

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

③ 導入遺伝子の挙動解明と微生物多様性に及ぼす影響に関する研究

東京大学大学院 工学系研究科附属水環境制御研究センター 矢木修身・栗栖太・奥田喜弘

平成 15～17 年度合計予算額 36,829 千円

(うち、平成 17 年度予算額 11,389 千円)

※上記の予算額には、間接経費 8,499 千円を含む

[要旨]

組換え菌の使用により環境中に組換え遺伝子が放出された際に、環境中の細菌に組換え遺伝子が取り込まれるリスクを評価するため、環境中での細菌によるプラスミド取り込みの頻度について研究を行った。平成 15 年・16 年は合成培地における純粋培養菌株のプラスミド取り込みについて検討した。高 Mg^{2+} 濃度条件 (10mM～100mM) において *P. aeruginosa* と *P. alcaligenes* でプラスミドの取り込みが観察され、その頻度は 10^{-8} 程度であった。このフィルター上でのプラスミド取り込みは、 Mg^{2+} 濃度が高いほど、また添加したプラスミド DNA 量が多いほど高頻度になった。また、静置した液体中でもプラスミドの取り込みは観察されたが、その頻度はフィルター上よりも低くなった。平成 17 年度は 7 月 20 日と 10 月 6 日に不忍池から、11 月 9 日に霞ヶ浦から採取した試料水中の細菌を遠心分離によって濃縮し、プラスミド pSR134 を添加して自然水中の細菌によるプラスミドの取り込みを検討した。 10^{-6} ～ 10^{-7} の頻度で形質転換体が検出された。細菌の濃縮度合いや pSR134 添加量を変えても pSR134 の取り込み頻度はほとんど変化しなかったが、細菌の濃縮度合いによって pSR134 を取り込む細菌種には変化が見られた。単離された 96 クローンの形質転換体から 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定したところ、これらは 14 種の細菌に帰属された。これらのうち 84 がプロテオバクテリアであり、そのうちの 33 が *Labrys methylaminiphilus*、23 が *Dyella yeojuensis*、16 が *Stenotrophomonas maltophilia* に近縁の細菌であった。これらの 3 種の細菌に近縁な形質転換体で全体の 75% を占めていた。また、*Pseudomonas putida* PpY101/pSR134 から霞ヶ浦試料水中の細菌への自然水中でのプラスミド伝達についても検討を行ったが、今回の実験条件ではプラスミドの伝達は検出できなかった。さらに、東京大学農学部より採取した土壌試料に pSR134 または *P. putida* PpY101/pSR134 を添加し、土壌中の細菌によるプラスミドの取り込みを検討した。こちらについても、今回の実験条件ではいずれの条件においてもプラスミドの取り込み・伝達は検出されなかった。

[キーワード]

プラスミド、遺伝子の水平伝達、抗生物質耐性遺伝子、水銀化合物分解酵素遺伝子群、*Pseudomonas putida*

1. はじめに

一般に組み換え微生物を検出するマーカーとして抗生物質耐性遺伝子が用いられているが、抗生物質耐性遺伝子が有害微生物に水平移行し抗生物質耐性になることが懸念されている。また導入した遺伝子の挙動についても不明な点が多い。理想的には導入遺伝子が移行しないことが望まれる。本研究では、水環境および土壌環境中における水銀還元酵素遺伝子および抗生物質耐性遺伝子の脱落頻度、他の微生物への水平移行の有無および頻度、水平移行に及ぼす環境要因の影響、水平移行のメカニズム、水平移行の制御法について検討する。

2. 研究目的

水環境および土壌環境中における遺伝子組み換え微生物中の水銀還元酵素遺伝子および抗生物質耐性遺伝子の脱落頻度、他の微生物への水平移行の有無および頻度、水平移行に及ぼす環境要因の影響、水平移行のメカニズム、水平移行の制御法について明らかにする。

3. 研究方法

(1) プラスミド pSR134

細菌によるプラスミド取り込み実験に使用するプラスミドとしてプラスミド NR1 の水銀化合物分解酵素遺伝子群 (*mer* オペロン) を広宿主域ベクター pSUP104 に挿入して作成したプラスミド pSR134¹⁾ を用いた。プラスミド NR1 の *mer* オペロンは塩化第二水銀を金属水銀に還元する代謝に関与し、6 個の遺伝子 *merRTPCAD*²⁻⁵⁾ からなる。調節遺伝子である *merR* は Hg^{2+} 非存在下では *mer* オペロンの発現を負に、 Hg^{2+} 存在下では *mer* オペロンの発現を正に制御している。*merT* 及び *merP* の産物である MerP 及び MerT は、それぞれ独立して Hg^{2+} の輸送機能を持ち、MerT は内膜に、MerP はペリプラズムに局在している。*merA* は Hg^{2+} を Hg^0 に還元する水銀還元酵素をコードしている。*merC* 及び *merD* の機能についてはまだ明らかではないが、*merC* の産物である MerC は Hg^{2+} の輸送機能に、*merD* は調節遺伝子として *mer* オペロンの発現に関与していると考えられる。この *mer* オペロンは、プラスミド NR1 を制限酵素 *EcoRI* で切断した際得られる H (4.9kb) 及び I 断片 (4.2kb) に含まれる。プラスミド pSR134 は、プラスミド NR1 を制限酵素 *EcoRI* で切断し、得られた *mer* オペロンを含む DNA 断片 (9.1kb : H+I 断片) を広宿主域ベクター pSUP104 (9.5kb) の *EcoRI* 切断部位に挿入して作成された。従ってプラスミド pSR134 は、塩化第二水銀及びベクター由来のテトラサイクリン耐性をコードしている。また、本プラスミドは単独では伝達性を持たないが、伝達性プラスミドを保持する微生物が共存することで伝達性を示すことが知られている⁶⁾。今回使用した pSR134 は、LB 培地で培養した *E. coli* HB101/pSR134 からアルカリ-SDS 法により抽出後、フェノール-クロロホルム法により精製し、アガロースゲル電気泳動の泳動像より濃度を決定した。

(2) 使用した微生物

① 細菌株

細胞間接触によるプラスミド伝達実験のプラスミド供与菌としてエレクトロポレーション法によりプラスミド pSR134 を導入した *P. putida* PpY101/pSR134¹⁾、受容菌として *E. coli* HB101、*P. aeruginosa* PA01、*P. stutzeri* IF03773、*P. cepacia* IF0 14598、*P. alcaligenes* ATCC14909 を用いた。受容菌として用いた 5 菌株は M9 培地で生育可能である (ただし、*E. coli* HB101 のみプロリン・ロイシン・チ

アミンを添加)。そのためプラスミド伝達実験により生じた形質転換体を M9 培地で生育させることにより、M9 培地では生育できない *P. putida* PpY101/pSR134 を排除することが可能である。

プラスミド pSR134 による形質転換実験の受容菌としては上記の受容菌 5 株に加えて、M9 培地では生育できない *P. putida* PpY101、*P. syringae* IF0 3508、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 の合計 8 株を使用した。

これらの受容菌株は、フリーズストックを LB 培地に植菌し定常期まで生育 (600 nm の吸光度で確認) させた後ただちに、あるいは 4℃で保存した後で受容菌として使用した。供与菌株については、LB 培地にて対数増殖期まで生育させた後ただちに実験に使用した。

霞ヶ浦より採取した試料水に添加した *P. putida* PpY101/PsR134 は、LB 培養液を遠心分離 (10,000 rpm, 5min) し、ペレットを 0.16% KCl+0.54% NaCl 水溶液で懸濁・洗浄の後再度遠心分離し、1 ml の 0.16% KCl+0.54% NaCl 水溶液に懸濁した。この菌液を、平板培養法で生菌数を計数して実験に使用した。

② 自然水試料中の細菌の濃縮

以下の操作において、沈殿画分の懸濁には ADVANTEC DISMIC-25CS Cellulose Acetate 0.20 μ m フィルターで濾過した試料水を用いた。試料水中の細菌の 100 倍・1000 倍濃縮については、まず試料水を 500 ml 遠心チューブで遠心分離 (12000 x g, 4℃, 20 分) し、沈殿をおよそ 100 ml の遠心上清に懸濁して前濃縮液を調製した。10 倍濃縮の場合は試料水を、100 倍・1000 倍濃縮の場合は上記の前濃縮液を 50 ml 遠心チューブで低速で遠心分離 (26 x g, 4℃, 10 分) してゴミなどを沈殿させ、細菌画分である上清を駒込ピペットを用いて静かに分取した。残った沈殿画分はフィルター濾過した試料水に懸濁後、低速遠心分離後に遠心上清を分取して沈殿画分に巻き込まれた細菌を回収した。この沈殿画分から細菌を回収する操作を 10 倍濃縮の場合は 1 回、100 倍・1000 倍濃縮の場合は 3 回行い、得られた遠心上清をまとめて 50 ml 遠心チューブで遠心分離 (6600 x g, 4℃, 20 分) し、10 倍濃縮の場合は濃縮開始時の試料水液量の 1/10 倍量、100 倍濃縮の場合は 1/100 倍量、1000 倍濃縮の場合は 1/1000 倍量のフィルター濾過した試料水で沈殿を懸濁して細菌濃縮液を得た。

(3) 使用した培地

純粋培養した細菌でのプラスミド取り込み実験に用いるプラスミド受容菌の培養には LB 培地 (1L あたりトリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 10 g) を使用した。

pSR134 の調製に用いる *E. coli* HB101/pSR134 とプラスミド供与菌として用いる *P. putida* PpY101/pSR134 の培養にはテトラサイクリン 40 μ g/ml を添加した LB 培地を用いた。

純粋培養した細菌でのプラスミド取り込み実験でプラスミド取り込みに影響する環境要因を調べるため、完全合成培地である M9 寒天培地 (表 1) や、M9 培地の成分のうち、炭素源・リン酸濃度・アンモニウム塩濃度・カルシウム塩濃度・マグネシウム塩濃度を変化させた寒天培地 (表 2-6) を用いた。

表 1 M9 寒天培地組成 (1 L 当たり)

