそれと比べると長期にわたって検出された。これは夏季と冬季の霞ヶ浦試水の生態系構成メンバー、特に捕食者の構成が異なることによるのではないかと予想された。

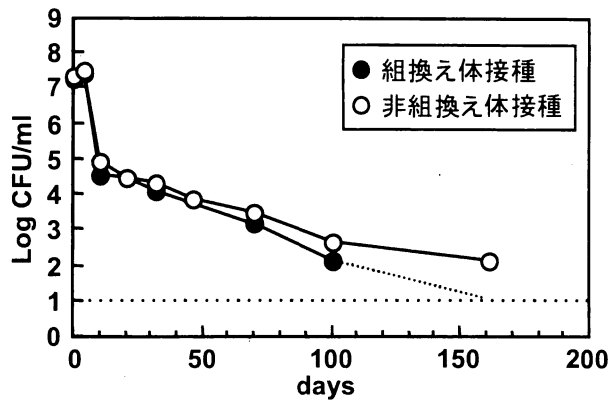


図8 第2回影響評価試験（生残性）

②環境微生物数への影響

第1回影響評価試験においては、組換えおよび非組換え微生物接種による生菌数への影響は認められなかった。一方、第2回影響評価試験ではグラム陰性菌を除いて影響は認められなかったが、組換え体及び非組換え体接種の系ではグラム陰性菌数が無接種と比べて少なく検出された(図9)。そこで、このグラム陰性菌計数用選択平板培地で生育してきたコロニーを分離し、16SrDNAのシーケンスによりプロファイリングを行い組換え微生物接種により影響を受けた微生物の分離を試みた。

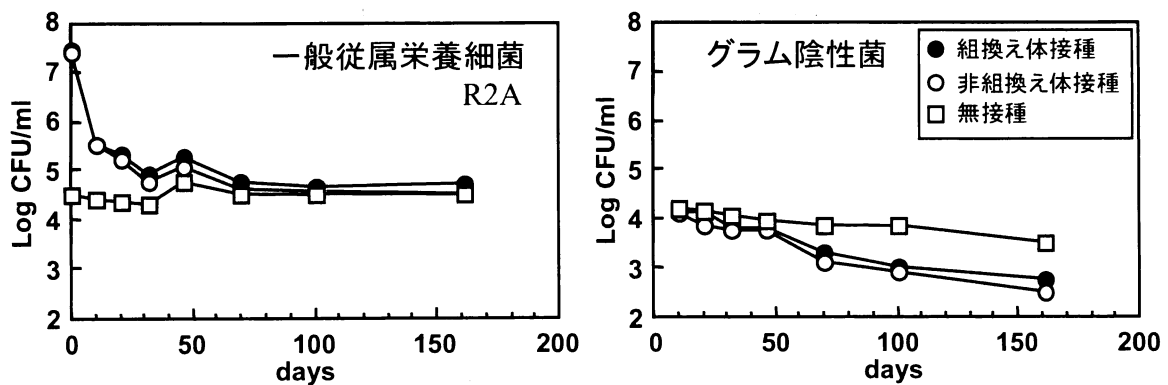


図9 第2回影響評価試験（各種環境微生物の生菌数への影響）

③ダイレクトコロニーPCR法—シーケンス決定

試験開始前（0日）、10日後、246日後の組換え微生物接種系（G）、非組換え微生物接種系（H）および対照系（C）のマイクロコズム試料から上記グラム陰性菌計数用培地で生育してきたコロニー（約2,500コロニー）からレプリカし、生育が確認できた約1,700コロニーのライブラリー

