

組換え微生物の開放系利用における安全性評価手法の開発

Technology to Evaluate Bio-Safety of the Genetically Modified Microorganisms for Environmental Use

野田 尚宏, 鎌形 洋一, 丸山 明彦

NAOHIRO NODA, YOICHI KAMAGATA, AKIHIKO MARUYAMA

金川 貴博, 中村 和憲*

TAKAHIRO KANAGAWA and KAZUNORI NAKAMURA

独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1

* TEL: 029-861-6054 FAX: 029-861-6141

* E-mail: kazunori-nakamura@aist.go.jp

Institute for Biological Resources and Functions, National Research Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japan

キーワード : 組換え微生物, 開放系利用, 安全性評価, 微生物の定量解析, 微生物相解析

Key words: genetically modified microorganisms, environmental use, bio-safety, quantitative analysis of microorganisms, analysis of microbial consortia

(原稿受付 2005年10月15日 / 原稿受理 2005年12月1日)

1. はじめに

カルタヘナ条約国内担保法「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」、いわゆるカルタヘナ法に基づいて生物多様性への影響が評価され、安全であることが確認された組換え微生物は輸出入が可能となるとともに、環境等開放系での利用(第1種使用)が可能となった。組換え微生物はこれまで、医薬中間体や酵素などの生産のため、閉鎖系のバイオリアクターでは既に長い間利用(第2種使用)されてきた歴史があるが、わが国においては第1種使用の例はまだない。

これは、バイオレメディエーションなどを目的に、開放系での利用に耐えうる、優れた組換え微生物を創出することがきわめて困難であることも一因と考えられるが、開放系での利用の際の安全性を科学的に評価するための技術、あるいはリスクコミュニケーションの手法がまだ確立されていないことが大きな要因となっている。特にカルタヘナ法の下では、使用する微生物のヒトに対する毒性や病原性以外にも、生物多様性への影響、すなわち使用する環境等に生息する動・植物、微生物に対する影響も評価した上で、使用することが義務づけられている。また、新規な宿主を使用した組換え微生物を閉鎖系利用(第2種使用)で用いる場合の封じ込めレベルの評価にも、同様な手法の確立が望まれるところである。

以上のような背景のもと、生物機能活用型循環産業システム創造プログラム(経済産業省)の中で、「環境中微生物の高精度・高感度モニタリング技術の開発」が実

施されている。本研究は、組換え微生物の安全性評価に資するため、組換え微生物を含む特定微生物を定量評価する技術と、組換え体が導入された環境の微生物相の変化を定量的に解析する技術の開発を目的としている。また、このような開発された技術を利用して組換え微生物の環境影響を、モデル微生物生態系を利用することにより評価する試験手法の開発も合わせて実施している。本研究開発には(独)産業技術総合研究所(産総研)生物機能工学研究部門、および大阪大学薬学研究科が参画しているが、ここでは産総研で実施している研究内容を中心に紹介したい。

2. 特定微生物をいかに標識し追跡するか?

組換え微生物を追跡する一般的な方法としては、抗生物質に対する耐性をあらかじめ付与しておき、抗生物質を含む培地で出現するコロニー数をもって組換え体の数とする、という方法や 16S rDNA や特定の機能遺伝子など、その微生物種に固有の遺伝子を標的にして遺伝子増幅(PCR)を行い、その存在を確認する方法が考えられる。しかし、組換え微生物等が環境に放出された時、その環境中にもともとその抗生物質に対する耐性微生物が多数存在している可能性があり、決定的な計数法にはならない。また薬剤耐性は他の微生物へ水平伝播する可能性もある。16S rDNA など、その微生物種に固有の遺伝子を標的にした PCR 法においても、系統的に近い微生物が環境に存在する場合、明確に識別することが困難なことが予想される。

そこで、このような問題を解決するために微生物を標識化して検出するための分子遺伝学的手法を検討した。ここで留意すべき点は、想定される組換え体微生物には染色体 DNA はもちろんのこと、プラスミド DNA、さらには、その生物に新機能を付与するために染色体やプラスミド上に組み込まれた特定構造遺伝子（例えば PCB 分解遺伝子といったもの）などが含まれているということである。このことは、染色体 DNA の挙動を追跡することが、即ち組換え体微生物を追跡したことにはならず、挿入されたプラスミドや特定構造遺伝子をも追跡する必要があることを意味している。プラスミドやプラスミド上（あるいは染色体上）の特定遺伝子が脱落したり、他の宿主に伝播する可能性は常にあり、宿主本体を追いかけるだけでは、組換え体を追跡することにはならないからである。

具体的には *Escherichia coli* ならびに *Pseudomonas putida* をモデル微生物として、まずこれらの宿主微生物の追跡モニタリングのために、染色体上に緑色蛍光タンパク質 (gfp) を導入することを試みた。gfp 遺伝子はオワンクラゲ由来であり、微生物には類似遺伝子は存在せず、かつ蛍光検出および PCR 検出が可能である。染色体への導入位置については種々の議論があるが、一般にマルチコピーで、そのうちのひとつが機能しなくても生存を脅かさない遺伝子として *rrn* (ribosomal RNA 遺伝子群) を選んだ。相同組換えによって *E. coli* ならびに *P. putida* に *rrn* 中の 16S rRNA 遺伝子内に gfp の導入を試みたところ、いずれの菌株も緑色蛍光を発し、遺伝子の発現が認められた。

