Journal of Environmental Biotechnology
（環境バイオテクノロジー学会誌）
Vol. 6, No. 1, 7–15, 2006

総　　説（特集）

遺伝子組換え微生物の第一種使用における安全性評価

The Risk Assessment of Genetically Engineered Microorganisms in Environments (Type 1 Use)

岩崎　一弘[1]*，矢木　修身[2]
Kazuhiro Iwasaki and Osami Yagi

[1] 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　〒305–8506 茨城県つくば市小野川16–2
[2] 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　〒113–8656 東京都文京区本郷7–3–1
* TEL: 029–850–2407　FAX: 029–850–2407
* E-mail: kiwasaki@nies.go.jp
[1] National Institute for Environmental Studies, 16–2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305–8506, Japan
[2] Research Center for Water Environment Technology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7–3–1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8656, Japan

キーワード：カルタヘナ議定書，遺伝子組換え微生物，プラスミド，微生物多様性
Key words: The Cartagena Protocol, genetically engineered microorganisms, plasmid, microbial diversity

（原稿受付　2005年11月14日／原稿受理　2006年 1 月 6 日）

1. はじめに

1992年にいわゆる「生物多様性条約」が採択され，さらに本条約第19条 3 の規程に基づく交渉において2000年 1 月「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」が採択された。本議定書の締結により我が国が負うこととなる主要な義務としての 1 番目として，遺伝子組換え生物等の利用等が生物の多様性に対する危険（人への影響も考慮）を防止又は減少させる方法で行われることを確保すること，が記述されている（外務省：カルタヘナ議定書の説明書）。これをうけて2001年12月に環境大臣より中央環境審議会に対し，本議定書への対応について諮問があり，同審議会野生生物部会に遺伝子組換え生物小委員会がおかれ，必要な国内措置のあり方について検討がなされた。2002年 9 月にまとめられた報告書では，組換え微生物の環境放出による影響評価項目として以下が想定されている。

- 対象地点，対象時期の範囲を超えた環境への拡散の可能性
- 在来の生態系への侵入・定着の可能性
- ヒト・動植物への非意図的暴露の可能性
- 導入遺伝子産物，新たな代謝産物の産生，環境中への残留の可能性
- 遺伝子の水平伝達・組換えによる新規微生物，ウイルスの出現の可能性
- 土着の微生物種との競合の可能性
- 近縁の野生生物種との交雑の可能性
- 微生物等による物質循環機能への影響の可能性

本件に対するパブリックコメントとして，遺伝子組換え自体を禁止すべき，環境放出を行わないことが予防措置である，との意見も寄せられており，遺伝子組換え生物の環境利用に対する安全性に関しての懸念が示されているといえる。

こうした検討を受けて，周知のように2003年 6 月に「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（カルタヘナ法）」が公布され，2004年 2 月に施行された。これにともない関連規則も公布されており，2003年11月には「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（財務省，文科省，厚労省，農水省，経産省，環境省告示第二号）」が公布され遺伝子組換え生物の第一種使用いわゆる環境利用における評価項目が示されている。2005年10月現在，「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」では 8 施設での遺伝子組換えウイルスの使用申請を審議しており，このうち北海道大学病院，筑波大学附属病院など 6 件の第一種使用が承認されている。また，「遺伝子組換え生物等の第一種使用規定の承認を行うに当たって意見を聴取する学識経験者」の名簿が，医薬品分野および農林水産分野において公表されており，遺伝子組換え生物の環境利用に関する実質的な審議がなされている。ここでの審議を基に生物多様性影響評価検討会（農水省，環境省）では多くの遺伝子組換え植物（農作物）の第一種使用に関して検討されており，2005年10月現在54件がカルタヘナ法に基づき承認されている。一方，遺伝子組換え微生物に関しては未だ申請はなされておらず，関連した委員会は開催されていないのが現状である。

著者らはこれまで有用微生物の野外利用に関連した研究を行ってきており，カルタヘナ法に関連する遺伝子組換え微生物の挙動・影響評価を目的としたマイクロコズム試験を実施してきている[9–11]。また，こうした知見を生かしつつさらに組換え植物，動物の影響評価も加えた

プロジェクトを環境省地球環境研究総合推進費に提案し（研究代表者，東京大学矢木修身教授）平成15年度より実施している。遺伝子組換え生物の遺伝子移行の解析と生物多様性への影響評価手法の開発を目的としており，東京大学，筑波大学，産業技術総合研究所，農業生物資源研究所，国立環境研究所の共同で研究を進めているところである。本稿では，これまで実施してきたマイクロコズム試験で得られている知見並びに現在進行中の本プロジェクトにおいて筆者が担当している内容について紹介する。

2. 微生物細胞内での遺伝子の挙動

微生物は非常に小さく顕微鏡レベルなので，その生残や拡散を環境中で検出・定量するには特殊な技術を必要とするため，安全性を評価するうえでモニタリング手法の確立は重要な課題である。筆者らも，トリクロロエチレン分解菌等の特定微生物の PCR 法による検出・定量法の開発を行ってきている[8,14,15]。また，前述の環境省プロジェクトにおいても産業総合研究所の研究グループが微生物のモニタリングに関して担当しているところである。ここでは，微生物のモニタリングに関しては割愛させていただき，遺伝子組換え微生物の安全性評価項目として重要な遺伝子の挙動について述べる。