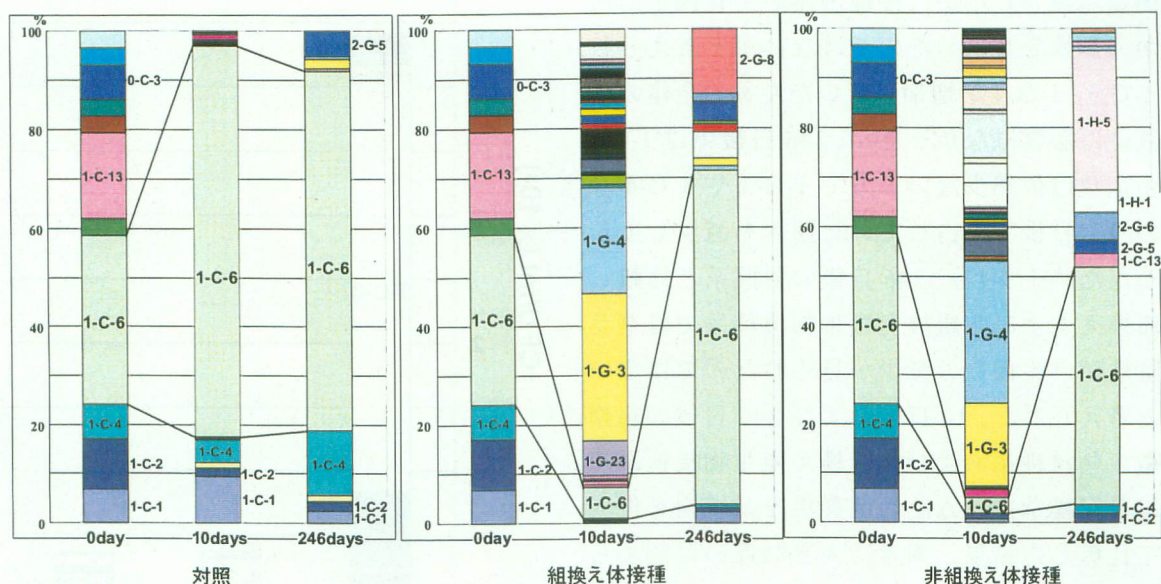


図 10 培養可能なグラム陰性菌の遺伝子解析による微生物群集構造の解

を作成した。これらの各コロニーのシーケンス解析を行い、1,613 コロニーの塩基配列を決定した。

各系における経時的な変動を比較・解析した結果(図 10)から、対照系のサンプル中のグラム陰性菌用培地で生育してきたコロニーでは、0 日、10 日後、246 日後で常に 1-C-6 (環境中の土着の *P.putida*; 相同性 100%) が優占していることが確認された。一方、菌体接種系では 10 日後において 1-C-6 が大幅に減少し、246 日後で再び優占化しているのが確認された。1-C-6 (環境中の土着の *P.putida*) と添加した *P.putida* PpY101 の塩基配列の相違の確認を行った。シーケンスの決定できた 442b の間で相同性を確認したところ、97.1%であり 13 箇所の塩基配列の違いが認められた。また、系統樹解析の結果からも、1-C-6 と添加した *P.putida* PpY101 は別の株であることが確認された。10 日後の組換えおよび非組換え微生物接種系でみられた 1-C-6 の減少は、土着の *P.putida* (1-C-6) と接種した *P.putida* (*P.putida* PpY101 または *P.putida* PpY101/pSR134) の間で競合がおり、接種した *P.putida* の減少と共に環境中に存在していた *P.putida* も減少した可能性を示唆する。本プロジェクトにおける培養微生物に対する網羅的な遺伝子解析により、これまでの平板培養法による生態系影響評価試験では見ることのできなかつた微生物接種による影響が示された。また、10 日後の組換えおよび非組換え微生物接種系では 1-G-3 (*P.toxinivorans*; 97.75%)、1-G-4 (*Variovorax* sp.; 100%) の優占化が確認された。1-G-3、1-G-4 が、10 日後では非常に高い割合で存在していたのに対し、246 日後ではほとんど確認できなかったことから、これは接種菌体が 1-G-3、1-G-4 の生育因子に何らかの影響を及ぼした(例えば栄養源として働いたなど)か、環境中で優占化していた 1-C-6 の大幅な減少に伴って 1-G-3、1-G-4 が増加したのではないかと考えられる。しかし、複雑な微生物生態系全体の変動を完全に理解し、説明するためには、まだまだ多くの時間が必要である。

10 日後では菌体接種の影響を受け、1-C-6 の生菌数は減少したが、接種菌体が生育因子に何らかの影響を及ぼしたのではないかと考えられる 1-G-3、1-G-4 が増加していたため、全体の生菌数には影響はなかったが、246 日後では 1-C-6 の生菌数は依然少ない一方で 1-G-3 や 1-G-4 などの 10 日後で優占していた菌体も減少してしまったため (図 11)、246 日後の対照系と比較して組換えおよび非組換え微生物接種系ではグラム陰性菌の生菌数の減少が見られたのではないかと考えられた。10 日後および 246 日後の組換え微生物接種系および非組換え微生物接種系での培養可能なグラム陰性菌群集を系統樹を作成して比較した結果、両者に大きな違いは認められなかった。