プラスミドの標識はサンゴ由来の赤色蛍光蛋白遺伝子 (dsr) を選び組み込んだ。こうして宿主は二つの蛍光蛋白遺伝子によって標識化されたことになり、充分な菌密度さえあれば落射蛍光によって、また菌密度が低い場合には PCR によって検出できるようになった。落射蛍光顕微鏡による視覚検出においては、もしプラスミドの脱落が起きれば、緑色蛍光のみをもつ宿主として観察されるし、プラスミドが他の微生物に伝播したときには赤色蛍光のみをもつ微生物として検出が可能になる。

続いて特定構造遺伝子の標識化を試みた。組換え微生物の環境導入の可能性は、ひとえに通常の微生物にはない機能や活性を微生物に付与する場合に限られるというて良い。もし通常の非組換え微生物で充分機能を果たしうらば、組換え微生物の環境導入はもとより不要である。そこで、いくつかのジオキシゲナーゼ遺伝子をモデル遺伝子として、酵素活性を失わせることなく、構造遺伝子内に in frame で短い塩基配列を導入したり、コドンの同義置換などを行う方法を開発している。このように改変された遺伝子は、改変部分を含むプライマーを用いた PCR を行うことによって環境中にもともと存在する類似の遺伝子と識別が可能になる。このため、ビフェニル代謝に関連する *bphC* 遺伝子をターゲットとし、この配列中、9 箇所に同義置換を入れたものを作成し、特異的な検出が可能であることを明らかにしている。図 1 にこうして得られた標識微生物の全体像を示した。

3. PCR を用いた特定微生物の定量検出は可能か？

微量にしか存在しない微生物を検出する方法として近年急速に進展している手法は、細胞から抽出した DNA を、PCR によって検出定量するやり方である。定量的 PCR 法としては、TaqMan 法や SYBR-Green 等のインターカレーターを利用したリアルタイム定量 PCR 法が知られている。この方法を利用して、細菌相を解析する場合、それぞれの細菌群に特異的な DNA 配列を利用して定量することになるが、類似配列が混じっている群集 DNA を鋳型にして PCR を行くと、その増幅のされかたに偏りが出たり、誤りが出たりして正確な定量ができなくなる恐れがある。正確な分析を行うためには、このような偏りや誤りの原因を明らかにして、その対処方法を明らかにすることが必要である。PCR の偏りとして、もっとも良く知られた問題の一つにいわゆる“1:1 バイアス”の問題がある。これは複数種の細菌からの DNA を増幅した場合に、PCR 中に増幅の偏りが起こって、それぞれの DNA の存在比率が 1:1 に近づくというものである。さらに、PCR に基づく解析で、誤りを引き起こす原因の一つとして heteroduplex の生成が挙げられる。そこで、この二つの問題についてまず検討を行った。

3.1. 1:1 バイアスのメカニズムとその解決方法

Suzuki & Giovannoni (1996) は、2 種類の菌の DNA を混合して PCR で増幅すると、初期のそれぞれの DNA の存在比にかかわらず、最終的には存在比が次第に 1:1 に近づいてくるという指摘をしている⁹⁾。もしもこのような偏りが細菌相解析で起こった場合、データの信頼性が著しく損なわれてしまう。そこで、この偏りの原因を追究し、その原因と解決策を見出す研究を行った。

モデルとして用いた 2 種類の細菌 *Pseudomonas fluorescence* と *Agromyces medislanum* から抽出した DNA を PCR で増幅し、この増幅産物を 1:9, 1:3, 1:1, 3:1, 1:9 の割合で混合した。これをさまざまな条件のもとに PCR で増幅して、増幅産物の偏りを調べた。この結果、PCR サイクルにおいて denature (95°C) から annealing (56°C) への温度低下の速度が遅いと、偏りが大きくでることがわかった³⁾。アルミブロックを用いるタイプの装置での PCR は温度の低下速度が 1 秒につき約 1°C である。この条件では、Suzuki & Giovannoni が報告したとおりの偏りが大きくでた。これに対して、熱風と冷風とを用いるタイプの装置では、温度の低下速度が 1 秒につき 20°C であり、この場合は偏りが出なかった。温度の低下が遅い場合は、温度の降下過程で増幅産物の相補鎖同士の結合が起こり、増幅産物量の多いものほどこの結合確率が高いことから偏りが生じたと推論される。これに対し、温度低下が速い場合には、温度低下の途中での相補鎖同士の再結合が少なくなると推論された。これらの結果から、PCR バイアスを低減するには温度低下の速い装置（条件）を使うことが重要であることが判明した。また、偏りが PCR の後半に起こっていることから、偏りが大きくなる前に PCR を終わるというのも有力な方法であるということがわかった。