遺伝子組換え微生物の生態系に及ぼす影響という観点から，導入した遺伝子の環境中における伝播等の挙動を解析することは非常に重要であり，これまでに微生物間のプラスミド等の遺伝子の水平伝達に関する多くの研究がなされている[12]。また，環境中に接種した微生物のプラスミドの挙動に関していくつか報告がなされている。Devanas ら[4] は，薬剤耐性プラスミドを保持する *Escherichia coli* を土壌中に接種し，その生残性とプラスミドの安定性は土壌の栄養状態に影響されると報告している。また，抗生物質耐性遺伝子をコードするプラスミドを保持する *Pseudomonas fluorescens* では，水環境中において耐性を示す菌の割合が減少していき，この原因がプラスミドの脱落であったことが示されている[28]。一方，Caldwell ら[3] は，水銀およびテトラサイクリン耐性遺伝子をコードするプラスミドを持つ各種微生物を地下水中に接種した結果，次第に薬剤耐性能を発現しなくなるが，この時プラスミドは保持し続けるという現象を報告している。このように，環境中に接種した微生物において，その環境条件および導入した遺伝子の種類等により，時間の経過と共にプラスミドが脱落するあるいは標的遺伝子の形質が発現しなくなる現象が認められているが，そのメカニズムは十分には明らかになっていない。環境中における微生物の挙動を評価し，また目的とする形質を有効に発現させるためにも，その遺伝子の微生物細胞内における安定性等の挙動を解析することが重要であると考え，微生物細胞内でのプラスミドの挙動の解析を行った。

2.1. 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きている[9–11]。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 PpY101/pSR134 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，無機水銀汚染浄化能を有している[19–21]。

2.2. 環境水中でのプラスミドの安定性

環境水中における PpY101 細胞内の組換えプラスミド pSR134 の安定性を検討した（図 1 ）。上記の洗浄菌体を接種した手賀沼湖水（千葉県）を 500 ml 容三角フラスコに 200 ml 分注し，これを水マイクロコズムとした。各マイクロコズムは室温 25°C, 照度 4,500 lx, 12時間明暗周期，振とう条件 60 rpm の条件下に設置した。環境水中における急激な菌数の減少は，後述するように原生動物による捕食が大きな原因であると考えられる。菌数の減少に伴い水銀添加平板培地に生育するコロニー数の割合が減少する傾向が示され，すなわち環境水中において *mer* オペロンの発現率の低下が認められた。この時，水銀無添加培地で増殖したコロニーをさらに水銀添加および無添加平板培地にレプリカしてその生育を確認したところ，水銀耐性能を発現しているコロニーは40%以下となり，PpY101 細胞からのプラスミドの消失が示唆された。なお，水銀無添加の栄養培地でプラスミドの安定性を調べた結果では，植継ぎを繰り返し約40世代後でも90%以上の安定性が認められている。

2.3. プラスミド安定性に及ぼす環境要因

次に，*mer* オペロンの発現およびプラスミドの安定性に及ぼす温度と光の影響を検討した。蒸留水中において温度の影響を検討した結果（図 2 ），暗所における 10，20および 25°C では，35日目まで試験開始時の菌数を保ち，また水銀添加平板培地と無添加平板培地で計数した菌数にほとんど差が無く，水銀耐性能を常に保持していることが示された。さらに，光の影響を検討した結

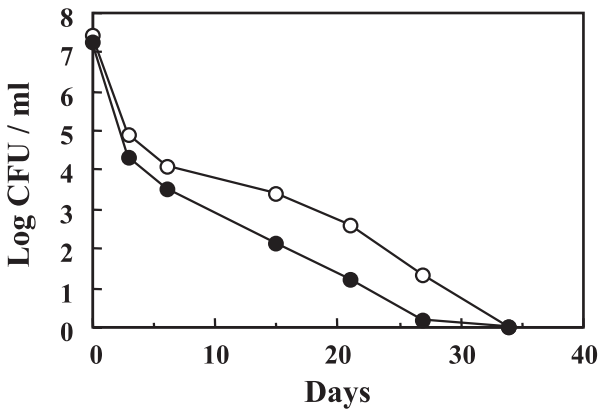

図 1 . 手賀沼湖水における遺伝子組換え微生物 PpY101/pSR134 の生残性。
水銀無添加平板培地（○）および水銀添加平板培地（●）で計数。

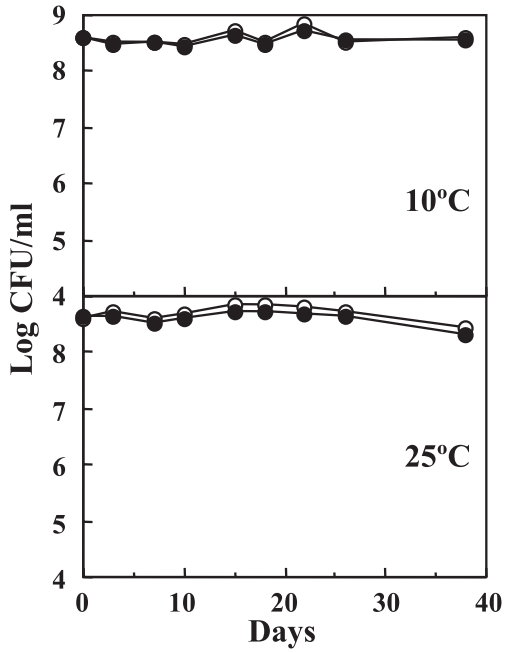

図 2 . 遺伝子組換え微生物 PpY101/pSR134 のプラスミドの安定性に及ぼす温度の影響。
水銀無添加平板培地（○）および水銀添加平板培地（●）で計数。

果（図 3），4,000 lx の連続照射下では，3 日目以降 CFU の減少に伴い両者の平板培地で計数した菌数に差が生じ，35日目には両者の差は約10倍となった。7,000 lx の連続照射下では，12日目には水銀無添加平板培地で約 10^6 CFU/ml，水銀添加平板培地で約 10^4 CFU/ml と計数され両者に大きな差が認められた。なお，顕微鏡観察による直接計数の結果，暗所および光照射系いずれもほぼ実験開始時の菌数を維持したことから，光による溶菌は生じていないと考えられる。ここで使用した *P. putida* は光の照射により生残性の低下に伴って，プラスミド由来の水銀耐性能が低下することが認められた。この原因としては，貧栄養条件下での代謝によるプラスミドの脱落，あるいは光によるプラスミドの物理化学的分解によるコピー数の低下，プラスミド立体構造の変化，水銀還元酵素の不活性化等が考えられた。