以上のことから、本影響評価試験では菌体を接種したことによるグラム陰性菌数への影響は見られたが、組換え微生物および非組換え微生物の影響は同等であると考えられた。

(3) 第 3 回影響評価試験

第 3 回影響評価試験は、組換え微生物 PpY101/pSR134 を接種した系、宿主である PpY101 を接種した系および無接種の対照系に加えて、研究打ち合わせで指摘を受けたゲノム以外の遺伝子すなわちプラスミドを保持することによる影響を見るためにマーカーを組み込んでいないプラスミドを保持する非組換え微生物 PpY101/pSUP104 の接種系、また生細胞としての土着の微生物群集との相互作用を確認するためにオートクレーブ殺菌した組換え微生物 PpY101/pSR134 添加系による試験を実施した。また、東京大学矢木グループとの共同研究として組換えプラスミドそのものの自体の影響および遺伝子拡散の可能性を評価するためにプラスミド pSR134 添加した系、産業総合研究所鎌形グループが開発したマーカー遺伝子を導入した組換え微生物 *P. putida* KTTG18/pBBTDTTm7 の接種系、さらに国立環境研究所青木グループとの共同研究として組換えおよび非組換えゼブラフィッシュ遺体を添加した系を用意した。

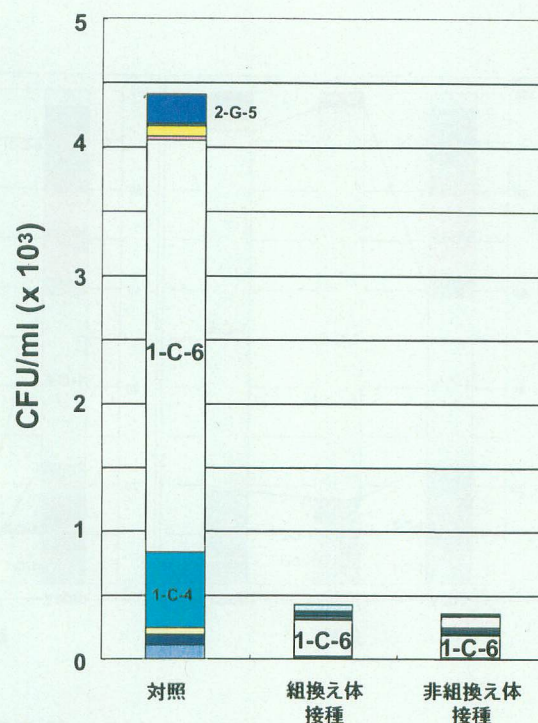


図 11 246 日後の微生物群集構造

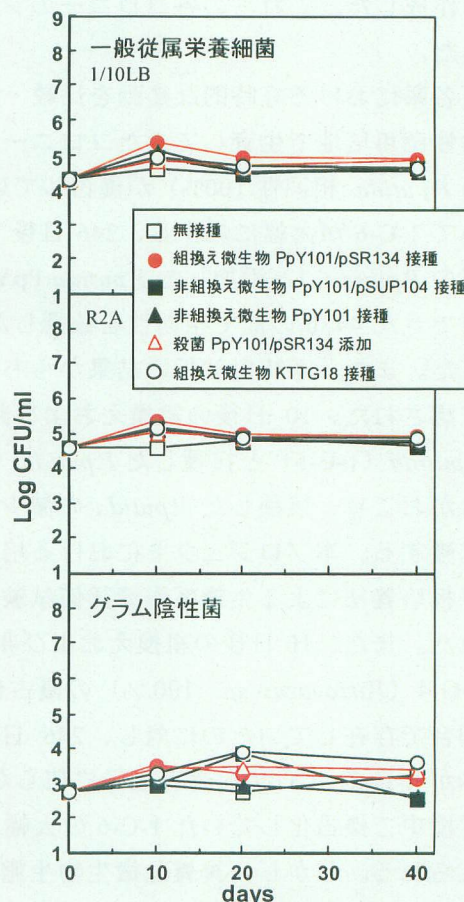


図 12 第 3 回影響評価試験
(各種環境微生物の生菌数への影響)