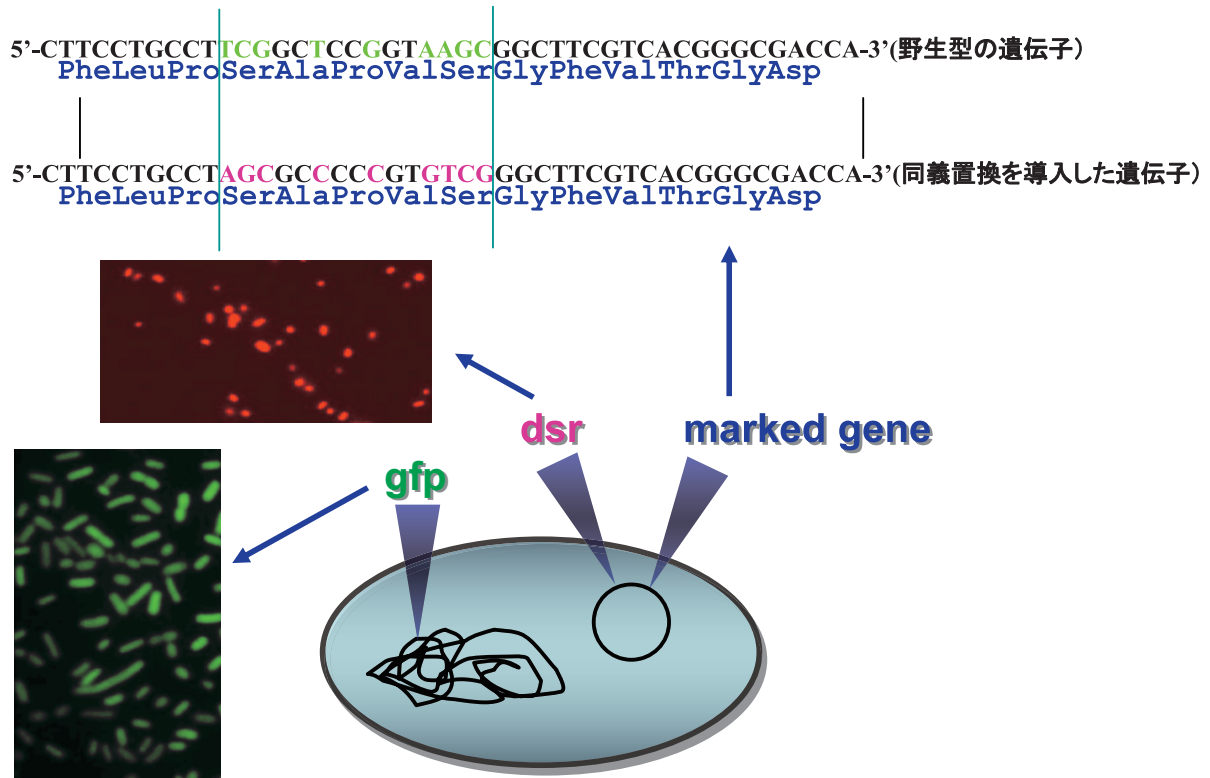


図1. 微生物の標識化の概略図。

染色体、プラスミド、組換え遺伝子の3つをそれぞれ *gfp*, *dsr*, 同義置換等で標識した微生物を構築した。同義置換によって標識化された遺伝子の一部を図中に示した。この場合、15塩基（5アミノ酸）のうち9塩基を置換している。こうして置換した配列はユニークで類似の既知遺伝子には見られない配列であることからPCRによる特異検出を可能にする。

3.2. Heteroduplex の生成と解消

Heteroduplex は、相補的でないDNAが2本鎖を形成したもので、複数種の細菌の混合物から抽出したDNAを鋳型にこれらの菌に共通のプライマーを用いてPCR増幅した場合、特にPCRの後期に多く生じるといわれている。heteroduplex は相補的なDNAによる二本鎖(homoduplex)とは電気泳動での移動度が異なるため、DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) などの解析で余分なバンドやピークを生じる原因になる。また、T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) においては制限酵素で切断できなくなることがあるため、本来とは異なったピークが生ずることがある。そのため、heteroduplex の生成は菌相の解析に誤りを引き起こす可能性がある。そこで、PCRサイクル数とheteroduplex生成率の関係を調べ、さらにheteroduplexの簡便な解消方法として、Reconditioning Cycle (RC) が有効であることを明らかにした。RCとはheteroduplexのT_mがhomoduplexより少し低いことを利用してheteroduplexだけを解離させてhomoduplexへの再生をねらったものである。

モデルとして用いた *Thiothrix eikelboomii* および *Thiothrix flexilis* の純粋菌株から抽出したDNAを等量混合し、16S rDNAの一部を共通のプライマーを用いてPCRで増幅した。プライマーの一方には5'末端を蛍光物質のBODIPY FLで修飾したものを²⁾、PCR後に産物を制限酵素 *Bst*UI で切断し、断片長をDNAシーク

エンサーを用いて調べて、heteroduplexの生成割合を算出した。その結果、heteroduplexの存在率はPCRのサイクル数が25サイクルのときはPCR産物の約6%、30サイクルでは10%、35サイクルでは23%、55サイクルでは35%であり、PCRのサイクル数が増加するとともにheteroduplexの生成量が増加していくことがわかった。次に、PCR(35サイクル)の後にheteroduplex解消のために熱変性ステップ(80–88°C, 60 sec)と再会合ステップ(74°C, 15 sec)を1–8サイクル繰り返すRCを行った。RCのdenature温度はheteroduplexの解消に大きな影響



図2. MultiFISH-DC法により7種の標準菌株を7色で染め分けた例。

を及ぼすことがわかり、denature 温度が 84°C のときに最も効率的に heteroduplex を解消することができた。また RC のサイクル数が多いほど heteroduplex の解消率が高かった。一方、denature 時間、再会合時間および再会合温度を変化させても heteroduplex の解消に大きな差は見られなかった。このように、PCR 終了後に 5 サイクル (10分程度) の RC を付加するだけで heteroduplex の 90%以上を homoduplex へ再生することができた。