Na ₂ HPO ₄	6 g	
KH ₂ PO ₄	3 g	
NaCl	0.5 g	
NH ₄ Cl	1 g	
MgSO ₄	120 mg (1 mM)	オートクレーブ後に添加
CaCl ₂	11 mg (0.1 mM)	オートクレーブ後に添加
グルコース	4 g	オートクレーブ後に 40%水溶液を添加
寒天	15 g	他と別にオートクレーブし、オートクレーブ後に添加

表 2 M9 寒天培地の炭素源変更 (M9 培地の炭素源であるグルコースの代わりに加えた成分について、1 L 当たり)

炭素源	グルコース (M9)	グリセロール	ピルビン酸 Na	酢酸 Na
添加量	4 g	4 g	4 g	4 g

表 3 M9 寒天培地のリン酸塩濃度変更 (M9 培地から変更された成分についてのみ、1 L 当たり)

変更された成分	M9	10 ⁻³ 倍
Na ₂ HPO ₄	6000 mg	6 mg
KH ₂ PO ₄	3000 mg	3 mg
NaCl	500 mg	5430 mg
KCl	0	1640 mg

表 4 M9 寒天培地のアンモニウム塩濃度変更 (M9 培地から変更された成分についてのみ、1 L 当たり)

変更された成分	M9	10 ⁻³ 倍
NH ₄ Cl	1000 mg	1 mg

表 5 M9 寒天培地のカルシウム塩濃度変更 (M9 培地から変更された成分についてのみ、1 L 当たり)

変更された成分	M9	10×Ca	100×Ca
CaCl ₂	11 mg (0.1 mM)	110 mg (1 mM)	1100 mg (10 mM)

表 6 M9 寒天培地のマグネシウム塩濃度変更 (M9 培地から変更された成分についてのみ、1 L 当たり)

変更された成分	M9	10×Mg	100×Mg
MgSO ₄	0.12 g (1 mM)	1.2 g (10 mM)	12 g (100 mM)

自然水中の細菌を用いたプラスミド取り込み実験における総細菌数の計数には 1/10 nutrient agar (1L あたり肉エキス 0.3 g、ペプトン 0.5 g、寒天 1.5g) を用いた。

自然水中の細菌を用いたプラスミド取り込み実験におけるグラム陰性菌数の計数にはクリスタルバ イオレット 5 µg/ml を添加した 1/10 nutrient agar を用いた。

自然水中の細菌を用いたプラスミド取り込み実験にて単離した形質転換体の培養には nutrient broth (1L あたり肉エキス 3 g、ペプトン 5 g) を用いた。

プラスミド供与菌として *P. putida* PpY101/pSR134 を自然水中に添加した実験系では、プラスミド 供与菌の増殖を妨げるための改変 M9 寒天培地 (1L あたり Wolfe' s ビタミン溶液 (ビオチン 2.0 mg、葉酸 2.0 mg、ピリドキシン塩酸塩 10.0 mg、チアミン塩酸 5.0 mg、リボフラビン 5.0 mg、ニコチン 酸 5.0 mg、D-(+)パントテン酸カルシウム 5.0 mg、ビタミン B12 0.1 mg、p-アミノ安息香酸 5.0 mg、チオクト酸 5.0 mg) 100 ml、無機塩溶液 (1L あたり MnSO₄·5H₂O 60 mg、H₃BO₃ 5 mg、ZnSO₄·7H₂O 10

mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 mg、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mg) 100 ml、アミノ酸溶液 (1L あたり Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr それぞれ 200 mg) 100 ml を添加した M9 寒天培地を用いた。また、 HgCl_2 -テトラサイクリン耐性菌の検出にはテトラサイクリン 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 1/10 nutrient agar、クリスタルバイオレット添加 1/10 nutrient agar または改変 M9 培地 (シャーレ 1 枚あたり約 20 ml) にテトラサイクリン 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 μM HgCl_2 を添加した同じ培地を重層した寒天培地を用いた。

(4) 形質転換

① 純粋培養した細菌株の合成寒天培地に置いたフィルター上での形質転換

プラスミド pSR134 による形質転換実験の受容菌として、M9 培地で生育可能な *E. coli* HB101、*P. aeruginosa* PA01、*P. stutzeri* IF03773、*P. cepacia* IF0 14598、*P. alcaligenes* ATCC14909 と M9 培地では生育できない *P. putida* PpY101、*P. syringae* IF0 3508、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 の合計 8 株を用いた。

これらの受容菌株は、LB 培地にて定常期まで培養した後 4℃ で 2 日間保存した受容菌培養液 0.2 ml を遠心分離し、上清を除去した。細胞を滅菌した塩水 (0.16% KCl + 0.54% NaCl 水溶液) に懸濁して洗浄し、再度遠心した後、1 μg のプラスミド pSR134 を含む塩水 30 μl に懸濁した。この細胞懸濁液を伝達条件検討用の寒天培地 (表 4-8) 上に置いたメンブレンフィルター (0.45 μm HA, ミリポア) 上に滴下し、25℃ で 18 時間インキュベートして受容菌細胞にプラスミドを取り込ませた。プレート上のメンブレンフィルターをエッペンドルフチューブ中に移し、フィルター上の細胞を滅菌した塩水 400 μl に懸濁した。細胞懸濁液を新しいチューブに移した後、フィルターに残った細胞を塩水 200 μl で再度懸濁し、この懸濁液を最初の懸濁液に加えた。この細胞懸濁液を遠心分離して上清を除去することでプラスミドを除去し、沈殿した細胞は LB 培地 100 μl に懸濁した。この懸濁液のうち 10 μl を 100 倍段階希釈して LB プレートに塗布し、生菌数を計数した。また、懸濁液のうち 90 μl は、受容菌が *E. coli* HB101、*P. syringae* IF0 3508 の場合は 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含む LB プレートに塗布した。一方受容菌が *P. aeruginosa* PA01、*P. stutzeri* IF03773、*P. putida* PpY101、*P. cepacia* IF0 14598、*P. alcaligenes* ATCC14909、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 の場合は、懸濁液に終濃度 10 μM の塩化第二水銀を加えて 25℃ で 2 時間インキュベートした後、0.6% 寒天・100 μM 塩化第二水銀・20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含む LB 培地 710 μl を加え、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含む LB プレートに重層した。プレートは 25℃ で 3 日間インキュベートし、生じたコロニーを計数した (図 1)。得られた生菌数と塩化第二水銀・テトラサイクリン二重耐性菌数の値から形質転換頻度を算出した。また、一部のコロニーは 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含む LB 培地で培養し、プラスミド pSR134 を保持していることを確認した。

また、添加するプラスミド pSR134 の量を 0.1 μg 、1 μg 、10 μg と変化させて同様の実験を行った。

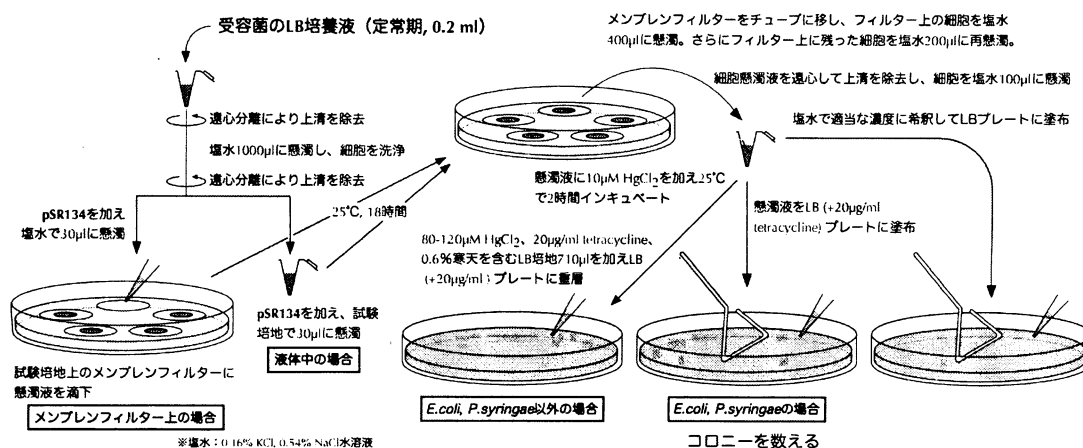


図 1 メンブレンフィルター上と液体中でのプラスミド取り込み試験操作手順

② 純粋培養した細菌株の液体合成培地中での形質転換

定常期まで培養した後 4°C で 2 日間保存した受容菌培養液 0.2 ml を遠心分離し、上清を除去した。細胞を滅菌した塩水（0.16% KCl + 0.54% NaCl）に懸濁して洗浄し、再度遠心分離した後、1 μg のプラスミド pSR134 を含む伝達条件検討用の培地 30 μl に懸濁した。この細胞懸濁液を 25°C で 18 時間静置して受容菌細胞にプラスミドを取り込ませた。18 時間後、懸濁液に塩水 400 μl を加えて遠心し、沈殿した細胞を 100 μl の LB 培地に懸濁した。これ以降の操作は、フィルター上の場合と同様に行った（図 1）。

また、プラスミドと受容菌の接触時間と形質転換頻度の関係を知るため、プラスミド取り込みのためのインキュベーション時間のみを 1 時間・6 時間・24 時間と変化した条件で同様の実験を行った。