環境微生物（一般従属栄養細菌）の生菌数を計数した結果、組換えプラスミドおよびゼブラフィッシュ遺体を添加した系を除いて、いずれの微生物を添加した系でも無接種の対照系との大きな違いは認められなかった（図 12）。組換えプラスミドを接種した系では若干の生菌数の増加が認められた。プラスミドは、リン、窒素及び糖類を豊富に含む化合物であることから、環境中の微生物の栄養源となったためであると考えられる。また、ゼブラフィッシュを添加した系では、各遺体が豊富な栄養源となったため、大幅な環境微生物菌数の増加が確認された。しかし、組換えゼブラフィッシュと、非組換えゼブラフィッシュとのマイクロコズムにおいて一般従属栄養細菌数の違いは認められなかった（図 13）。

5. 本研究により得られた成果

これまでの平板培地法等によって環境微生物の菌数を対象として評価していた研究では組換え体接種の影響をほとんど検出できなかった。本研究により微生物群集構造への影響を分子生物学的な手法により詳細に解析した結果、組換え微生物の接種に微生物多様性への影響は、非組換え微生物接種のそれと同等であることが示唆された。しかしながら、培養微生物の接種によって影響を受ける環境微生物の存在が確認された。

さらに、本研究で考案した培養可能な環境微生物の網羅的遺伝子解析法により、影響を受けた微生物の分離に成功した。これらの微生物の研究は、微生物間の相互作用という非常に興味深い内容であるとともに、バイオレメディエーション等において培養微生物を利用する際の影響評価にも役立つものと考えられる。

6. 引用文献

- 1) K. Iwasaki, H. Uchiyama and O. Yagi: Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in aquatic microcosms, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1264-1269 (1993)
- 2) K. Iwasaki, H. Uchiyama and O. Yagi: Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in soil microcosms, *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 156-159 (1994)
- 3) K. Iwasaki, O. Yagi, Y. Ishibashi and H. Seto: Survival and effect of genetically engineered *Pseudomonas putida* in the soil environment, *Environ. Sci.* 13, 483-489 (2000)
- 4) G. Muyzer, A. Teske, C. O. Wirsen, H. W. Jannasch: Phylogenetic relationship of

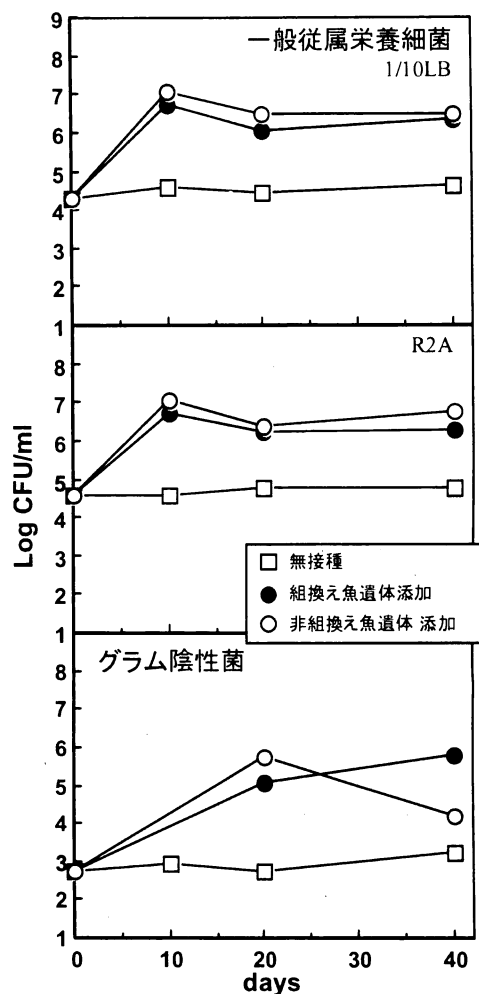


図 13 第 3 回影響評価試験
(各種環境微生物の生菌数への影響)

Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragment. *Arch Microbiol.* 164, 165-172 (1995)

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項は無い。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文>