4. 特定微生物を導入する環境の微生物相変化をどこまで解析できるか？

組換え微生物を環境に放出した場合、受け手側としての環境微生物相はどのように変わるのか？この問いは単に組換え微生物の導入に限らず、あらゆる外的攪乱要因 (例えば化学物質や有機物の流入、温度変化など) によってもたらされる微生物相変化をいかに適確に把握できるかと言う普遍的命題につながるものである。残念ながらこの命題に対する明快な解は依然としてない。加えて命題そのものに多くの問いが包含されている。第一にどのような系統分類レベルで微生物相の変化を捉えれば良いか？種、属あるいはそれ以上のグループ別に捉えれば良いのか？それともヒトにとって病原性のある菌の出現の有無だけ見れば良いのか？どのような解像度 (感度) で微生物相の変化を捉えれば良いか？ 10^0 /グラム試料のうちの 1 個の微生物まで検出する必要があるのか、あるいは 10^4 レベル (それでも全体の10万分の1) 程度で存在する微生物群の消長を捉えればよいのか？あるいは%のオーダーで存在する微生物群だけを見れば良いのか？第二にもし相変化を捉えようとする場合、どのような分子種を用いて行えば良いのか？DNA, RNA, 普遍性の高い化学成分 (例えばキノンや脂肪酸など) といった分子種から特定の遺伝子や化学成分に至るまで多くの選択肢が存在する。これらの問いはいずれも何をどこまで知りたいか、あるいは何をどこまで知れば良いのか、という本質的な問題と密接に関わっている。

本研究プロジェクトにおいては、これらの問題をすべて網羅することはできないため、以下のようなアプローチで研究を行っている。まず、(1) 対象分子種を DNA ならびに rRNA とする。(2) 門レベルあるいは綱レベルの解像度で細菌の系統群別に微生物相を解析する。(3) FISH のような視覚的解析手法、dot blot hybridization のような rRNA を標的にした定量手法、T-RFLP や DGGE

のような解析と定量を兼ね備えた手法を主に用い、これらの手法を微生物相の迅速高精度検出のために改良を加える。(4) 解析の対象とする環境試料は初期段階では、既知微生物を混合した単純な微生物混合系やそれぞれの研究者が得意としてきた試料 (海洋堆積物や土壌など) から始め、最終的には実験室内でのハンドリングが容易な活性汚泥を対象に解析を行う。以下に個々の研究概要について述べる。

4.1. FISH や dot blot hybridization のためのプローブ作成

FISH や dot blot hybridization などを微生物相解析に適用するためには、微生物の系統進化的位置によって、微生物を大きくグルーピングし、それぞれのグループにきわめて特異性の高いプライマーやプローブを設計し、より高精度・高解像度な検出技術の開発を行うことが重要となってくる。そこで、本研究では、さまざまな環境中の微生物多様性を可能な限り把握し、その上で新たな分子系統群別グループ識別プローブ (門や綱レベル) の開発を行うこととした。本研究の最初期段階においては2002年に東京湾中央部から採取した表層や近底層水中の微生物試料をモデル試料として用いて解析を行った。Eubacteria および Universal プライマーを用いて PCR を行い、冬期と夏期合わせて129クローンを得た。系統解析の結果、alpha-Proteobacteria グループに属すると思われるものが最も多く23%、Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides グループが16%、gamma-Proteobacteria が12%、beta-Proteobacteria が2%、Gram positive グループが10%、Planctomycete が5%の割合で出現した。この他、Cyanobacteria グループが夏期試料でのみ23%、Eukarya が7%、その他が2%であった。また、東京湾中央部海水より得られた微生物クローンの配列 (700~1500塩基) と、既知の配列との相同性をデータベース上で調べたところ、Cyanobacteria と Eukarya を除くバクテリア、90クローン中52クローンが相同性97%未満の未知微生物である可能性が示された (表1)。このように、得られたクローンの多くが未知のものであることが判明したため、これらの環境クローンに対し既存のプローブ (alpha-Proteobacteria には ALF1b⁴⁾, gamma-Proteobacteria に対しては GAM600⁶⁾) が有効であるか否かを検討した。その結果、プローブ塩基配列内にミスマッチが2個以上もあり、実際に検出されていない場合があることがわかった (表2)。

表1. 東京湾中央部資料から得られた未知微生物の割合。

	相同性97%未満	総クローン数	割合 (%)
Alpha-Proteobacteria	11	29	38
Gamma-Proteobacteria	8	16	50
Beta-Proteobacteria	2	2	100
CFB group	18	20	90
Gram Positive	5	15	33
Planctomycete	6	6	100
Others	2	2	100
Total	52	90	58

表 2. 東京湾微生物クローン等に対する各種プローブのミスマッチ数。

Alpha-Proteobacteria	ALF 1b	Gamma-Proteobacteria	GAM660
TKB p06	2	TKB B13	0
TKB b05	2	TKB b12	3
TKB b04	1	TKB b11	3
TKB p03	1	TKB B04	2
TKB b06	1	TKB B25	4
TKBS b22	0	TKB B29	4
TKBS b9	0	TKBS b02	5
TKBS B1	0	TKBS s01	6
<i>Roseobacter litoralis</i>	0	<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Erythrobacter longus</i>	0	<i>Spirillum volutans</i>	5
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	<i>Alteromonas macleodii</i>	2
<i>Methylobacterium extorquens</i>	1	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	2
<i>Rickettsia rickettsii</i>	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
		<i>Vibrio vulnificus</i>	3