2.4. 細胞内のプラスミド立体構造の解析

そこで，細胞内のプラスミドの立体構造および含量の解析を試みた。まずプラスミドの抽出法を開発するために，微生物細胞をアガロースゲルに固定し，そのゲルプラグから DNA の回収および透析による精製を行った。その結果，電気泳動により閉環状，開環状および直鎖状プラスミド DNA の分離・定量が可能となった。

次いで，7,000 lx の光を連続照射した条件下での PpY101 細胞内のプラスミド pSR134 の立体構造解析および DNA 量の変化の測定を行った（図 4，5）。その結果，試験開始時はほとんどが閉環状プラスミドであったが，光の照射により閉環状プラスミドの減少に伴い開環状プラスミドが増加し，その後閉環状および開環状プラスミドともに減少した。暗所においては，試験開始時の閉環状プラスミドの量をほぼ維持し，試験終了時に開環

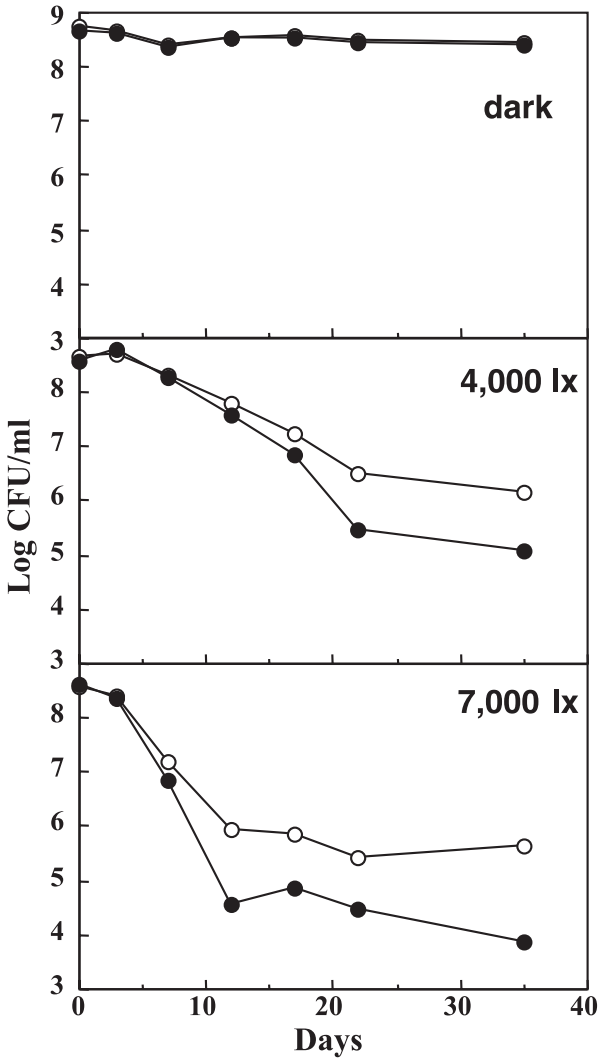

図 3 . 遺伝子組換え微生物 PpY101/pSR134 のプラスミドの安定性に及ぼす光の影響。
水銀無添加平板培地（○）および水銀添加平板培地（●）で計数。

状と閉環状プラスミドがほぼ等量となった。光の照射により開環状プラスミドが増加した 4 日目には，水銀添加および無添加平板培地での計数による菌数に差がないことから，開環状プラスミドであっても *mer* オペロンの発現能は維持されていると考えられる。また閉環状および開環状プラスミドともに減少した 8 日目以降に，平板培地による計数の結果から水銀耐性能の低下が認められ，水銀が高濃度であるほど耐性を発現する菌数が少なくなることが示された。このことから，光により菌体内の組換えプラスミドが閉環状から開環状へと構造が変化することにより不安定化し，さらに光を受け続けるためコピー数が低下し，細胞によるプラスミドコピー数の違いにより，水銀耐性能の差が生じたと考えられる。なお，直鎖状プラスミドについては，暗所および光照射系共に得られなかった。これは菌体内において，直鎖状 DNA が構造的に DNase による分解を受けやすいためではないかと思われる。ここで検出された，閉環状から開環状への変換は，光による物理化学的分解だけでなく菌体内のトポイソメラーゼ II の不活性化，トポイソメラー

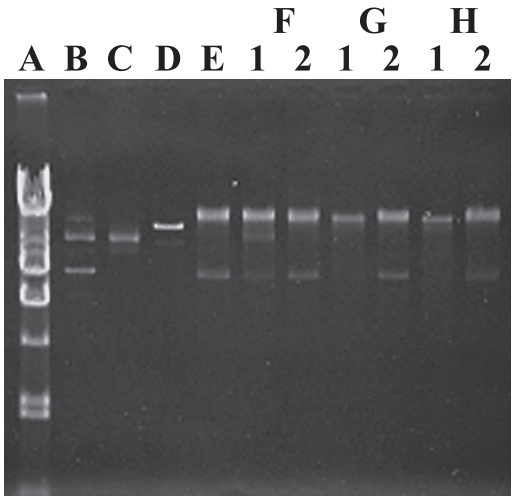

図 4 . 遺伝子組換え微生物 PpY101/pSR134 細胞内のプラスミドの立体構造の変化。
各レーンはそれぞれマーカー (A), ccc-pSR134 (B), oc-pSR134 (C), l-pSR134 (D), 0 日 (E), 4 日後 (F), 8 日後 (G), 12日後 (H) の微生物細胞から抽出した DNA サンプル（それぞれ1は光照射，2 は暗所）。

