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
（３）組換え生物の生物多様性への影響評価手法の開発

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　１，１０５千円
（うち、平成16年度予算額　　３４７千円）
※上記の予算額には、間接経費　　２５５千円を含む

［要旨］
組換え生物の生物多様性への影響評価手法の開発に当たり、微生物間における遺伝子の移行の有無および頻度、遺伝子 DNA の微生物への取込みの有無及び頻度、遺伝子移行のメカニズムに関する文献調査を行った。遺伝子の移行は、自然環境中では形質転換、接合、形質導入を通して行われる。これらの現象は、多くの微生物間で確認されている。また、遺伝子の移行に及ぼす因子として、微生物に関しては栄養塩類、無機塩類の濃度、受容菌の種類と濃度、供与遺伝子の濃度等が、植物に関しては、開花時期、植物間の距離、昆虫の存在等が大きく関与していることが報告されている。これらの項目、及びこれら以外の項目について更なる検討を加え、生物多様性への影響評価に際し、考慮すべき重要な事項を整理した。微生物に関しては、分子生物学的手法を用いるモニタリング手法、影響評価手法、遺伝子伝達評価手法の提案、植物に関しては、組換え体を追跡できるマイクロサテライトマーカーの開発、遺伝子繁殖形式の重要性、雑種後代における遺伝子の浸透を予測する手法の開発による組換え体のリスク制御法の可能性を示すことができた。これらの知見をもとに、新たな観点からの影響評価手法を提案した。

［キーワード］
組換え微生物、組換え植物、生物多様性、遺伝子の水平伝達、

１．はじめに
組換え生物の生物多様性への影響を評価する上で、微生物に関しては、組換え微生物の生残・増殖性、他の微生物を減少させる性質、病原性、有害物質の産生性、遺伝子の伝達等がまた植物に関しては、競合における優位性、有害物質の産生性、交雑性を評価することが重要である。しかしながら、遺伝子移行に関する評価法についてはいまだ確立していない。本研究では、遺伝子の挙動解明を中心に研究を遂行し、問題点を抽出し、生物多様性影響評価する際の新たな手法及び考慮事項を提案する。

２．研究目的
文献調査および及び本研究から得られる遺伝子のモニタリング法、移行頻度、移行のメカニズムに関する結果から、現在の生物多様性影響評価法を補完する手法を提案する。

３．研究方法
文献調査[1)－12)]及び現在の生物多様性影響評価法について考察を加えるとともに、本プロジ

ェクトから得られたデータを基に、遺伝子移行のモニタリング及び遺伝子移行に及ぼす因子の抽出を行った。

生物多様性影響評価に必要とされる情報及び生物多様性影響評価項目[15]を以下に示す。

3.1 生物多様性影響評価に必要とされる情報

(1)宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1)分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

2)使用等の歴史及び現状

3)生理学的及生態学的特性

①基本的特性

②生息又は生育可能な環境の条件

③捕食性又は寄生性

④繁殖又は増殖の様式

⑤病原性

⑥有害物質の産生性

⑦その他の情報

(2)遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1)供与核酸に関する情報

①構成及び構成要素の由来

②構成要素の機能(構造)

2)ベクターに関する情報

①名称及び由来

②特性(伝達性)

3)遺伝子組換え生物等の調製方法

①宿主内に移入された核酸全体の構成

②宿主内に移入された核酸の移入方法

③遺伝子組換え生物等の育成の経過

4)細胞内に移入した核酸の存在状態、形質発現の安定性(重点課題)

5)遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法、それらの感度及び信頼性(重点課題)

6)宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

3.2 生物多様性影響評価項目

(1)微生物

1)他の微生物を減少させる性質

競合性、有害物質の産生性

2)病原性

野生動植物への生息及び生育への影響

3)有害物質の産生性

野生動植物への生息及び生育への影響

4)核酸を水平伝達する性質(重点課題)

野生動植物又は他の微生物への伝達性

5)その他の性質

(2)植物

1)競合における優位性(重点課題)