* TKB は今回得られた東京湾からのクローン。

そこで、これら既存のプローブに代わりうる新しいプローブ塩基配列の検討を行い、alpha-Proteobacteria では従来のものより適合率の高い ALFII プローブを新たに考案した。また、gamma-Proteobacteria に対しては得られた環境クローンの配列をもとに GamIII と GamIV を新たにデザインした。

4.2. rRNA を標的とした構成微生物の視覚化技術 — multi-FISH—の開発

現在、環境中に生息する全微生物の検出および定量化には、蛍光染色剤と蛍光顕微鏡を用いた視覚化・定量化技術（直接計数法）が一般的に用いられている。これに加え、特定微生物群を視覚的に分別検出する技術としては、特定の構造遺伝子や rRNA に特異的な蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる FISH 法が急速に普及しつつある^{1,8)}。

これら顕微鏡解析を基盤とした手法は、全菌数とその構成微生物を細胞単位で解析できることから、全微生物相の解析には極めて優れた手法である。しかし、環境試料に適用する場合、標的微生物以外の夾雑物からの擬似蛍光、蛍光プローブの非特異的結合による background の上昇、標的 RNA 含量の低い（活性の低い）自然環境微生物を対象とした場合の検出感度の低下、微生物種や生育状況による蛍光プローブの膜浸透性の問題などにより、結果の信頼性が低下する。また、画像処理技術が未成熟なこともあり、試料によっては微生物細胞の認識や計数に多大な時間と労力を要するという問題もある。さらに、現行法では一度の処理で解析可能な微生物群が 3 種程度に限られており、迅速な微生物相解析を行う上では、より多数の微生物群を効率的に検出するための技術開発が必要となっている。

そこで本研究では、顕微鏡を利用した細胞レベルでの検出、解析手法を基盤とし、上記のような自然環境試料への適用を阻む基本的な問題点の解決に取り組むとともに、組換え体などの特定微生物と一般環境微生物とを、定量的に、再現性良く、しかも多数の微生物を同時に検出できる手法（従来法より信頼性や利便性に優れた

multi-FISH-DC 法）の開発を目指して研究を行った。

通常の FISH 法では、それぞれに異なる微生物種（または群）を識別し得るオリゴヌクレオチドを合成した後、B, G, R の各励起光に対応する蛍光色素（例えば、FITC, TRITC, Cy5）でラベルし、それぞれの蛍光を検出することで各々の微生物種を同時に識別する。ここで、上記蛍光色素の組み合わせを検出しようとした場合、原理的には「2 (B 励起蛍光物質の有無) × 2 (G 励起蛍光物質の有無) × 2 (R 励起蛍光物質の有無) - 1 (全部ないものは検出できないため) = 7 通り」の識別が可能であり、最大で 7 種の異なる微生物を識別し検出することが可能になると考えられる。

考案した上記手法の有効性を検証するため、それぞれに異なる系統群に属する微生物 7 種を選別し、それぞれの標準菌株を入手した。すなわち、*Methylobacterium extorquens* (alpha-Proteobacteria), *Comamonas testosteroni* (beta-Proteobacteria), *Pseudomonas aeruginosa* (gamma-Proteobacteria), *Cellulophaga lytica* (Cytophaga), *Micrococcus luteus* (Gram positive High G+C group), *Arcobacter nitrofigilis* (epsilon-Proteobacteria), *Aeropyrum pernix* (Archaea) を入手し、それぞれを培養した後、おおそ 1 対 1-4 の割合になるよう細胞を混合し同時染色・識別用の試料とした。一方、これら微生物 7 種を識別するため、それぞれが属する門や綱レベルのプローブを合成、上述した原理に基づき上記 3 蛍光色素で標識した（表 3）。その後の FISH-DC 解析に用いた装置や条件、手順などは、既報に準じた⁹⁾。

実験の結果、図 2 に示したように微生物混合系中の 7 種類の微生物細胞は、3 種類の蛍光色素の 7 通りの組合せで標識され、それぞれ白、赤、青、緑、黄色、紫、水色で表示することが可能であり、画像上での分別計数も可能であることが実証された。すなわち、標準菌株を対象に、目標とした微生物細胞 5 種以上の同時識別・計数に成功した⁷⁾。

表 3. 検出しようとする微生物系統群と標識した蛍光色素の組み合わせおよび画像解析上割り当てた色。

	FITC	TRITC	Cy5	Synthesized color	Formamide (%)*
α -Proteobacteria	+	+	+	White	20
β -Proteobacteria	+	+	-	Yellow	35
γ -Proteobacteria	+	-	+	Cyan	35
Cytophaga-Flavobacterium	-	+	+	Magenta	35
Gram Positive High GC	+	-	-	Green	20
ϵ -Proteobacteria	-	+	-	Red	20
Archaea	-	-	+	Blue	20