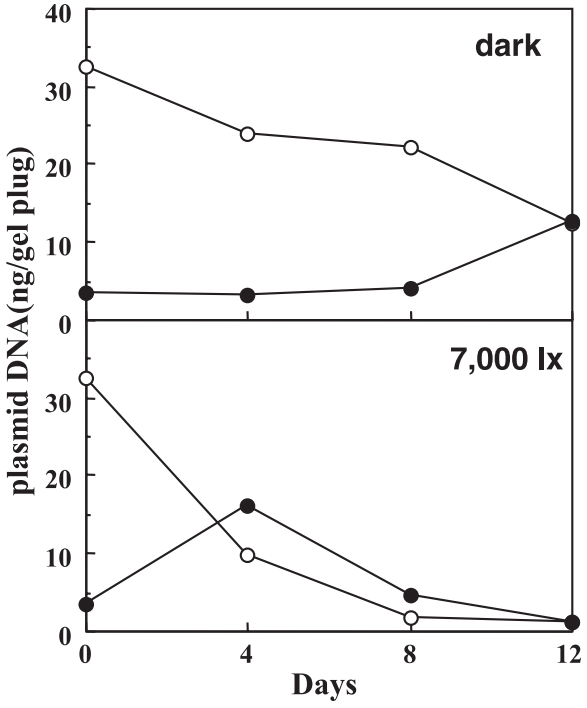

図 5 . 遺伝子組換え微生物 PpY101/pSR134 細胞内のプラスミドの立体構造および濃度に及ぼす光の影響。
閉環状 (ccc) プラスミド（○）および開環状 (oc) プラスミド（●）。

ゼ I の活性化および ATP の減少等も原因しているのかもしれない。以上より光の照射により，プラスミドを保持する *P. putida* の nonculturable な状態への移行が引き起こされ，プラスミドの立体構造の閉環状から開環状への変換を促進し，さらにプラスミドのコピー数の低下を起こすことにより水銀耐性能を徐々に低下させることが推測された。

環境中における遺伝子組換え微生物のプラスミドの水平伝達等の遺伝子の挙動に関するリスク管理といった点を考慮すると，環境利用する遺伝子組換え微生物にプラスミドを導入することは避けた方がよいかもしれない。しかしながら，近年廃水処理において目的の形質を定着させるため，あえて伝達性プラスミドを利用する試み[2] もなされており，微生物の有効な利用および微生物並びに遺伝子の制御・安全性評価といった観点から，本研究のような検討が重要であると考えている。

3. 環境中での遺伝子組換え微生物の生残性

遺伝子組換え微生物の環境利用に際してその安全性を評価する必要があると考えられている項目のうち，人間，特定の動植物への直接の影響に関しては，利用する微生物の病原性，有害物質の生産性，その他の主要な生理学的特性および使用法等からある程度の予測が可能である。しかしながら，環境中での生残性，生態系に及ぼす影響等の安全性を評価するためには，マイクロコズム等の模擬生態系での検討が必要である。

3.1. 水マイクロコズム試験[9]

供試微生物として前述の *P. putida* PpY101 にプラスミド pSR134 を導入した組換え体およびその宿主を非組換え体として用いた。また水マイクロコズムも前述と同様に用意し，25°C，5,000 lx（12時間明暗周期），60 rpm の条件下に設置した。組換え体および非組換え体は軟寒天重層培養法により計数した。各種環境水中での生残性試験結果を図 6 に，またこれらの環境水の水質を表 1 に示した。両者の菌数は，接種後 5 日までは速やかに，その後は比較的緩やかに減少し，接種した菌数が高いときにより早く減少していた。後述のようにこの高い死滅速度は原生動物の高い捕食圧によるものではないかと考えられる。組換え体と非組換え体の生残性に有意な差は認められなかった。Scanferlato ら[25] は，遺伝子組換えおよび野生型 *Erwinia carotovora* の水マイクロコズムにおける死滅速度は同じであることを報告している。

水環境中の栄養条件と生残性の関係に関する報告がいくつかなされており，Liang ら[16] は，各種微生物の生残性が栄養条件によって異なることを示している。本研究

表 1 . 各環境水試料の水質

Water samples	Water quality (mg l^{-1})					
	T-P	PO_4-P	T-N	NO_2+NO_3-N	NH_4-N	COD
Lake Teganuma	0.696	0.060	3.99	1.35	0.22	5.4
Sakura River	0.130	0.016	1.35	0.89	0.07	4.3
Tsukuba Spring	0.100	0.014	0.80	0.71	0.01	1.4

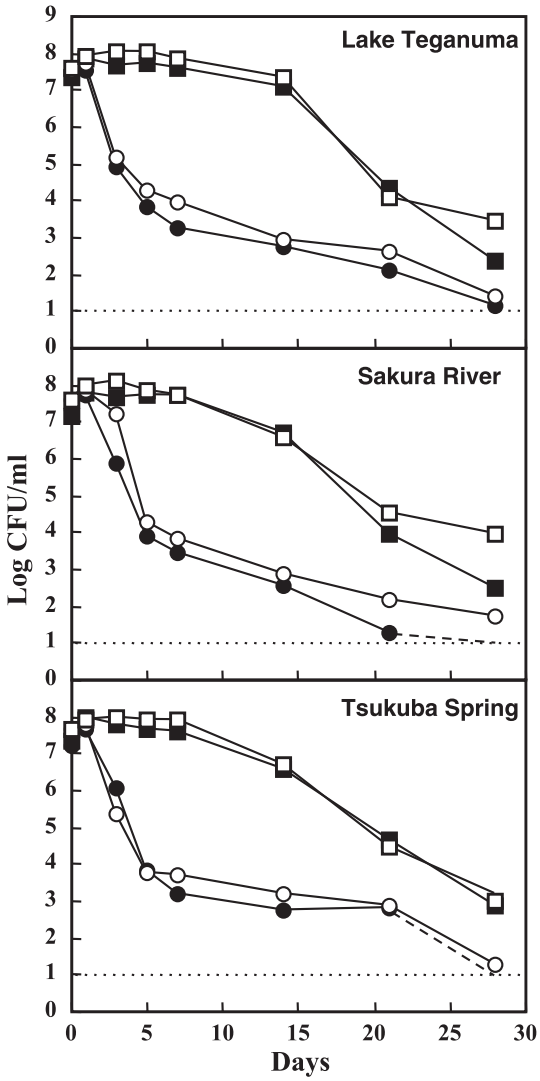

図 6．遺伝子組換え（■，●）および非組換え（□，○）PpY101 の各種環境水での生残性。点線は検出限界。

においては，生残性はその試水の COD の違いには影響を受けておらず，本菌株の挙動は水環境中の栄養条件には影響を受けないことを示唆している。水環境中の栄養条件にその生残性が影響を受ける微生物と受けない微生物がいるようである。従って，その水質分析だけでは水環境中に接種した微生物の生残性は予測できないといえるだろう。