③ 純粋培養した細菌細胞の接触による合成培地上でのプラスミド伝達

定常期まで培養した後 4°C で 2 日間保存した受容菌培養液 0.1 ml と対数期まで培養した供与菌培養液 0.1 ml をエッペンドルフチューブ中で混合し、遠心分離により上清を除去した。滅菌した塩水（0.16% KCl + 0.54% NaCl）に懸濁して細胞を洗浄し、再度遠心した後、沈殿した細胞を塩水 30 μl に懸濁して伝達条件検討用の寒天培地（表 4-8）上に置いたメンブレンフィルター（0.45 μm HA, ミリポア）上に滴下し、25°C で 18 時間インキュベートして受容菌にプラスミドを取り込ませた。プレート上のメンブレンフィルターをエッペンドルフチューブ中に移し、フィルター上の細胞を滅菌した 400 μl の塩水に懸濁した。細胞懸濁液を新しいチューブに移した後、フィルターに残った細胞を 200 μl の塩水で再度懸濁し、この懸濁液を最初の懸濁液に加えた。この細胞懸濁液を遠心分離し、沈殿した細胞を M9 培地 100 μl に懸濁した。この懸濁液のうち 10 μl を 100 倍段階希釈して M9 プレートに塗布し、生菌数を計数した。また、懸濁液のうち 90 μl は、受容菌が *E. coli* HB101 の場合は 20 μg/ml テトラサイクリンを含む M9 プレートに塗布した。一方受容菌が *P. aeruginosa* PA01、*P. stutzeri* IF03773、*P. cepacia* IF0 14598、*P. alcaligenes* ATCC14909 の場合は、懸濁液に 10 μM 塩化第二水銀・0.5 mM メルカプト酢酸ナトリウムを加えて 25°C で 2 時間インキュベートした後、0.6% 寒天・100 μM 塩化第二水銀・20 μg/ml テトラサイクリン・0.5 mM メルカプト酢酸ナトリウムを含む M9 培地 710 μl を加え、20 μg/ml テトラサイクリンを含む LB プレートに重層した。プレートは 25°C で 3 日間インキュベ

ートし、生じたコロニーを計数した。

④ 一般細菌の自然水中での形質転換

2005 年 7 月 20 日に採取した不忍池表層試料水について以下の操作を行った。試料水 8 L から 1000 倍濃縮菌液 8 ml を調製し、これにプラスミド pSR134 を終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加してシリコン栓で栓をした 100 ml 三角フラスコで室温で振とうした。pSR134 添加から 1、2、3 日後に三角フラスコから試料水を分取し、総細菌数と形質転換体数を計数した（図 2）。

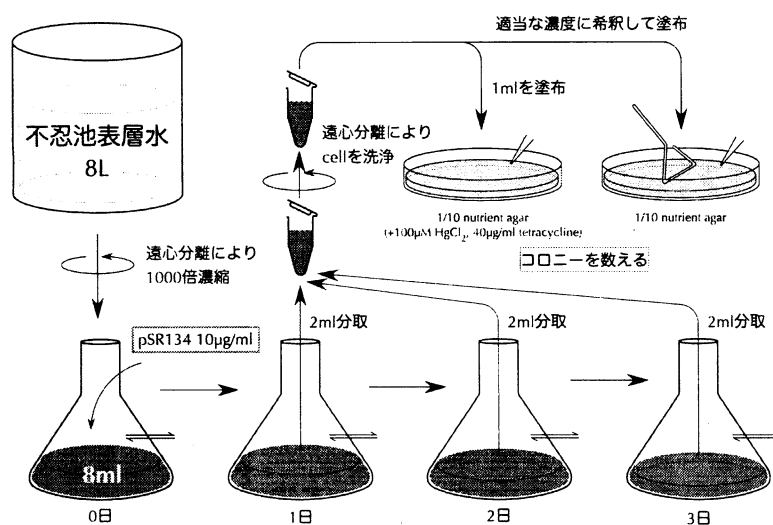


図 2 7 月採水の不忍池表層水中の細菌によるプラスミド取り込み試験操作手順（液体中）

2005 年 10 月 6 日に採取した不忍池表層試料水について以下の操作を行った。試料水から 10、100、1000 倍濃縮液を 8 ml ずつ調製し、これら 3 種類の濃縮液と未処理の試料水原水をそれぞれ 3 本のスクリーキャップつき試験管に 2 ml ずつ分注した。3 本の試験管にはプラスミド pSR134 をそれぞれ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ の 3 種類の濃度で添加し、この 12 本の試験管を室温で振盪した。プラスミド添加から 2 日後に、試料水の総細菌数と形質転換体数を計数した（図 3）。

2005 年 11 月 9 日に採取した霞ヶ浦湖心の表層試料水について図 4 に示す以下の操作を行った。試料水 6 L から 100 倍濃縮液 60 ml を調製し、この濃縮液と未処理の試料水それぞれを 12 ml ずつ 4 本の 100 ml 三角フラスコに分注した。各試料のうち 1 本は無添加、3 本の三角フラスコにはそれぞれ、0.1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134、1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134、 1×10^7 cfu/ml *P. putida* PpY101/pSR134 を添加した。この 8 種類の試料を室温で 10 日間振盪し、1、2、3、10 日目に試料水を分取して総細菌数と形質転換体数を計数した。

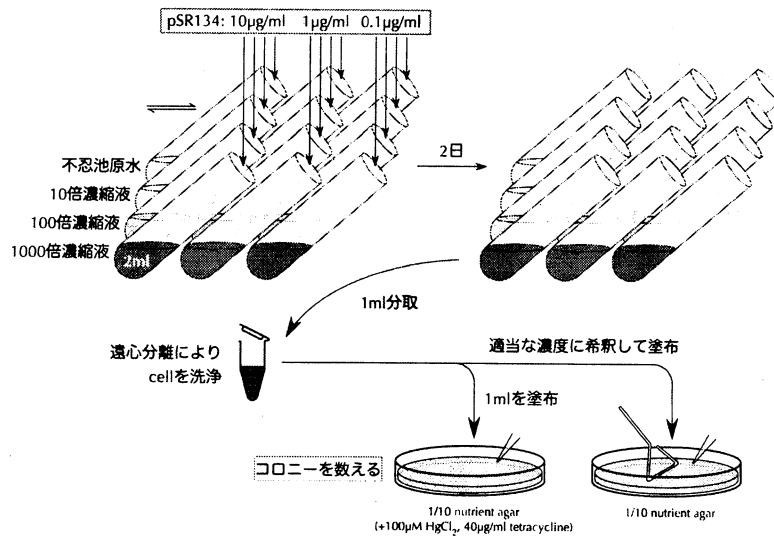


図 3 10 月採水の不忍池表層水中の細菌によるプラスミド取り込み試験操作手順（液体中）

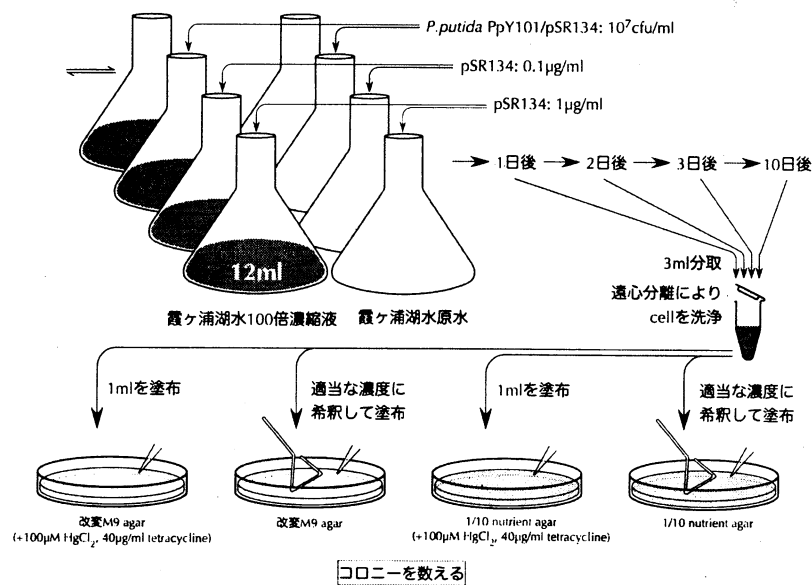


図 4 11 月採水の霞ヶ浦湖心表層水中の細菌によるプラスミド取り込み試験操作手順（液体中）

⑤ 一般細菌のメンブレンフィルター上での形質転換

2005 年 7 月 20 日に採取した不忍池の水から調製した 1000 倍濃縮菌液 750 µl を遠心分離し、沈殿画分を 7.5 µg の pSR134 とともにフィルター濾過した試料水 90 µl に懸濁した。試料水をフィルター濾過した水で作成した寒天プレート上にメンブレンフィルター（0.45 µm HA, 13 mm; ミリポア）3

枚を置き、この懸濁液をメンブレンフィルター1枚につき 30 μ l ずつ滴下して室温でインキュベートした。メンブレンフィルターに滴下してから 1, 2, 3 日後にそれぞれメンブレンフィルター1枚をマイクロチューブに移し、フィルター濾過した試料水 400 μ l でメンブレンフィルター上の細菌を懸濁した。この細菌懸濁液の総細菌数と形質転換体数を計数した (図 5)。

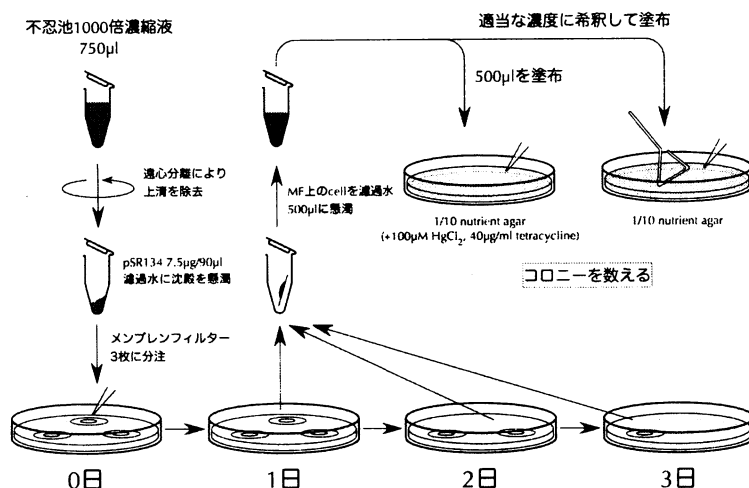


図 5 7 月採水の不忍池表層水中の細菌によるプラスミド取り込み試験操作手順 (メンブレンフィルター上)