* プローブ識別の特異性を実現するハイブリダイゼーション時のフォルムアミド濃度条件。

4.3. 蛍光 dot blot hybridization を用いた構成微生物群の定量化技術

増幅エラーの問題をかかえた通常の PCR 法に立脚せず、環境中に存在する多様な微生物相の解析を行う手段として、微生物 RNA 抽出試料を対象とした blot hybridization macroarray 解析手法がある。この手法は、FISH での蛍光検出や PCR 反応に阻害的な要因を有した試料にも適用することが可能であり、各種標準菌株やユニバーサルプローブなどを用いた補正を行うことで全微生物群集内での構成微生物群の相対的な割合を算出することも可能であるため、これら原理の異なる解析手法の有効性を検証する目的にも活用されている。そこで、制約の多い放射性同位体 (RI) を用いた従来法の欠点を見直し、一連の手法を RI を使用しない蛍光 dot blot hybridization (FDBH) 法の開発にいち早く成功している。

本研究では、FDBH 法を用いた構成微生物群の定量化手法の確立を目的とし、FDBH 法を基盤とした相対分子定量解析に基づく定量的ハイブリダイゼーション法を、これまで解析が困難とされていた堆積物や土壌試料へ適用するための方法について検討を行った。

まず、東京湾中央部に採取した海底堆積物を試料として、本手法の解析の精度や利便性の向上を進めるために、蛍光イメージアナライザーの定量性、リハイブリダイゼーション効率等に関わる検討を行った。その結果、0.05–50 ng/dot (大腸菌の rRNA 換算) の広い範囲での直線性、10回以上補正可能なリハイブリダイゼーションを実現した。これらの結果を踏まえ、様々な堆積物試料や土壌試料を対象に本手法の適用を行った。その結果、一部の土壌試料を除き、海底堆積物試料と同様に湖沼堆積物や水田土壌、蓮田土壌等の試料でも各微生物系統群の割合を定量的に見積もることができ、本手法が微生物相解析に有効であることがわかった。一方、バイオマスの少ない環境試料では多量の試料から核酸試料を調製する必要があること、また、環境試料中の微生物多様性を事前にある程度把握し適切なプローブセットを用いる必要があることなどを明らかにした。

4.4. QPrimer-PCR 法と T-RFLP 法を組み合わせた構成微生物群の定量化技術

環境中に存在する多様な微生物を一度に解析する方法として、現在、最も一般的に用いられている方法は DGGE 法である。しかし本法は既に述べたように、基本的に定性解析であり、微生物の存在比を正確に定量す

る技術ではない。DGGE 法は、一方のプライマーの端に20個程度のグアニン塩基を付加して用いるために、プライマーの特異性が低くなり、目的外の遺伝子を増幅する危険性がある。このために、電気泳動で1つのバンドしか生じないはずの試料で2つ以上のバンドが現れることもある。また電気泳動で生じるバンドのパターンを比較する際に、同一位置のバンドかどうかの判断が難しいケースもあって、データの信頼性が必ずしも高くない。また、バンドそのものから直接微生物の種類を推定することはできない。

そこで、現在 T-RFLP 法と定量的 PCR 法（ここでは末端に蛍光ラベルされた増幅産物が得られる QPrimer-PCR 法を採用した）を組み合わせた手法で、構成微生物種とその量を解析する新たな技術の開発を行っている。QP-PCR 法では特定の微生物グループを定量することはできるが、そのグループを構成する個々の微生物種を定量することはできない。新たにプライマーを設計して種ごとに個別に定量することも可能であるが、QP-PCR に限らずどの定量的 PCR 法でも1回の測定ごとに検量線が必要になって手間がかかるので、種ごとに定量的 PCR を行うよりは、増幅産物を T-RFLP で分別定量する方がはるかに手間が少ない。QP-PCR 法では蛍光色素がついた PCR 増幅産物が生成するため、この増幅産物を T-RFLP にそのまま利用して、種類ごとの存在比を出すことが可能になると考えられる。そこで、これを検証するために、モデル菌株群として *Thiothrix disciformis*, *T. eikelboomii*, *T. flexilis*, *T. unzii*, *T. nivea* を選び、それぞれの菌株から抽出した DNA を等量混合したもので QP-PCR を行い、その増幅産物について3種類の制限酵素 Hinf I, Hpy188III, BST UI をそれぞれ個別に用いて処理し、T-RFLP を行った。その結果、各菌株に固有のピークが示され、そのピークの比率から各菌株の存在比を計算したところ、*T. disciformis* : *T. eikelboomii* : *T. flexilis* : *T. unzii* : *T. nivea* = 12 : 20 : 29 : 20 : 19 となり、ほぼ等量ずつという結果が得られた (図3)。さらに、*T. disciformis* と *T. eikelboomii* の2者について、比率を変えて混合し、QP-PCR の後に、制限酵素 HinfI で処理して T-RFLP を行った結果、初期の比率を反映した結果が得られた (図4)。これらのことから QP-PCR に続く T-RFLP によって *Thiothrix* 属細菌の種別定量が可能であることがわかった。現在本手法が実際の微生物相解析に適用可能かどうか検討中である。