水環境中において原生動物による捕食は，微生物と他の生物との相互作用を考察する上で非常に重要な因子の一つである[1,6]。増殖速度の低い細菌は原生動物の捕食により速やかに減少することが示唆されている[7,27]。本研究において，原生動物の捕食活性を押さえるためシクロヘキシミドを添加したマイクロコズム中においては，7 日間まで接種した *P. putida* の菌数はほとんど変化しなかった（図 7）。7 日から14日目の間に急激な減少がみられたが，これはシクロヘキシミドに耐性のある原生動物が増殖したためではないかと考えられる。本研究で用いた *P. putida* も，原生動物による捕食によって大きな影響を受けることが明らかとなった。また，このように速やかに減少してしまうことから，接種した *P. putida* は自然水中においてはおそらくその生育速度は非常に遅いかまたはほとんど生育していないのではないかと思われる。

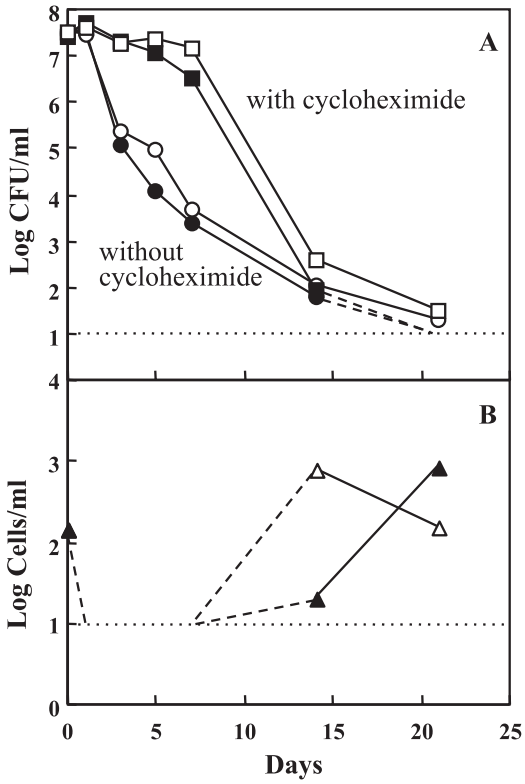

図 7．遺伝子組換え（■，●）および非組換え（□，○）PpY101 の手賀沼湖水での生残性に及ぼす原生動物の影響 (A)。シクロヘキシミド添加系における原生動物細胞数 (B)。

3.2. 土壌マイクロコズム試験[10]

風乾して 2 mm のふるいを通し適当な含水率に調整した土壌に前述の組換え体および非組換え体を噴霧し，この約 500 g を直径 9 cm 高さ 15 cm の深形ガラス製シャーレに充填して土壌マイクロコズムとした。土壌マイクロコズムは 25°C，暗所に設置した。まず，黒ボク土壌と砂質土壌における生残性を調べた（図 8）。Trevors ら[29] は，マーカーを導入した *P. fluorescens* の生残性がローム土壌と砂質土壌で異なることを示している。彼らは，非生物的な環境因子とともに競合，捕食およびニッチの獲得などの生物学的因子の違いがこの 2 種類の土壌での生残性の違いを引き起こしているだろうと考察している。Ramos ら[24] は，組換え型 TOL プラスミドを保持している *P. putida* の生残性は土壌のタイプに依存することを示している。しかし，彼らは生残性と土壌のタイプ，有機物含量，C/N 比およびカルシウム含量との間に直接の相関は見いだせないと述べている。本研究においても，接種した *P. putida* の生残性は黒ボク土壌と砂質土壌マイクロコズムで異なっていた。これは微生物を野外利用する前にそのサイトの土壌で挙動を検討することが必要であることを示している。

Yeung ら[33] は，新鮮な湿土壌中で *P. putida* および *Pseudomonas aeruginosa* の宿主と組換えプラスミドを導入した組換え体の挙動には有意差がないことを報告してい

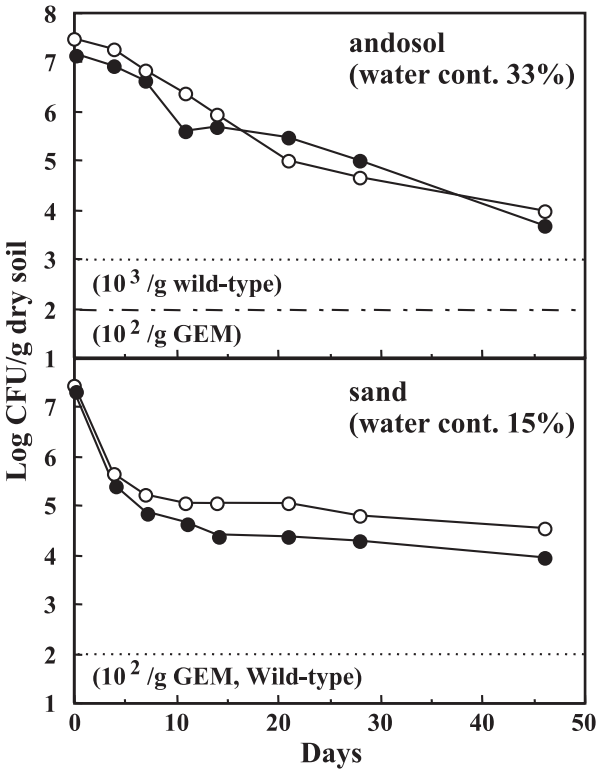

図 8．遺伝子組換え（●）および非組換え（○）PpY101 の黒ボク土壌および砂質土壌での生残性。

る。Morel ら[17] は，*E. coli* と *P. putida* の宿主および組換えプラスミドを保持している組換え体とでトウモロコシ根圏においてほとんど同じ挙動を示したことを述べている。本研究において，*mer* オペロンを導入した組換え *P. putida* およびその宿主の土壌中における生残性には有意な差は認められなかった。ここでのマイクロコズム試験およびこれまでの報告から，特に選択圧のない条件では遺伝子組換え微生物の生残性はその親株とほぼ同じであろうと考えられる。