⑥ 一般細菌の土壌試料中での形質転換

東京大学農学部の土壌試料を採取し、採取から 1 週間経過した時点で実験に使用した。土壌試料 10 g を 0 μ g、1 μ g、10 μ g の pSR134 または 1.8×10^7 、 1.8×10^8 cfu の *P. putida* PpY101/pSR134 と共に 75 ml バイアル瓶に加えて密封後、激しく振盪攪拌して室温でインキュベートした。1 日後・2 日後に土壌試料 1 g を分取し、10 ml の 0.16% KCl + 0.54% NaCl 水溶液に懸濁した。この懸濁液の上清を分取し、総細菌数と形質転換体数を計数した。

(5) 細菌数の計数

総細菌数は 1/10 nutrient agar を用いて平板培養法により計数した。グラム陰性細菌数は 5 μ g/ml クリスタルバイオレットを含む 1/10 nutrient agar を用いて平板培養法により計数した。改変 M9 培地で生育可能な細菌数は改変 M9 培地を用いて平板培養法により計数した。

(6) 一般細菌の形質転換体の検出

形質転換実験で得られた細菌懸濁液 1 ml をエッペンドルフチューブに分取し、遠心分離 (5000 rpm・5 分) で上清を除去した。沈殿をフィルター濾過した試料水で洗浄し、再度遠心分離 (5000 rpm・5 分) で上清を除去して沈殿を *P. putida* PpY101/pSR134 を添加した系では 10 μ M HgCl₂ と 20 μ g/ml tetracycline を含む改変 M9 培地に、それ以外は 10 μ M HgCl₂ と 20 μ g/ml tetracycline を含む 1/10 nutrient broth に懸濁し、室温で 2 時間静置した。この細菌懸濁液を *P. putida* PpY101/pSR134 を添加した系では耐性菌検出用改変 M9 寒天培地に、それ以外は耐性菌検出用 1/10 nutrient agar に塗

布し、室温で培養して耐性菌のコロニーを形成させた。生じた耐性菌コロニーの一部あるいはすべてに対し KOD -plus- (TOYOBO) を用いて colony-direct PCR を行い、pSR134 の有無を検出した。PCR プライマーには PSR134_2f (5'-ACA ATA GCA AAG GGA TAG GG-3') と PSR134-2r (5'-ACT TTT GGC GAA AAT GAG AC-3') を用いた。

(7) 細菌種の同定

colony-direct PCR により検出した形質転換体は新しい耐性菌検出用 1/10 nutrient agar に植菌してコロニーを形成させ、このコロニーを 3 ml の nutrient broth に植菌し、室温で振盪培養した。この培養液から Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて染色体 DNA を調製し、この染色体 DNA を鋳型として PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子から 5' 側の部分塩基配列を決定した。得られた塩基配列は BLAST 検索により DDBJ/GenBank/EMBL データベースと比較して最も近縁な既知の細菌種を同定した。

4. 結果・考察

(1) 純粋培養した細菌株の合成培地での形質転換

① 合成寒天培地に置いたフィルター上での形質転換：培地条件による変化

P. aeruginosa は Mg^{2+} 存在下で形質転換が促進されることが報告されている⁷⁾。そこで、*E. coli* HB101、*P. aeruginosa* PA01、*P. stutzeri* IF03773、*P. putida* PpY101、*P. cepacia* IF0 14598、*P. syringae* IF0 3508、*P. alcaligenes* ATCC14909、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 の 8 菌株について、1 μ g のプラスミド pSR134 を添加した細菌懸濁液を $MgSO_4$ 濃度を 1 mM, 10 mM, 100 mM とした M9 寒天培地に置いたメンブレンフィルター上に滴下し、形質転換頻度を求めた (図 6A)。その結果、8 菌株のうち *E. coli* HB101、*P. aeruginosa* PA01、*P. alcaligenes* ATCC14909、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 の 4 菌株で形質転換体を得られた。*P. aeruginosa* PA01 と *P. alcaligenes* ATCC14909 でのプラスミドの取り込みは再現性が見られたが、*E. coli* HB101、*P. pseudoalcaligenes* ATCC17440 では再現性がなく、明らかになっていない何らかの条件がこれらの菌株のプラスミド取り込みに影響していると考えられる。

次に、*E. coli* HB101、*P. aeruginosa* PA01、*P. alcaligenes* ATCC14909 について、メンブレンフィルターを置く M9 培地の組成のうち炭素源・リン酸濃度・窒素濃度・ $CaCl_2$ 濃度を変えた培地、1/10 濃度の M9 培地、不忍池の濾過水で作成した寒天プレート、脱イオン水のみで作成した寒天プレートを用いて同様の実験を行った (図 6B)。*E. coli* HB101 ではリン酸濃度を 1/1000 に変更した培地と $CaCl_2$ 濃度を 0.1 mM から 10 mM に変更した培地で、*P. aeruginosa* PA01 では炭素源をグリセロールに変更した培地と $CaCl_2$ 濃度を 0.1 mM から 10 mM に変更した培地で、*P. alcaligenes* ATCC14909 では炭素源をグルコースからグリセロールに変更した培地で形質転換体を得られた。自然環境に近い条件であると考えられる不忍池の濾過水で作成した寒天プレートではいずれの菌株でも形質転換体は得られなかった。

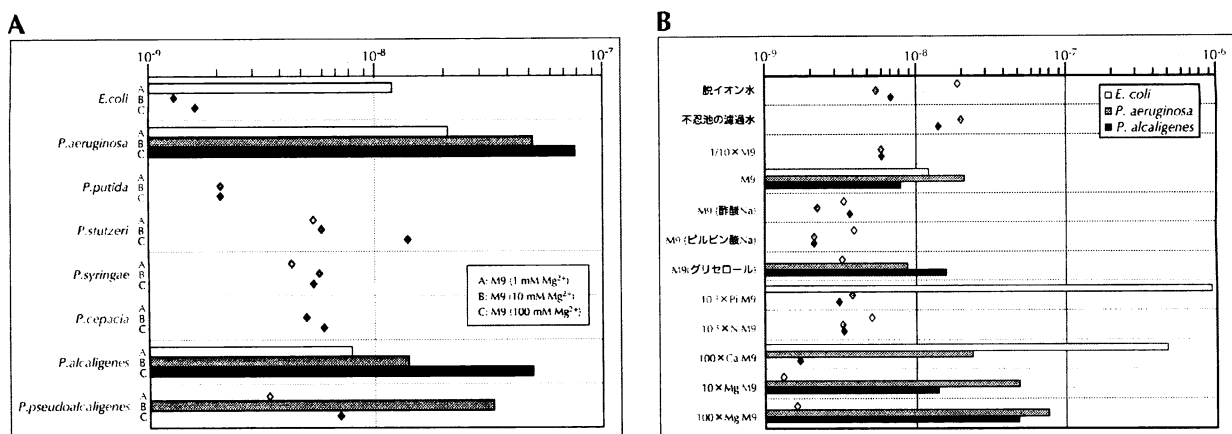


図 6 合成寒天培地に置いたフィルター上での純菌株の形質転換

A. $MgSO_4$ 濃度を 1 mM, 10 mM, 100 mM とした M9 寒天培地に置いたメンブレンフィルター上での 8 菌株の pSR134 による形質転換頻度。形質転換体が検出されなかった条件では検出限界をダイヤモンドで示している。B. 組成の一部を変えた M9 寒天培地に置いたメンブレンフィルター上での *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes* の pSR134 による形質転換頻度。形質転換体が検出されなかった条件では検出限界をダイヤモンドで示している。

② 合成寒天培地に置いたフィルター上での形質転換：マグネシウム塩濃度による変化

P. aeruginosa と *P. alcaligenes* では、 Mg^{2+} 濃度の上昇に伴って遊離のプラスミド取り込み頻度が上昇した。ただし、 $MgSO_4$ 濃度を 100 倍 (1 mM → 100 mM) にしても、形質転換頻度の上昇は 10 倍程度 ($1 \times 10^{-8} \rightarrow 1 \times 10^{-7}$) であった (図 7A)。

③ 合成寒天培地に置いたフィルター上での形質転換：DNA 添加量による変化

Mg^{2+} 濃度を 100 倍にした M9 培地プレートに載せたフィルター上で、添加する DNA 量を 0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g と変化させた場合の *P. aeruginosa* と *P. alcaligenes* の形質転換頻度を測定した (図 7B)。結果から、添加する DNA 量の多い方が形質転換頻度が高くなると考えられるが、添加 DNA 量が 10 μ g の場合以外では形質転換体を得られなかったため、DNA 添加量と形質転換頻度の間の定量的な関係についてははっきりしない。

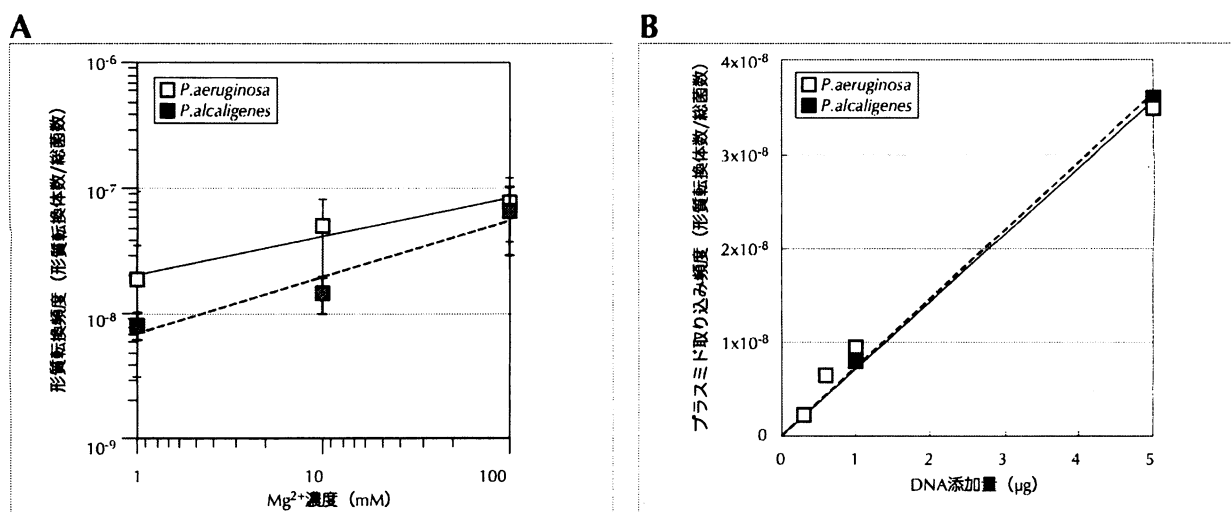


図 7 *P. aeruginosa* と *P. alcaligenes* の形質転換頻度の変化

A. 培地中の Mg^{2+} 濃度に対するメンブレンフィルター上でのプラスミド取り込み頻度。試験培地として $MgSO_4$ 濃度を変えた M9 培地を用いた。B. DNA 添加量に対するメンブレンフィルター上でのプラスミド取り込み頻度。試験培地として M9 培地を用い、メンブレンフィルターに滴下する時の DNA 添加量を変えてプラスミド取り込み頻度を測定した。