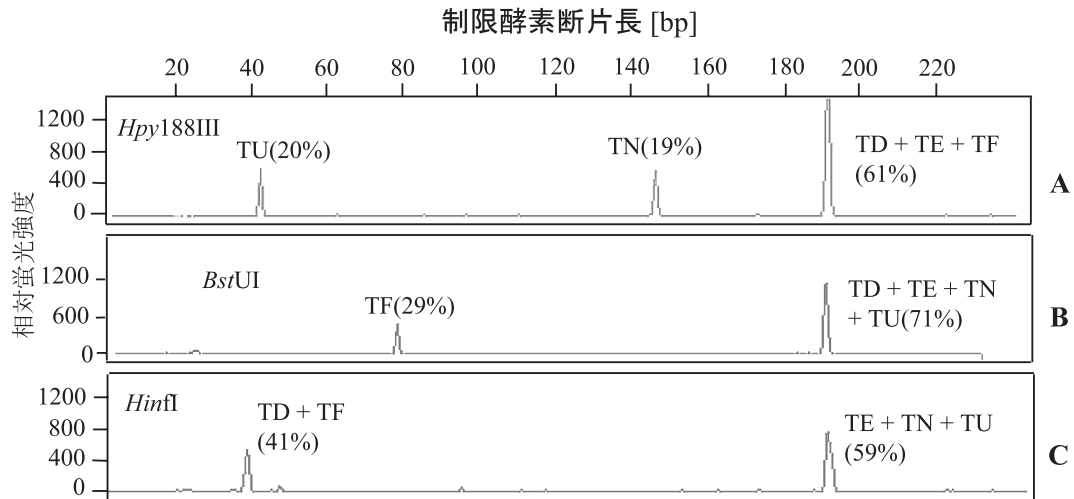


図3. 等量混合した5種の *Thiothrix* 属 (*T. unzii* (TU), *T. nivea* (TN), *T. flexilis* (TF), *T. disciformis* (TD), and *T. eikelboomii* (TE)) の T-RFLP の結果。
用いた制限酵素は、(A) *Hpy* 188III, (B) *Bst* UI, (C) *Hinf* I。

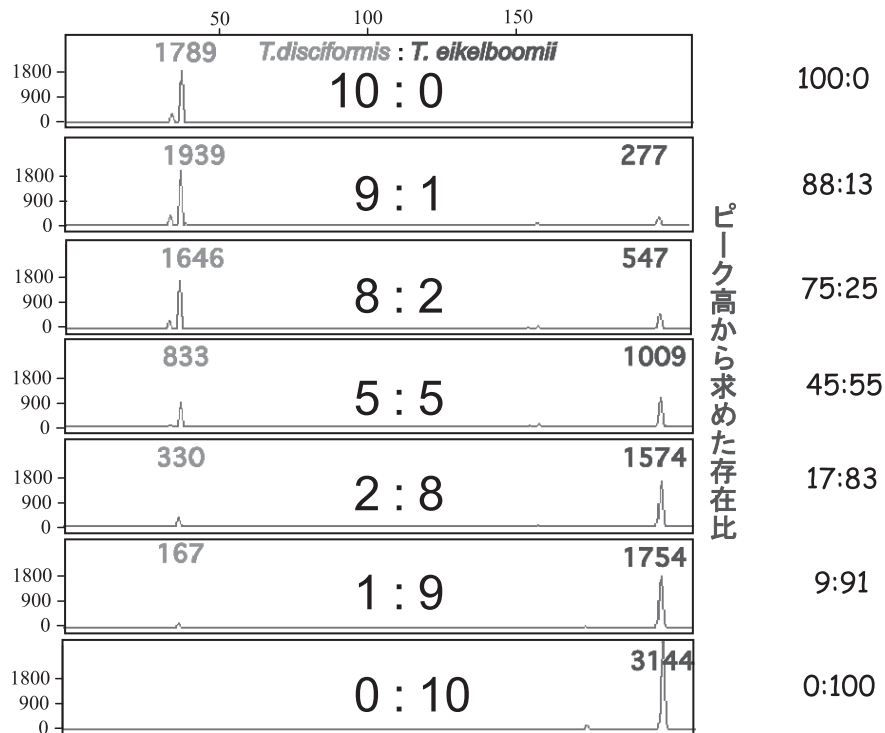


図4. *T. disciformis* と *T. eikelboomii* の2者混合系の T-RFLP。

5. 実際に組換え微生物を複合微生物系に導入して、組換え微生物自身と複合微生物系の微生物相変化をどこまで解析できるか？

環境中に放出された組換え微生物の挙動や、組換え微生物が環境に与える影響を事前に評価するには何らかのモデル微生物生態系が必要となる。モデル微生物生態系の構築にあたっては、組換え微生物が実際に利用される環境に近い環境を再現することが望ましいが、全ての環境を代表したモデル系の構築は事実上不可能である。また、我が国では現時点までに組換え微生物が開放系で利

用された例がないことから、現在広く利用されている閉鎖系での利用に係わる組換え微生物の安全性評価にも対応することを念頭に、モデル微生物生態系の構築を試みている。すなわち産業界において閉鎖系で使用した組換え微生物が環境に漏出するとすれば、排水溝から排水処理施設に入る経路や、下水道から下水処理施設へ入る経路が最も多いと考えられる。これらの処理施設では活性汚泥法が広く利用されているが、多様な微生物から構成される活性汚泥は、モデル微生物生態系として有用であると考えられる。そこで、各種排水処理施設や下水終末処理場で中心的に利用されている活性汚泥をモデル微生物