次いで，黒ボク土壌中の生残性はその含水量によって大きな影響を受けることが認められた（図 9）。Postma と van Veen ら[23] は，滅菌土壌中における根粒菌の生残性を検討し，含水率の増加はその生残性にほとんど影響を与えないことを示した。一方，Dupler と Baker[5] は，高含水率の土壌中では *P. putida* は有意に長く生残したことを報告している。含水率と原生動物による捕食に関して，Vargas と Hattori[31] は，低い土壌含水率によって土壌粒子中での原生動物細胞の分散が妨げられていることを示唆している。また，原生動物のような捕食者がより高い含水率の土壌でより活発であるということが報告されている[30]。従って，本研究の *P. putida* の低含水率土壌での急激な減少は，原生動物による捕食によるものではなく，宿主の生理学的性質によるのではないかと考えられる。Senoo ら[26] は，土着の *Sphingomonas paucimobilis* の生残性が，接種したそれよりも良いことを示している。彼らは，土着の *S. paucimobilis* がその土壌の細孔隙に位置することを示唆している。土壌の団粒構造の外側に生息する微生物は内側の微生物よりも環境条件の影響を直接さらされてしまう[18]。土壌に接種した *P.*

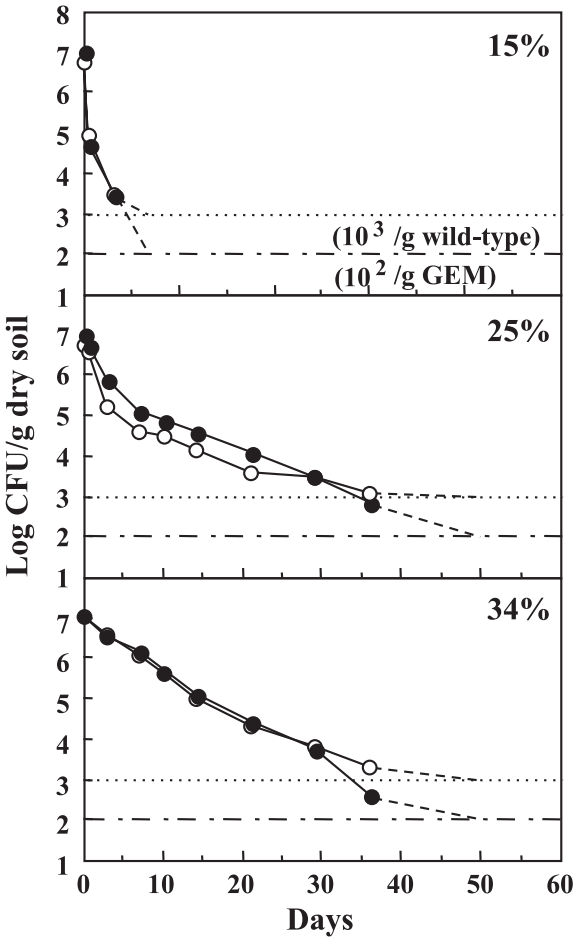

図 9．遺伝子組換え（●）および非組換え（○）PpY101 の黒ボク土壌での生残性に及ぼす含水量の影響。

putida が土壌団粒構造の内側に入り込めないことが含水率の低い土壌中での急速な減少の原因のひとつかもしれない。一方，Zechman と Casida[34] は，自然土壌中に *P. aeruginosa* を接種し，ゆっくり乾燥させる実験を行い，試験開始約 1 週間で急激な死滅が始まることを報告している。従って，微生物の野外利用の前にはその利用状況によっては土壌マイクロコズムの含水率を変化させてその挙動を検討する必要があるだろうと考えられる。

4. 培養法による影響評価試験[9,10]

前述のマイクロコズム試験において組換え体あるいは非組換え体接種の系と菌体無接種の対照系における土着微生物の生菌数を比較した。手賀沼湖水マイクロコズムでの結果を図10に示す。湖水中には約 10^5 CFU/ml の一般従属栄養細菌が存在していた。実験開始 5 日目までは接種した微生物菌数が 10^5 CFU/ml 以上生残し，湖水中の土着菌数を上回っていたため計数が出来なかったが，7 日目以後で計数が可能となった。菌体接種系と無接種の対照系とでは一般従属栄養細菌数の差は認められず，これらの生菌数への影響はほとんどないと考えられた。

黒ボク土壌および砂質土壌を用いた土壌マイクロコズムにおいても一般従属栄養細菌数への影響は認められなかった。さらに各種含水率の黒ボク土壌を用いた土壌マ

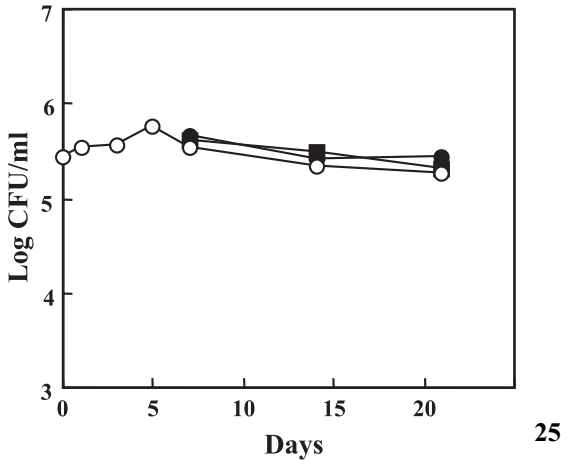

図10. 手賀沼湖水の土着微生物生菌数に及ぼす遺伝子組換え（●）および非組換え（■）PpY101 の影響。○；無接種のマイクロコズム中の土着微生

イクロコズムにおいて一般従属栄養細菌数を調べた結果を図11に示す。低含水率の黒ボク土壌においては接種した微生物は急激に減少したが，一般従属栄養細菌はいずれの含水率のマイクロコズムでもほぼ同数検出され両者の菌株の接種による影響は認められなかった。