(2) 静置した液体培地中での形質転換頻度：フィルター上との比較

液体中での形質転換頻度をメンブレンフィルター上の場合と比較するため、30 μ l の懸濁液中で受容菌にプラスミドを取り込ませた。

静置した液体中でもプラスミドの取り込みは観察された（表 7）が、その形質転換頻度はメンブレンフィルター上でのプラスミド取り込みの 2 割程度であった（表 8）。これは、細胞懸濁液を静置すると細胞が沈殿してしまい、細胞と実際に接触できる DNA 量がフィルター上よりも低くなるためであると考えられる。

表 7 静置した液体中でのプラスミド取り込みによる形質転換頻度

	M9	10 $\times$ Ca (10 μ M Ca^{2+})	10 $\times$ Mg (10 μ M Mg^{2+})	100 $\times$ Mg (100 μ M Mg^{2+})
<i>E. coli</i>		$<1.5 \times 10^{-8}$		
<i>P. aeruginosa</i>	$<2.3 \times 10^{-9}$		1.4×10^{-8} (6)	1.7×10^{-8} (7)
<i>P. alcaligenes</i>	$<3.0 \times 10^{-9}$		2.9×10^{-9} (1)	$<4.5 \times 10^{-9}$
<i>P. pseudoalcaligenes</i>			$<3.0 \times 10^{-8}$	$<3.3 \times 10^{-8}$

括弧内の数値は検出された形質転換体コロニーの数

表 8 フィルター上と静置した液体中でのプラスミド取り込みによる形質転換頻度の比較

		M9 (1 μ M Mg^{2+})	10 $\times$ Mg (10 μ M Mg^{2+})	100 $\times$ Mg (100 μ M Mg^{2+})
<i>P. aeruginosa</i>	フィルター上	4.4×10^{-8} (37)	7.9×10^{-8} (62)	9.7×10^{-8} (125)
	液体中	$<2.3 \times 10^{-9}$	1.4×10^{-8} (6)	1.7×10^{-8} (7)
<i>P. alcaligenes</i>	フィルター上	4.7×10^{-9} (3)	1.9×10^{-8} (7)	8.2×10^{-8} (40)
	液体中	$<3.0 \times 10^{-9}$	2.9×10^{-9} (1)	$<4.5 \times 10^{-9}$

括弧内の数値は検出された形質転換体コロニーの数

(3) 液体培地中での形質転換頻度：経過時間による変化

プラスミドと受容菌の接触時間による形質転換頻度の変化を調べるため、30μl のプラスミド DNA-受容菌懸濁液中でプラスミド DNA と受容菌の接触時間を 1 時間・6 時間・24 時間と変えて形質転換頻度を測定した（表 9）。なお、この実験では DNA-受容菌懸濁液は静置ではなく振盪撹拌した。

形質転換体はプラスミド DNA と受容菌の接触時間が 24 時間の場合のみ検出されたことから、プラスミドの取り込みは受容菌とプラスミドの接触が起こって直ちに生じるのではないと考えられる。

表 9 プラスミドとの接触時間による形質転換頻度の変化

	インキュベート時間		
	1 時間	6 時間	24 時間
<i>P. aeruginosa</i>	$<1.7 \times 10^{-9}$	$<9.5 \times 10^{-10}$	1.6×10^{-8} (9)
<i>P. alcaligenes</i>	$<4.0 \times 10^{-9}$	$<1.6 \times 10^{-9}$	1.3×10^{-8} (6)

括弧内の数値は検出された形質転換体コロニーの数

(4) フィルター上での細胞間接触によるプラスミド伝達頻度

平成 15 年度には、合成培地上においてプラスミド供与菌 *P. putida* PpY101/pSR134 から *Pseudomonas* 属細菌 (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. cepacia*, *P. alcaligenes*) および大腸菌 (*E. coli*) へプラスミド pSR134 が伝達されうるかについて検討し、細菌の種類や環境条件によってはプラスミド DNA が伝達されることを確認した。

平成 16 年度は、このプラスミド伝達の頻度を、*P. putida* PpY101/pSR134 と受容菌株の混合液を寒天培地に置いたメンブレンフィルター上に滴下し 18 時間 25℃でインキュベートした後のテトラサイクリン-HgCl₂ 耐性コロニーを計数することで調べた。受容菌株が *E. coli* HB101 の場合はプラスミド伝達は検出されなかった（表 10）。他の受容菌株 (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. cepacia*, *P. alcaligenes*) の場合、受容菌コロニーの他に M9 培地では生育できないプラスミド供与菌と考えられるコロニーが生育してしまい、受容菌の形質転換体のみを計数することができなかった。プラスミド供与菌である *P. putida* PpY101/pSR134 はメチオニン要求性の株であるが、おそらく受容菌が共存することでメチオニンが供給されて M9 培地で生育できたと考えられる。

表 10 *P. putida* PpY101/pSR134 から *E. coli* HB101 へのプラスミド伝達頻度

	水	M9 培地	炭素源変更			リン酸濃度	窒素濃度	Ca ²⁺ 濃度変更		Mg ²⁺ 濃度変更	
			酢酸 Na	ピルビン酸 Na	グリセロール			10 倍	100 倍	10 倍	100 倍
<i>E. coli</i>	$<2.7 \times 10^{-8}$	$<6.9 \times 10^{-9}$	$<5.2 \times 10^{-9}$	$<6.2 \times 10^{-9}$	$<6.3 \times 10^{-9}$	$<6.7 \times 10^{-7}$	$<7.4 \times 10^{-8}$	$<8.2 \times 10^{-9}$	$<4.1 \times 10^{-9}$	$<2.9 \times 10^{-9}$	$<3.8 \times 10^{-9}$

(5) 一般細菌の自然水中での形質転換

① 7 月 20 日に不忍池より採取した試料水中の細菌による形質転換

2005 年 7 月 20 日に不忍池より採取した試料水の 1000 倍濃縮菌液 (6.3×10^6 cfu/ml) 8ml にプラスミド pSR134 を 10μg/ml 添加して三角フラスコ中で 3 日間振盪した。3 日間の総細菌数と pSR134 を取り込んだ形質転換体数の経時変化を図 8、検出された形質転換体の細菌種と形質転換頻度を表 11 に示した。

総細菌数は pSR134 添加から 3 日で 120 倍に増加したが、一方で形質転換体数・形質転換頻度は 2 日目に最大 (4.6×10^{-6}) となり、3 日目には減少した。また、単離した形質転換体 39 コロニーから決定した塩基配列より 7 つのユニークな塩基配列 A1, A3, F, G, I が得られ、BLAST 検索により最も近縁な細菌種を同定した (表 11・表 16)。検出された形質転換体の細菌種から、pSR134 添加からの経過時間により形質転換体の細菌種の組成が変化していることがわかる。形質転換体の細菌種の組成の変化は、懸濁液中のプラスミド取り込み能を持った細菌種の量と各細菌種のプラスミドの取り込み頻度、そして生じた形質転換体の安定性により決定されると考えられる。今回の実験では懸濁液中の細菌種の組成や各 pSR134 取り込み細菌のプラスミド取り込み頻度は決定していないが、形質転換体の安定性については 2 日目から 3 日目の間の形質転換体の残存率を見ると F では 74% ($230 \rightarrow 170$ cfu/ml)、I では 18% ($230 \rightarrow 42$ cfu/ml)、A1 では 7.8% ($740 \rightarrow 58$ cfu/ml) というように細菌種によって異なっていることがわかる。

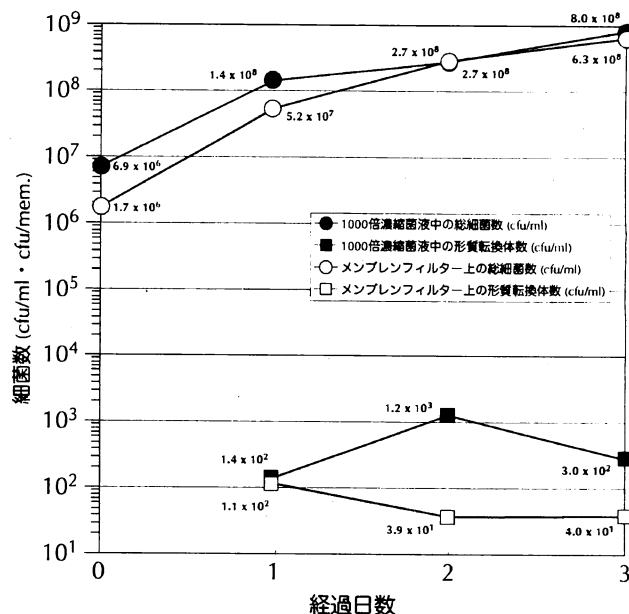


図 8 pSR134 添加後の細菌数の変化
1000 倍濃縮菌液中とメンブレンフィルター上での pSR134 添加後 3 日間の総細菌数・形質転換体数の推移。

表 11 7 月の不忍池試料水 1000 倍濃縮菌液に pSR134 を添加後 3 日間の形質転換体数・形質転換頻度

経過日数	検出された形質転換体数 (検出数 (コロニー) / 推定される形質転換体数 (cfu/ml))						形質転換頻度
	A1	A3	F	G	I	未同定	
1	-	1 / 47 (33%)	1 / 47 (33%)	-	-	1 / 47 (33%)	1.0×10^{-6}
2	10 / 740 (45%)	-	3 / 230 (14%)	-	3 / 230 (14%)	6 / 460 (27%)	4.6×10^{-6}
3	4 / 58 (16%)	1 / 14 (4%)	12 / 170 (48%)	1 / 14 (4%)	3 / 42 (12%)	4 / 56 (16%)	3.7×10^{-7}