①岩崎一弘、矢木修身：遺伝子組換え微生物の第一種利用における安全性評価、環境バイオテクノロジー学会誌（印刷中）

<その他の紙上発表>

①田部井豊、日野明寛、矢木修身：新しい遺伝子組換え体の安全性評価システムガイドブック、エヌ・ティー・エス、435-443（2005）

「第5章商品化されている遺伝子組換え体と将来 3. 環境利用（執筆担当：矢木修身、岩崎一弘）」

②岩崎一弘、奥田喜弘、矢木修身：農業および園芸、80, 1, 185-190（2005）

「微生物間の遺伝子伝達」

(2) 口頭発表

①岩崎一弘、中杉奈央、大橋美保、矢木修身、原田貴浩、中島睦安：第38回日本水環境学会年会（2004）

「霞ヶ浦湖水における組換え微生物の生態系影響評価」

②岩崎一弘、米良信昭、矢木修身、原田貴浩、内山裕夫：環境バイオテクノロジー学会第22回年会（2004）

「組換え微生物の微生物多様性への影響評価」

③矢木修身、奥田喜弘、栗栖太、岩崎一弘：第20回日本微生物生態学会（2004）

「生物多様性に及ぼす組換え生物の影響評価プロジェクトの概要」

④岩崎一弘、村上達也、岡田光正、原田貴浩、内山裕夫、矢木修身：第39回日本水環境学会年会（2005）

「分子生物学的手法による組換え微生物の微生物生態系影響評価試験」

⑤岩崎一弘、矢木修身：日本農芸化学会2005年度大会（2005）

「環境省による組換え体の生物多様性影響評価研究プロジェクト」

⑥原田貴浩、岩崎一弘、内山裕夫、村上達也、岡田光正、矢木修身：日本農芸化学会2005年度大会（2005）

「遺伝子組換え微生物の微生物多様性への影響評価」

⑦岩崎一弘、大橋美保、中杉奈央、矢木修身：バイオテクノロジー学会2005年度大会（2005）

「不法投棄汚染修復サイトの微生物群集構造解析」

⑧米良信昭、岩崎一弘：バイオテクノロジー学会2005年度大会（2005）

「塩化第二水銀およびトリクロロエチレンの及ぼす土壌微生物生態系への影響評価」

⑨奥田喜弘、栗栖太、矢木修身、岩崎一弘、木本健一郎、砂入道夫、中嶋睦安：バイオテクノロジー学会 2005 年度大会（2005）「*Pseudomonas* 属及び湖沼水中の細菌のプラスミド DNA 取り込み頻度」

⑩岩崎一弘、原田貴浩、内山裕夫、村上達也、矢木修身：バイオテクノロジー学会 2005 年度大会（2005）

「環境省地球環境研究推進費で実施している組換え微生物の影響評価試験」

⑪奥田喜弘、栗栖太、矢木修身、岩崎一弘：第 21 回日本微生物生態学会（2005）

「湖沼水中微生物へのプラスミド伝達」

⑫岩崎一弘、原田貴浩、内山裕夫、矢木修身：第 21 回日本微生物生態学会（2005）

「微生物多様性に及ぼす組換え微生物の影響」

⑬岩崎一弘、山岡紘子、中嶋睦安、矢木修身：第 40 回日本水環境学会年会（2006）

「培養可能な微生物群集の遺伝子解析による組換え微生物の影響評価」

⑭原田貴浩、岩崎一弘、内山裕夫、矢木修身：日本農芸化学会 2006 年度大会（2006）

「遺伝子組換え *Pseudomonas* 属細菌による微生物多様性への影響評価に関する研究」

⑮K. Iwasaki & O. Yagi: International Symposium on Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany, 2006

“Evaluation of the impact of genetically engineered microorganisms on microbial biodiversity”

（アブストラクト提出済み）

（３）出願特許

なし

（４）シンポジウム・セミナーの開催

なし

（５）一般への公表・報道等

なし

９．成果の政策的な寄与・貢献について

組換え微生物の野外利用ならびにその影響評価に関しては、環境浄化をはじめとして幅広い分野で注目されつつあり、各省で生物多様性影響評価に関する検討会が組織されている。現在、委員となっている農林水産省・環境省生物多様性影響評価検討会、厚生労働省厚生科学審議会技術部会遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会、独立行政法人医薬品医療機器総合機構専門委員会において、組換え微生物の微生物多様性への影響評価に関する本研究の成果を元に意見を述べていく。こうした各省検討会等への参画を通じて本研究の成果の政策的な貢献に努める。