本研究で用いた *P. putida* の接種は，水および土壌環境中の土着微生物の生菌数には影響を与えないことが示

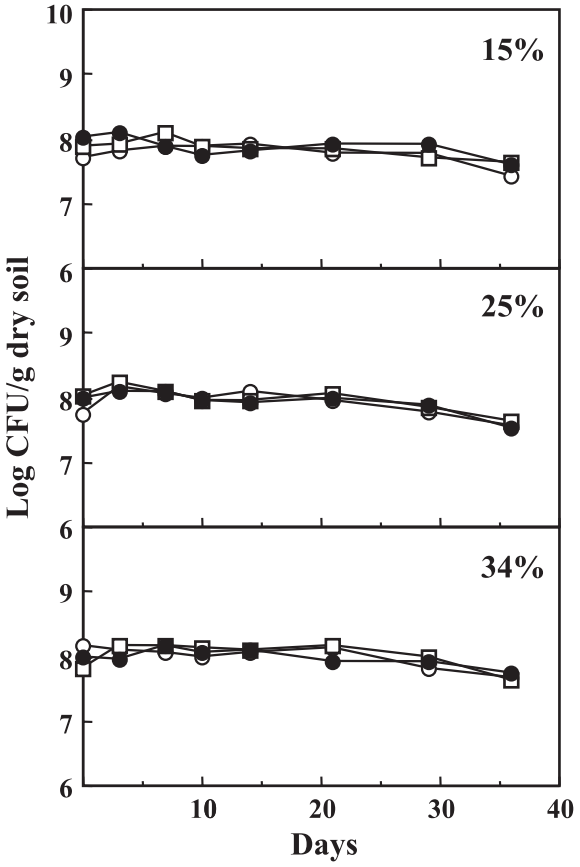

図11. 各種含水率の黒ボク土壌の土着微生物生菌数に及ぼす遺伝子組換え（●）および非組換え（■）PpY101 の影響。○；無接種のマイクロコズム中の土着微生物生菌数。

された。Orvos ら[22] は，宿主および遺伝子組換え *E. carotovora* が土壌微生物影響を及ぼさないことを示している。また，Jones ら[13] は，5 種類の組換え体およびその宿主は土壌の窒素循環に影響を及ぼさないことを報告している。しかし，組換え *Streptomyces lividans* は，土壌中の有機炭素の代謝速度に影響を及ぼすことが示されている[32]。このようにこれまでの知見では，微生物の生態系に及ぼす影響は，試験する微生物によってそれぞれ異なっている。環境中に組換え体のような培養微生物を多量に接種した場合，土着微生物の生菌数に対する影響はほとんど検出されないが，その中身すなわち微生物生態系構成メンバーに対しては何らかの影響を及ぼしているのかもしれない。

5. 環境省プロジェクト

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メンバー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が急速に発展してきている。そこで本プロジェクトにおいて筆者は，近年開発されてきた PCR-DGGE 等の新しい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担当している。

5.1. マイクロコズム試験

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湖水を対象とした。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。2 L 容プラスティック製三角フラスコに前述の供試微生物を約 10^7 CFU/ml になるように接種した供試水 1 L を分注した。各系は三連用意し，組換え体を接種した系 G-1～G-3，非組換え体を接種した系 H-1～H-3，菌体を無接種の系 C-1～C-3 とした。これらをマイクロコズムとして暗所，20°C の恒温室に設置し，60 rpm で緩やかに振とうした。

5.2. 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。なお培養法による一般従属栄養細菌の菌数に関してはこれまでの知見と同様に組換え体接種による環境微生物数への影響は認められなかった。

PCE-DGGE 分析の結果，各系のバンドパターンは試験期間後期では類似してきたが，菌体接種の影響を受けたと考えられるバンド，すなわち微生物種が存在することが示唆された。PCR-DGGE 分析ではその結果の再現性が非常に重要であるが，本研究では数多く PCR および DGGE を繰り返し実験することにより処理のロット

による再現性，また3連のマイクロコズム間での再現性も十分に認められることを確認している。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微生物接種の影響をほとんど検出できなかったが，本研究により微生物多様性に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後はこうした微生物を分離して，遺伝子組換え微生物あるいはその宿主との相互作用を検討する必要があるだろう。

6. おわりに

前述したように，遺伝子組換え微生物のいわゆる開放系利用を目的とした第一種利用申請は現時点では，なされてはいない。しかしながら，家畜の病気や農作物の虫害を防ぐ等の農林分野や，有害化学物質の浄化等の環境保全分野をはじめとして，開放系利用を目指した多くの遺伝子組換え微生物が世界中で開発されてきている。近い将来，こうした遺伝子組換え微生物の第一種利用の申請がなされることは想像に難くない。これまでの知見から遺伝子組換え微生物接種による土着微生物への影響はほとんどないものと考えられる。しかし一部の微生物種において影響が生じる可能性も示唆される結果が得られており，今後引き続き安全性を評価するための情報を蓄積していくことが必要であろう。また，平成17年3月に「微生物によるバイオレメディエーション指針（経済産業省，環境省）」か告示されており，この中で利用する微生物の影響評価の必要性が示されている。遺伝子組換え微生物の影響評価は，その組換え遺伝子の伝播に関する点を除けば培養微生物のそれとほぼ同一の手法で実施できると予想される。従って，遺伝子組換え微生物の安全性評価に関する検討は，バイオレメディエーション等の有用微生物の開放系利用においても有効な情報を与えるものと考えられる。

本研究の一部は，地球環境研究総合推進費「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（研究代表：東京大学矢木修身教授）」の委託により実施された。