栄養分、日照

2)有害物質の産生性

野生動物、植物、微生物への生息又は生育への影響

3)交雑性

近縁の野生植物への遺伝子の伝達性(重要課題)

4)その他の性質

(　)は、今回特に重点的に検討した課題である。

4．結果・考察

微生物に関しては、自然界における遺伝子の移行は、1)遺伝子物質の取込みによる形質転換、2)繊毛の生成による遺伝子の接合、3)ファージを介する形質導入が知られている。しかしこれ以外でも人工的に、1)細胞を塩化カルシウム等の塩化物水溶液で処理する、2)細胞を EDTA などのキレート剤で処理する、3)細胞を酵素で処理する、4)細胞プロトプラストを DNA、細胞あるいはリポソームに組込まれた DNA と接触させる、5)細胞を凍結融解する、6)エレクトロポレーション法、7)パーティクルガン法などが知られている。環境中においてはこのような条件が達成されることもあり、これらの因子も考慮する必要がある。

また、遺伝子の移行には、遺伝子の伝達能の存在も重要な因子である。さらに遺伝子の取込みは、受容体微生物の性質により大きく左右され、貧栄養状態や環境の悪化に伴い、適応性を高めるために遺伝子を取りこみやすくなる微生物が知られている。微生物細胞の増殖時期も大きく関与している。さらに温度、ｐH, 有機物濃度、DNA 遺伝子の水環境及び土壌環境中の微粒子との結合による遺伝子の安定性も大きく関与している。このように遺伝子に移行に関しては多くの要因が関与している。これらの因子に関し文献の整理を行った。

本研究の成果より、微生物のマーカー遺伝子として、緑色蛍光タンパク質遺伝子、赤色蛍光タンパク質遺伝子、野生型遺伝子と区別できる遺伝子の導入方法の確立による高感度モニタリング手法の開発、微生物影響評価のための DNA 抽出－DGGE 解析法の再現性の確認、遺伝子クローニング法による影響を受けやすい微生物の確認、遺伝子の移行に関するフィルター平板培養法と液体培養法の確立、プラスミド遺伝子が高濃度の場合には、環境中の多くの微生物に遺伝子が低頻度ではあるが移行すること、組換え魚遺伝子の細菌への移行の試験法、植物に関しては、マイクロサテライトマーカーによる組換え体、非組換え体、雑種のモニタリング法の開発、自殖性と他殖性による遺伝子の移行の制御が可能なこと、導入遺伝子の遺伝子座の位置による定着性の制御が可能なこと、環境ストレスにより遺伝子の発現が制御されること、劣性遺伝子も雑種後代の中で発現されること、昆虫、動物により遺伝子はかなり遠くまで移行すること、開花期がずれる

と遺伝子移行が著しく制御されること等が判明した[14)-17)]。

これらの成果は以下の評価項目で活用されよう。

3．1　生物多様性影響評価に必要とされる情報

(2)遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

2)ベクターに関する情報

②特性(伝達性)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・手法の開発

3)遺伝子組換え生物等の調製方法

①宿主内に移入された核酸全体の構成・・・・・移行の制御法への活用

4)細胞内に移入した核酸の存在状態、形質発現の安定性

・・・・・遺伝子座の解析法の確立

5)遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法、それらの感度及び信頼性

・・・・・マイクロサテライトマーカーの開発

3．2　生物多様性影響評価項目

(1)微生物

1)他の微生物を減少させる性質

競合性、有害物質の産生性　・・・・・・DNA 解析

4)核酸を水平伝達する性質(重点課題)

野生動植物又は他の微生物への伝達性・・・・・伝達試験法

(2)植物

1)競合における優位性

栄養分、繁殖性　・・・・・・野外調査法

3)交雑性

近縁の野生植物への遺伝子の伝達性　・・・・・・遺伝子移行モデル

５．本研究により得られた成果

遺伝子の移行に関する文献調査を行うとともに、本研究成果より、遺伝子の移行に関する多くの要因を抽出することができ、生物多様性影響評価に新たな手法を提案することができた。

６．引用文献

1) Lorenz. M. G and Wackergel, W. (1994): Natural transformation, Microbiol. Reviews, 58, 563-602.