また、液体中と固体表面上でのプラスミド取り込み頻度の違いを検討するため、同じ 1000 倍濃縮菌液 250 μ l (1.6×10^6 cfu) を 2.5 μ g のプラスミド pSR134 と共にメンブレンフィルター上に滴下し、室温で 3 日間静置した。3 日間の総細菌数と pSR134 を取り込んだ形質転換体数の経時変化を図 8、検出された形質転換体の細菌種と形質転換頻度を表 12 に示した。

表 12 7 月の不忍池試料水 1000 倍濃縮菌液をメンブレンフィルターに滴下後 3 日間の形質転換体数・形質転換頻度

経過日数 (日)	検出された形質転換体数 (検出数 (コロニー) / 推定される形質転換体数 (cfu/ml))						形質転換頻度
	A1	A2	F	H	I	未同定	
1	1 / 12 (11%)	1 / 12 (11%)	1 / 12 (11%)	-	-	6 / 74 (67%)	2.2×10^{-6}
2	-	-	1 / 8 (20%)	-	1 / 8 (20%)	3 / 22 (60%)	1.4×10^{-7}
3	2 / 16 (33%)	-	2 / 16 (33%)	1 / 8 (17%)	-	1 / 8 (17%)	7.8×10^{-8}

総細菌数はメンブレンフィルターに滴下してから3日で370倍に増加した。一方形質転換体数・形質転換頻度は1日目に最大 (2.2×10^{-6}) となり、その後は減少した。また、単離した形質転換体10コロニーから決定した塩基配列より7つのユニークな塩基配列A1, A2, F, H, Iが得られ、BLAST検索により最も近縁な細菌種を同定した(表12・表16)。

表11・表12より、3日間での最大のプラスミド取り込み頻度は液体中とメンブレンフィルター上のどちらも同程度であったが、液体中では2日目に、メンブレンフィルター上では1日目に最大になったことを示している。これは、メンブレンフィルター上でのpSR134の消費速度が液体中よりも早いためであると考えられる。また、両条件において同じ細菌種が検出され、液体中とメンブレンフィルター上の条件の違いによってプラスミドを取り込む細菌種が変化することはなかった。

② 10月6日に不忍池より採取した試料水中の細菌によるpSR134の取り込み

7月に採取した試料水を用いた1000倍濃縮液に10 µg/ml pSR134を添加した実験系では、2日目に見かけのプラスミド取り込み頻度が最大になった。しかし、非常に高濃度の細菌密度であったこと、大量のpSR134添加により総細菌数が3日間で130倍に増加したことの二点が自然環境と大きく異なる条件であった。より自然環境に近い条件でのpSR134の取り込みが検出できる実験条件を模索するため、2005年10月6日に採取した不忍池の水とプラスミドpSR134を用いてプラスミド添加から2日後の細菌濃度・プラスミド添加量とプラスミド取り込み頻度の関係を調べた。水中の細菌の濃縮率を1倍(試料水原水、 4.3×10^4 cfu/ml)・10倍(1.4×10^5 cfu/ml)・100倍(5.9×10^5 cfu/ml)・1000倍(7.7×10^6 cfu/ml)、プラスミド添加量を0.1 µg/ml・1 µg/ml・10 µg/mlとした12種類の試料2 mlををねじ口試験管で2日間振盪し、総細菌数と形質転換体数を計数した。また、すべての形質転換体について16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を決定して細菌種を同定した(表13)。

表13 不忍池試料水(10月)濃縮液にpSR134を添加後2日目の形質転換体数・形質転換頻度

細菌濃縮液 (cfu/ml)	pSR134 添加 量 (μg/ml)	検出された形質転換体の 16S rDNA									形質転換頻 度
		F	A3	C	G	J	D	B	E	未同定	
1 倍 (原水)	0.1										< 1.9 x 10 ⁻⁶
4.3 x 10 ⁴	1										< 1.3 x 10 ⁻⁶
	10	1								1	5.0 x 10 ⁻⁷
10 倍	0.1										< 1.6 x 10 ⁻⁶
1.4 x 10 ⁵	1	2	2								6.8 x 10 ⁻⁷
	10		1	1							4.0 x 10 ⁻⁷
100 倍	0.1		5		2						4.5 x 10 ⁻⁶
5.9 x 10 ⁵	1		2		6						4.4 x 10 ⁻⁷
	10		3		2						1.8 x 10 ⁻⁷
1000 倍	0.1				2					1	5.3 x 10 ⁻⁷
7.7 x 10 ⁶	1				3	1	3	3		4	7.4 x 10 ⁻⁷
	10							2	1		1.5 x 10 ⁻⁸

図9Aは実験前後での総細菌数をプロットしたものである。開始時の総細菌数とプラスミド添加量によって2日間での増加倍率は0.74倍から53倍まで変化した。そこで、プラスミド添加量と細菌の増殖率の関係をみるため、開始時の細菌1 cfuあたりのプラスミド添加量に対する2日間での細菌の増殖

率をプロットした (図 9B)。細菌 1 cfu あたりのプラスミド添加量が低い場合は細菌の増殖が制限されているが、細菌 1 cfu あたりのプラスミド添加量が増加するに従って細菌の増殖率は一定となっている。次に、プラスミド添加後 2 日目のプラスミド添加量に対する形質転換頻度をプロットした (図 9C)。今回の実験では 2 日後に 1.3×10^6 cfu/ml 未満の総細菌濃度ではプラスミドの取り込みは検出できなかった。プラスミドの取り込みが検出された実験条件のうち 2 日後の総細菌数が $2.0 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^7$ cfu/ml の範囲では、形質転換頻度は $1.1 \times 10^{-7} \sim 6.9 \times 10^{-7}$ の範囲 (平均 5.0×10^{-7}) であった。この結果から、pSR134 の取込み頻度は pSR134 の添加量によって細菌の増殖が制限されているかどうかによっては変化しないと考えられる。実際に、2 日間での菌数の増殖率が最小 (1000 倍+0.1 $\mu\text{g/ml}$) と最大 (1 倍+10 $\mu\text{g/ml}$) の点でのプラスミドの取り込み頻度はそれぞれ 5.3×10^{-7} と 5.0×10^{-7} であり、両者はほぼ同一の値であった。後で示すように、両条件で検出された形質転換体の細菌種はそれぞれ異なっている。しかし、本実験では細菌種が異なるにもかかわらず pSR134 は同等の頻度で取り込まれているように見える。しかし、2 日後の総細菌数が最小・最大の 2 点では形質転換頻度はそれぞれ 4.5×10^{-6} と 1.5×10^{-8} であり、この 2 点以外での平均値からそれぞれ 9.0 倍、0.03 倍となっており、プラスミド添加から 2 日後の総細菌数が $2.0 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^7$ cfu/ml の範囲外では形質転換頻度が 5.0×10^{-7} から大きく外れている可能性がある。

得られた形質転換体 42 コロニーから 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定したところ、8 つのユニークな塩基配列 A3, B, C, D, E, F, G, J が得られ、BLAST 検索により最も近縁な細菌種を同定し