文　献

1) Alexander, M. 1981. Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. Ann. Rev. Microbiol. 35: 113–133.
2) Bathe, S., T.V. Mohan, S. Wuertz, and M. Hausner. 2004. Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer. Water Sci. Technol. 49: 337–344.
3) Caldwell, B.A., C. Ye, R.P. Griffiths, C.L. Moyer, and R.Y. Morita. 1989. Plasmid expression and maintenance during long-term starvation-survival of bacteria in well water. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1860–1864.
4) Devanas, M.A., D. Rafaeii-Eshkol, and G. Stotzky. 1986. Survival of plasmid-containing strains of *Escherichia coli* in soil: effect of plasmid size and nutrients on survival of hosts and maintenance of plasmids. Curr. Microbiol. 13: 269–277.
5) Dupler, M., and R. Baker. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. Phytopathol. 74: 195–200.
6) Fenchel, T. 1980. Suspension feeding in ciliated protozoa: feeding rates and their ecological significance. Microb. Ecol. 6: 13–25.
7) Gurijala, K.R., and M. Alexander. 1990. Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1631–1635.
8) Hashimoto, A., K. Iwasaki, M. Nakajima, and O. Yagi. 2001. Quantitative detection of trichloroethylene-degrading *Mycobacterium* sp. TA27 with a real-time PCR product detection system. Microb. Environ. 16: 109–116.
9) Iwasaki, K., H. Uchiyama, and O. Yagi. 1993. Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in aquatic microcosms. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 1264–1269.
10) Iwasaki, K., H. Uchiyama, and O. Yagi. 1994. Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in soil microcosms. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 156–159.
11) Iwasaki, K., O. Yagi, Y. Ishibashi, and H. Seto. 2000. Survival and effect of genetically engineered pseudomonads in the soil environment. Environ. Sci. 13: 483–489.
12) 岩崎一弘，奥田喜弘，矢木修身．2005．微生物間の遺伝子伝達．農業および園芸．80: 185–190.
13) Jones, R.A., M.W. Broder, and G. Stotzky. 1991. Effects of genetically engineered microorganisms on nitrogen transformations and nitrogen-transforming microbial populations in soil. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3212–3219.
14) Kikuchi, T., K. Iwasaki, H. Nishihara, Y. Takamura, and O. Yagi. 2001. Quantitative and specific detection of a trichloroethylene-degrading methanotroph, *Methylocystis* sp. strain M, by a most probable number-polymerase chain reaction method. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 2673–2681.
15) Kikuchi, T., K. Iwasaki, H. Nishihara, Y. Takamura, and O. Yagi. 2002. Quantitative and rapid detection of the trichloroethylene-degrading bacterium *Methylocystis* sp. M in groundwater by real-time PCR. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 731–736.
16) Liang, L.N., J.L. Sinclair, L.M. Mallory, and M. Alexander. 1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. Appl. Environ. Microbiol. 44: 708–714.
17) Morel, J.L., G. Bitton, G.R. Chaudhry, and J. Awong. 1989. Fate of genetically modified microorganisms in the corn rhizosphere. Curr. Microbiol. 18: 355–360.
18) Nishio, M., and C. Furusaka. 1971. Kinetic study of soil percolated with nitrite. Soil Sci. Plant Nutr. 17: 61–67.
19) Okino, S., K. Iwasaki, O. Yagi, and H. Tanaka. 2000. Development of a biological mercury removal-recovery system. Biotechnol. Lett. 22: 783–788.
20) Okino, S., K. Iwasaki, O. Yagi, and H. Tanaka. 2001. Removal of mercuric chloride by immobilized cells of genetically modified *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134. J. Environ. Biotechnol. 1: 41–47.
21) Okino, S., K. Iwasaki, O. Yagi, and H. Tanaka. 2002. Removal of mercuric chloride by a genetically engineered mercury-volatilizing bacterium *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68 : 712–719.
22) Orvos, D.R., G.H. Lacy, and J. Cairns Jr. 1990. Genetically engineered *Erwinia carotovora*: Survival, intraspecific competition, and effects upon selected bacterial genera. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1689–1694.
23) Postma, J., and J.A. van Veen. 1990. Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil. Microb. Ecol. 19: 149–161.
24) Ramos, J.L., E. Duque, and M. Ramos-Gonzalez. 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 57: 260–266.
25) Scanferlato, V.S., D.R. Orvos, J. Cairns Jr., and G.H. Lacy. 1989. Genetically engineered *Erwinia carotovora*

in aquatic microcosms: survival and effects on functional groups of indigenous bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1477–1482.
26) Senoo, K., M. Nishiyama, H. Wada, and S. Matsumoto. 1992. Differences in dynamics between indigenous and inoculated *Sphingomonas paucimobilis* strain SS86 in soils. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 311–320.
27) Sinclair, J.L., and M. Alexander. 1989. Effect of protozoan predation on relative abundance of fast- and slow-growing bacteria. Can. J. Microbiol. 35: 578–582.
28) Trevors, J.T., J.D. van Elsas, M.E. Starodub and L.S. van Overbeek. 1989. Survival of and plasmid stability in *Pseudomonas* and *Klebsiella* spp. introduced into agricultural drainage water. Can. J. Microbiol. 35: 675–680.
29) Trevors, J.T., J.D. van Elsas, L.S. van Overbeek, and M.E. Starodub. 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. Appl. Environ. Microbiol. 56: 401–408.
30) Vargas, R., and T. Hattori. 1986. Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 233–242.
31) Vargas, R., and T. Hattori. 1990. The distribution of protozoa among soil aggregates. FEMS Microbiol. Ecol. 74: 73–78.
32) Wang, Z., D.L. Crawford, A.L. Pometto III, and F. Rafii. 1989. Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem. Can. J. Microbiol. 35: 535–543.
33) Yeung, K.A., M.A. Schell, and P.G. Hartel. 1989. Growth of genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3243–3246.
34) Zechman, J.M., and L.E.J. Casida. 1982. Death of *Pseudomonas aeruginosa* in soil. Can. J. Microbiol. 28: 788–794.