2) Sasaki, Y., Taketomo, N. and Sasaki, T. (1988): Factors affecting transfer frequency of pAM beta 1 from *Streptococcus faecalis* to *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 170(12), 5939-5942.

3) Top, E., Mergeay, M., Springael, D. and Verstraete, W. (1990): Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. Appl. Environ. Microbiol., 56(8), 2471-2479.

4) Molbak, L., Licht, T. R. and Kvist, T. (2003): Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on *Alfalfa sprouts*: Characterization, direct quantification, and in situ location of transconjugant cells. Appl. Environ. Microbiol., 69, 5536-5542.

5) Nancharaiah, Y. V., Wattiau, P. and Wuertz, S, (2003): Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid Appl. Environ. Microbiol., 69, 4846-4852.

6) Smets B. F., Morrow, J. B. and Arango, P. C. (2003): Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. Appl. Environ. Microbiol., 69(7), 4087-4097.

7) Hendrickx, L., Hausner, M. and Wuertz, S. (2003): Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. Appl. Environ. Microbiol., 69, 1721-1727.

8) Leen, De G., Frederik, P. J., Vandecasteele, C. J., Brown, L. J. Forney and Eva M. T. (2005): Plasmid donor affects host range of *Promiscuous* IncP-1ß plasmid pB10 in an activated-sSludge microbial community, Appl. Environ. Microbol. 71, 5309-5317.

9) Regeard, C., Maillard, J., Dufraigne, C., Deschavanne, P. and Holliger, C. (2005): Indications for acquisition of reductive dehalogenase genes through horizontal gene transfer by *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. Appl. Environ. Microbiol. 71(6), 2955-2961.

10) Pinedo, C. A. and Smets, B. F.(2005): Conjugal TOL transfer from *Pseudomonas putida* to *Pseudomonas aeruginosa*: effects of restriction proficiency, toxicant exposure, cell density ratios, and conjugation detection method on observed transfer efficiencies, Appl. Environ. Microbiol. 71(1), 51-57.

11) Dechesne, A., Pallud, C., Bertolla, F. and Grundmann, G. L.(2005): Impact of the microscale distribution of a *Pseudomonas* strain introduced into soil on potential contacts with indigenous bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 71(12), 8123-8131.

12) 川崎善一郎(2003): 水域生態系における遺伝子資源としての溶存態DNAの動態, 生物工学会誌, 81(10), 425-440.

13) 岩崎一弘、奥田嘉弘、矢木修身(2005): 微生物間の遺伝子伝達、農業および園芸、 80(1)、185-190

14) 芳生秀光、清野正子(2002): 水銀汚染浄化のための新規バイオテクノロジー, J. Environ. Biotech., 2(2), 95-102.

15) 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領(平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産。経済産業・環境省告示第2号)

16) CODEX ガイドライン(2003)(GUIDELINE FOR THE CONDUCT OF FOOD SAFETY ASSESSMENT OF FOODS PRODUCED USING RECOMBINANT-DNA MICROORGANISMS) http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/dna/dl/02-02-03.pdf

17) 田部井豊、日野明寛、矢木修身編(2005):新しい遺伝子組換え体(GMO)の安全性評価システムガイドブック、エヌ・ティ・エス、725pp.

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

＜学術誌（査読なし）＞

1) 岩崎一弘、奥田嘉弘、矢木修身(2005): 微生物間の遺伝子伝達、農業および園芸、 80(1)、185-190

2) 田部井豊、日野明寛、矢木修身編(2005):新しい遺伝子組換え体(GMO)の安全性評価システムガイドブック、エヌ・ティ・エス、725pp.

（２）口頭発表

なし

（３）出願特許

なし

（４）シンポジウム・セミナーの開催（主催のもの）

なし

（５）マスコミ等への公表・報道等

なし

９．成果の政策的な寄与・貢献について

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多く知見が得られ、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性への確保に関する法律」において種々の試験法、多くの考慮事項を提案することができ、組換え体の安全性評価に多大な貢献ができるものと考えられる。