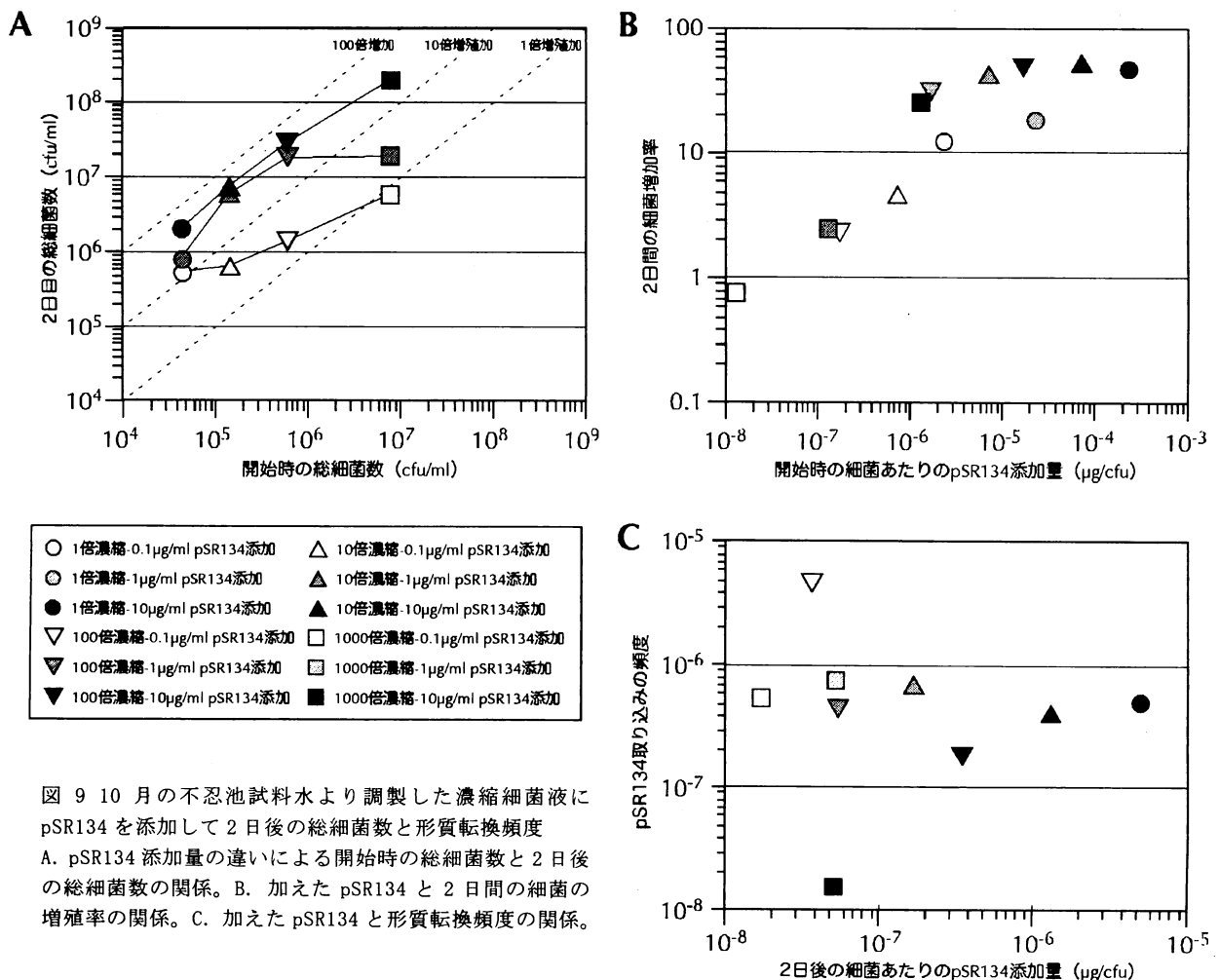


図 9 10 月の不忍池試料水より調製した濃縮細菌液に pSR134 を添加して 2 日後の総細菌数と形質転換頻度
A. pSR134 添加量の違いによる開始時の総細菌数と 2 日後の総細菌数の関係。B. 加えた pSR134 と 2 日間の細菌の増殖率の関係。C. 加えた pSR134 と形質転換頻度の関係。

た（表 13・表 16）。これらの塩基配列のうち、A3, F, G はそれぞれ 7 月の採水試料から得られた塩基配列と同一であった。同定された形質転換体の細菌種の分布から、試料水の濃縮率が変化すると単離された形質転換体の細菌種も変化していることがわかる。この細菌種の遷移は pSR134 添加量には無関係であった。高濃縮率の濃縮液でのみ検出された細菌種は、原水中での濃度が低いために低濃縮率ではプラスミドの取り込みが観察されなかったと考えられる。ところが、高濃縮率の濃縮液にも含まれていると考えられる F や A の形質転換体は高濃縮の濃縮液では検出されなかった。100 倍濃縮液ではプラスミド添加量にかかわらず同種の形質転換体が検出されているが、プラスミド取り込み頻度は総細菌数が増加するに従って低下しており、細菌密度が高くなることで pSR134 を取り込めなくなる、あるいは細菌密度が高くなると速やかに菌数が減少してしまうといったことが考えられる。このことがこれらの細菌種の形質転換体が高濃縮率の濃縮液では検出できない理由ではないかと考えられる。

7 月と同条件（1000 倍濃縮-10 $\mu\text{g/ml}$ pSR134 添加）で実験を行った試料では、7 月の結果と比較して形質転換頻度が著しく低下していた（ $4.6 \times 10^{-6} \rightarrow 1.5 \times 10^{-8}$ ）。この原因は、細菌群集の季節変化による pSR134 取り込み可能細菌の減少や不忍池の水質の変化による形質転換頻度の低下によるものではないかと考えられる。

先に述べたように、pSR134 添加量にかかわらず同じ種の形質転換体のみが検出された 100 倍濃縮液の場合、プラスミド取り込み頻度は総細菌数の増加すなわちプラスミド添加量の増加に従って低下していた。また、プラスミド添加量によって形質転換体の細菌種が変化している他の濃縮液の場合でも、pSR134 添加量が 1 $\mu\text{g/ml}$ から 10 $\mu\text{g/ml}$ に上昇すると 10, 100, 1000 倍濃縮液での形質転換頻度はそれぞれ 59%、41%、2.0%に低下しており、高濃度のプラスミド添加により高い形質転換頻度が得られるわけではないことが示された。

③ 11 月 9 日に霞ヶ浦より採取した試料水中の細菌によるプラスミド pSR134 の取り込み

採取場所の異なる試料水の細菌でのプラスミド取り込みを比較するため、2005 年 11 月 9 日に採取した霞ヶ浦湖心の表層水に不忍池試料水の場合と同様の手法を適用した。試料水原水（濃度不明）・100 倍濃縮液（ 6.7×10^5 cfu/ml）12 ml に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ・1 $\mu\text{g/ml}$ の pSR134 を添加した 4 種類の試料を作成し、100 ml 三角フラスコで 10 日間振盪した。プラスミド添加から 1, 2, 3, 10 日目の総細菌数・グラム陰性細菌数と形質転換体数、同定された形質転換体の細菌種を表 14 に示した。形質転換体は 100 倍濃縮液+0.1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134 でのみ検出された。1 日目と 3 日目の形質転換頻度は 10 月の不忍池試料で得られた結果とほぼ等しかった。しかし、10 日目の形質転換頻度は 3 日目と比較すると著しく増大していた。また、グラム陰性細菌数とその形質転換体数も計数したが、この場合も Hg^{2+} -テトラサイクリン耐性コロニーは 100 倍濃縮液+0.1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134 の系でのみ検出された。推定される形質転換体数は 1/10 nutrient agar プレートでの結果とほぼ同一であった。

単離した 5 コロニーの形質転換体から決定した 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定したところ、2 つのユニークな塩基配列 K と L が得られた。これらは α プロテオバクテリアの根粒菌に分類された。これは不忍池より単離された根粒菌 B、C とは異なる種だった。1/10 nutrient agar プレートから検出された 3 コロニーとグラム陰性細菌プレートから検出された 1 コロニーは K、グラム陰性細菌プレートから検出された 1 コロニーは L であった。この結果は 1/10 nutrient agar プレートとグラム陰性細菌プレート上の推定される形質転換体数がほぼ同じであったことと一致する。

表 14 霞ヶ浦試料水（11 月）濃縮液に pSR134 を添加後 10 日間の細菌数・形質転換頻度

細菌濃縮液 (cfu/ml)	pSR134 添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	細菌種	経過日数	総細菌数 (cfu/ml)	推定形質転換体数 (cfu/ml)	検出された形質転換体の 16S rDNA			形質転換頻度
						K	L	未同定	
100 倍 9.3×10^3	0.1	一般細菌	1	6.2×10^6	1			1	1.6×10^{-7}
			2	3.1×10^6	0				$< 3.2 \times 10^{-7}$
			3	1.7×10^6	1	1			5.8×10^{-7}
			10	1.2×10^6	20	2			1.7×10^{-5}
		グラム陰性細菌	1	3.7×10^4	0				$< 2.7 \times 10^{-5}$
			2	2.3×10^4	0				$< 4.3 \times 10^{-5}$
			3	1.4×10^4	1		1		7.1×10^{-5}
			10	2.3×10^5	19	1		1	8.4×10^{-5}

a: colony-direct PCR による pSR134 保持細菌の検出は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134 添加-10 日目のみ total bacteria では無作為に 10 コロニー、Gram-negative bacteria では無作為に 9 コロニーを選び、それ以外はすべての耐性コロニーについて行った。

霞ヶ浦試料水を用いた実験では、不忍池から採取した試料水の場合とは異なり 1 $\mu\text{g/ml}$ pSR134 添加条件では形質転換体は検出されなかった。原水を用いた場合に関しては、原水の濃度では細菌種 K, L が十分な量存在していなかったためと考えられる。また、100 倍濃縮液の場合は、10 月の不忍池の場合のように総細菌数の増加にしたがって見かけの形質転換頻度が低下したために形質転換体が検出できなかったのかもしれない。また、10 日目の pSR134 取り込み頻度は 3 日目までと比較して著しく上昇していた。この結果から、K の形質転換体の安定性 (pSR134 の安定性) が高く、増殖の際に pSR134 が安定して保持されているのではないかと考えられる。

④ 組換え菌から霞ヶ浦試料水中の細菌へのプラスミド pSR134 の伝達

霞ヶ浦試料水原水と 100 倍濃縮液に 1.0×10^7 cfu/ml の *P. putida* PpY101/pSR134 を添加した系での、湖水中の細菌の pSR134 取り込みについても検討した (表 15)。耐性細菌の検出には、*P. putida* PpY101/pSR134 が生育できない形質転換体検出用改変 M9 培地を使用した。しかし、今回の実験条件では形質転換体は検出されなかった。

表 15 霞ヶ浦試料水濃縮液に 1.0×10^7 cfu/ml *P. putida* PpY101/pSR134 を添加後 10 日間の細菌数・形質転換頻度

	経過日数	総細菌数 (cfu/ml)	改変 M9 培地生育細菌数 (cfu/ml)	形質転換体数 (cfu/ml)	形質転換頻度
原水	0	1.0×10^7	8.3×10^1	<1	
	1	9.2×10^6	n. d.	<1	n. d.
	2	6.1×10^6	1.9×10^5	<1	$<5.3 \times 10^{-6}$
	3	5.4×10^5	2.3×10^5	<1	$<4.3 \times 10^{-6}$
	10	5.1×10^5	1.1×10^5	<1	$<9.1 \times 10^{-6}$
100 倍 9.3×10^3	0	1.0×10^7	6.7×10^4	<1	
	1	5.0×10^6	n. d.	<1	n. d.
	2	5.1×10^6	3.1×10^5	<1	$<3.2 \times 10^{-6}$
	3	4.6×10^6	6.4×10^5	<1	$<1.6 \times 10^{-6}$
	10	2.1×10^6	1.0×10^5	<1	$<1.0 \times 10^{-5}$

n. d. : 測定せず。

pSR134 のサイズは 19 kbp、*P. putida* PpY101/pSR134 におけるプラスミドのコピー数は 19.9 であるので、試料水に投入した 1×10^7 cfu/ml の *P. putida* PpY101/pSR134 に含まれる pSR134 は 4.1 ng/ml となる。この量は pSR134 を直接添加した場合の 1/25 または 1/250 となり、組み替え菌が持っていた pSR134 がすべて試料水中に放出されたとしても pSR134 を直接添加した場合と比較すると非常に少ないと言える。また、形質転換体の検出のためにメチオニンを含まず *P. putida* PpY101/pSR134 が生育できない改変 M9 培地を用いたが、この培地では全細菌の 0.7% から 43% しか生育できなかった (表 15) ので、pSR134 を取り込んだ細菌が存在しても検出できなかった可能性が考えられる。

⑤ 単離された形質転換体の細菌種

表 16 は本研究で単離された形質転換体から決定した 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列を BLAST 検索にかけて得られた各形質転換体の最近縁種の一覧である。不忍池の試料水より検出された形質転換体の大部分は α プロテオバクテリア (91 コロニー中 39 コロニー/43%) と γ プロテオバクテリア (91 コロニー中 39 コロニー/43%) であった。また、 α プロテオバクテリア 39 コロニーのうち 33 コロニー (85%、全体の 36%) が A1・A2・A3、 γ プロテオバクテリアのうちのうち 23 コロニー (59%、全体の 25%) が F、16 コロニー (41%、全体の 18%) が G であった。また、不忍池の試料水から 7 月と 10 月に検出された形質転換体を比較すると、7 月に見られた A1 や I が 10 月には消失しており、時間経過により不忍池中の細菌の群集構造が変化したと考えられる。

BLAST 検索の結果、A1, A2, A3 と最も近縁な種は *Labrys methylaminiphilus* (DQ337554) であった。*L. methylaminiphilus* は淡水湖の底泥から単離された非運動性のグラム陰性細菌であり、基質としてさまざまな単糖、二糖、アミノ酸、有機酸、芳香族化合物、アルコールと同様にメチル化されたアミンを利用できるがメタノールは利用できないと報告されている⁸⁾。F と最も近縁な種は *Dyella yeojuensis* (DQ181549)、ついで *Luteibacter rhizovicius* (AJ580498) であった。*D. yeojuensis* と *L. rhizovicius* はどちらも Xanthomonadaceae に分類される。*D. yeojuensis* については詳しい報告がなされていない。*L. rhizovicius* は春大麦の根圏から単離された好気性グラム陰性細菌である⁹⁾。G と最も近縁な種は *Stenotrophomonas maltophilia* であった。*S. maltophilia* はヒト・動物・

表 16 本実験で単離された形質転換体の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の BLAST 検索結果

	塩基配列	増幅長	単離数				最近縁種
			7 月液	7 月膜	10 月	11 月	
不忍池	A1	434	14	3			α プロテオバクテリア <i>Labrys methylaminiphilus</i> と 99% (433/434) 相同
	A2	434		1			α プロテオバクテリア <i>Labrys methylaminiphilus</i> と 100% 相同
	A3	434	2		13		α プロテオバクテリア <i>Labrys methylaminiphilus</i> と 99% (432/434) 相同
	B	423*			5		α プロテオバクテリア <i>Rhodopseudomonas palustris</i> と 97% (413/423) 相同*
	C	432			1		α プロテオバクテリア <i>Sinorhizobium meliloti</i> と 100% 相同
	D	485			3		β プロテオバクテリア <i>Achromobacter xylosoxidans</i> と 100% 相同
	E	485			1		β プロテオバクテリア <i>Variovorax paradoxus</i> と 100% 相同
	F	491	16	4	3		γ プロテオバクテリア <i>Dyella yeojuensis</i> と 97% (481/491) 相同, <i>Luteibactor rhizovicina</i> と 96% (474/491) 相同
	G	491	1		15		γ プロテオバクテリア <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> と 99% (488/491) 相同
	H	498		1			グラム陽性細菌 <i>Bacillus luciferensis</i> と 97% (484/498) 相同
霞ヶ浦	I	463	6	1			アクチノバクテリア <i>Mycobacterium aubagnense</i> と 99% (460/463) 相同
	J	463			1		アクチノバクテリア <i>Mycobacterium bolletii</i> , <i>M. messiliense</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> と 100% 相同
	K	436				4	α プロテオバクテリアの <i>Afipia lausannensis</i> と 100% (422/422) 一致
	L	436				1	α プロテオバクテリアの <i>Bradyrhizobium japonicum</i> と 100% (424/424) 一致

a: プライマー 27f と 536r で挟まれた部分の長さ (プライマー含まず)

土壌・食物・薬品から単離された好気性グラム陰性桿菌であり¹⁰⁾、やけどなどの衰弱した患者から日和見病原菌として報告されている¹¹⁾。I・J は *Mycobacterium* 属の細菌種と近縁であったが、これらの細菌種はすべて非結核性 *Mycobacterium* であると報告されている。

(6) 土壌試料中の細菌によるプラスミド pSR134 の取り込み

東京大学農学部より採取した土壌試料 (総細菌数は土壌試料 1 g あたり 4.1×10^6 cfu、改変 M9 培地生育細菌数は土壌試料 1 g あたり 3.0×10^6 cfu) をプラスミド pSR134 またはプラスミド供与菌 *P. putida* PpY101/pSR134 と共にバイアル瓶に密封して室温で静置した。1・2 日後バイアル瓶から土壌試料 1 g を分取し、土壌中の細菌を 0.16% KCl + 0.54% NaCl 水溶液で溶出して土壌中の総細菌数・形質転換体数を計数した (表 17)。 *P. putida* PpY101/pSR134 を添加した系の耐性細菌の検出には、形質転換体検出用改変 M9 培地を使用した。しかし、今回の実験条件ではプラスミド添加・プラスミド供与菌添加のいずれにおいても形質転換体は検出されず、プラスミド添加の場合の形質転換頻度は不忍池や霞ヶ浦の試料水を用いた場合の 1/10 以下であると考えられる。

表 17 土壌試料に pSR134 または *P. putida* PpY101/pSR134 を添加後 2 日後の土壌試料中の細菌数・形質転換頻度

土壌添加物	添加量	総細菌数 (cfu/g 土壌)	改変 M9 培地生 育細菌数 (cfu/g 土壌)	形質転換体 数 (cfu/g 土 壌)	形質転換 頻度
無添加		7.1×10^6	n. d.	<1	
pSR134	0.1 μ g/g	1.3×10^7	n. d.	<1	$<7.9 \times 10^{-8}$
	1 μ g/g	2.3×10^7	n. d.	<1	$<4.3 \times 10^{-8}$
<i>P. putida</i>	1.8×10^6 cfu/g	9.2×10^6	4.9×10^6	<1	$<2.1 \times 10^{-7}$
PpY101/pSR134	1.8×10^7 cfu/g	6.5×10^7	2.5×10^7	<1	$<4.1 \times 10^{-8}$

n. d. : 測定せず。

5. 本研究により得られた成果

自然水中の細菌とプラスミド DNA を自然水中で高濃度で共存させることにより非常に低頻度ではあるが細菌によるプラスミド DNA の取り込みが生じることが明らかとなった。すなわち、自然環境中で組換え微生物を使用して組換え微生物の持つプラスミドが環境中に放出された場合、非常に低頻度ではあるが放出されたプラスミドが環境中の微生物に取り込まれうると考えられる。また、土壌中でのプラスミド DNA の取り込み頻度は自然水中での場合の 1/10 よりも低くなるようである。

6. 引用文献

1. Iwasaki, K., Uchiyama, H., and Yagi, O. 1993. Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in aquatic microcosms. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 1264-1269.
2. Brown, N. L., Misra, T. K., Winnie, J. N., Schmidt, A., Seiff, M. and Silver S. 1986. The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon TN501: further evidence for mer genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.*, 202: 143-151.
3. Foster, T., Nakamura, K., Weiss, A. A., and Silver S. 1979. Transposon A-generated mutations in the mercuric resistance genes of plasmid R100-1. *J. Bacteriol.*, 140: 167-181.
4. Misra, T. K., Brown, N. L., Haberstroh, L., Schmidt, A., Goddette, D., and Silver, S. 1985. Mercuric resistance structural genes from plasmid R100 and transposon Tn501: functional domains of the enzyme. *Gene* 34: 253-262.
5. Ni' Bhriain, N. N., and Foster, T. J. 1982. Tn5 insertion mutations in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R100. *J. Bacteriol.*, 155: 690-703.
6. 矢木修身, 佐治光 編. 環境保全のためのバイオテクノロジーの活用とその環境影響評価に関する研究. 国立環境研究所特別報告 SR-21-' 97.
7. Mercer, A.A., Loutit, J.S. 1979. Transformation and transfection of *Pseudomonas aeruginosa*: effects of metal ions. *J. Bacteriol.* 140: 37-42.

8. Miller, J.A., Kalyuzhnaya, M.G., Noyes, E., Lara, J.C., Lidstrom, M.E. and Chistoserdova, L. 2005. *Labrys methylaminiphilus* sp. nov., a novel facultatively methylotrophic bacterium from a freshwater lake sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1247-1253.
9. Johansen, J.E., Binnerup, S.J., Kroer, N. and Mølbak, L. 2005. *Luteibacter rhizovicius* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2285-2291.
10. Lennette E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Shadomy, H.J. (ed.). 2005. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology.
11. Tsai, W.P., Chen, C.L., Ko, W.C. and Pan, S.C. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in burn patients. Burns, 32: 155-158.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

- 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) 口頭発表

- ① 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：環境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」
- ② 奥田喜弘、栗栖太、矢木修身、岩崎一弘：日本微生物生態学会第 21 回大会 (2005) 「湖沼水中微生物へのプラスミド伝達」
- 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」

(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

細胞間の遺伝子の伝達あるいは DNA 遺伝子の細胞への取り込みは、多くの微生物間で存在し、また多くの微生物が遺伝子の取り込み機能を有していることが知られている。しかしながら、水環境及

び土壌環境中で、どのような頻度で生じているかに付いては不明の点が多い。本実験結果より、遺伝子の移行の頻度に影響する環境因子について整理され、また自然環境条件下でも遺伝子移行が起こることが示された。さらに組換え微生物の安全性を評価する有効な手法が開発されつつあり、法律の施行における政策的な寄与へ多大なものがあると考えられる。