物生態系として選定し、ここにモデル組換え微生物を投入し、投入微生物の消長を追跡するとともに、活性汚泥微生物相の変化を動的に解析する実験を開始している。

解析にはこれまでに述べたさまざまな要素技術を用い、その有効性を検証しながら行っているところである。なお本実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」や文部科学省・環境省令「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」などにに基づき、組換え微生物が外界へ拡散しないような条件下（物理的封じ込め）で行われている。これらの点に留意しつつ、組換え体環境影響評価の実験は以下のように行った。

合成排水で運転馴養した活性汚泥を取りだし、マーカー遺伝子として *bphC* 遺伝子を付与した組換え微生物 (*P. putida*) を添加、三角フラスコで振とう培養した。三角フラスコの上部には組換え微生物の封じ込めが可能で、かつ通気性を有するシリコンスポンジ栓を装着した。1日1回、振とうを止め三角フラスコを安全キャビネット内に移し、汚泥試料を採取した。さらに、三角フラスコを15分間静置し、上澄みの一部を引き抜き、代わりに合成排水を添加した。組換え微生物の消長は定量的PCR法 (Qprimer-PCR) 法により追跡した。また、微生物相の解析はFDBH法により行った。

定量的PCRの結果を図5に示した。組換え体を接種した直後はマーカー遺伝子である *bphC* 遺伝子が 2.0×10^6 (copies/ng 抽出DNA) 検出されたが、次の日には10%になっていた。さらに4日目には初日の1%にまで減少した。その後は増減を繰り返しつつ実験終了日まで検出された。さらにFDBH法により微生物相の変遷をモニタリングした。組換え体接種系と接非接種系の微生物相を比較してみると、組換え体接種直後は組換え体 (*P. putida*) と思われる gamma-Proteobacteria の割合が一時的に上昇したが、1日経過後には減少した。それ以降は接種系と非接種系の微生物相に大きな違いは見られなかった。

このように定量的PCR法とFDBH法を用いることで、組換え微生物のモデル微生物生態系における消長と微生物相全体の動的变化を追跡することができた。今後はさらに複数の手法を組み合わせることで多面的に組換え微生物の消長と微生物相の動的变化を追跡する実験を行う予定である。

6. おわりに

組換え微生物の開放系利用を促進するためには、組換え微生物の導入が生物多様性へ及ぼす影響の評価を行う技術整備が必要不可欠である。そのような視点に立って実施されてきた「環境中微生物の高精度・高感度モニタリング技術の開発」プロジェクトでは、環境に導入した組換え微生物を高感度・高精度にモニタリングする技術を開発するとともに、導入された環境の微生物相の動的变化を高精度にモニタリングする技術の開発を行っている。特定微生物を検出・定量する技術は、組換え微生物の利用を促進するための生物多様性影響評価試験への適用のみならず、食品の微生物汚染検査、病原性微生

物の感染経路の解明などにも応用することが可能といえる。さらに、微生物相の動的变化を解析するために開発された技術は、微生物生態学の発展に大きく寄与するとともに、複合微生物系を利用した各種水処理プロセスの微生物診断、土壌中の汚染物質除去を目的としたバイオレメディエーションの経過観察、農業用地の微生物診断などへの応用が可能である。このように本プロジェクトで得られた成果は幅広い分野での応用が見込まれている。

また、本プロジェクトでは活性汚泥をモデル微生物生態系として用い、組換え微生物の消長と微生物相へ及ぼす影響を評価する研究を行っている。本研究により一定の成果は得られつつあるものの、実際に組換え微生物を使用する環境は、活性汚泥のみならず土壌、海水、淡水など多岐にわたる。今後は、これらの点を踏まえ、様々な環境ごとに適正なモデル微生物生態系を構築し、それらを用いた環境影響評価手法を確立することが急務であるといえる。

これまで、大学等の研究機関において組換え微生物を作製するための研究は数多く行われてきたが、それを開放系で利用することを前提としたモニタリング技術や生物多様性への影響評価技術を開発するための研究はほとんど行われてこなかった。しかしながら、作製した組換え微生物の開放系利用を目指してゆく場合、今後はさまざまな環境を想定した生物多様性影響評価手法の確立を行うことが重要となってくるであろう。また、分子生物学は日進月歩で進化しており、微生物のモニタリング技術についてもさらに簡便・迅速・ハイスループットな手法の開発が可能となってきた。そのため、モニタリング技術開発においても現状で満足することなく、たゆみない研究開発を推進することが肝要であるといえる。本プロジェクトは本年度（平成17年度）をもって終了となるが、組換え微生物の開放系利用が産業的に波及効果の高い課題であり、さらには一研究室が行うことのできる規模の研究課題ではないことから、引き続き政府機関等が主導となって研究開発を推進していくことが望まれる。さらにこのような研究は世界的にも例が少ないことから、わが国が先駆けて成果を出すことで、組換え微生物の開放系利用を目的とした生物多様性影響性評価手法の世界標準化が達成されることを望んでやまない。

謝 辞

本稿で紹介した大部分の研究は NEDO「環境中微生物の高精度・高感度モニタリング技術の開発」プロジェクトの一環として行ったものである。本研究の遂行にあたって、以下の研究員に厚く御礼いたします。北川航、三朝千稚、北村恵子、諸野祐樹、白政優子。また定量的PCRの技術面で指導頂いた蔵田信也博士に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kanagawa, T., Y. Kamagata, S. Aruga, T. Kohno, M. Horn, and M. Wagner. 2000. Phylogenetic analysis of and oligo-

- nucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5043–5052.
- 2) Kurata, S., T. Kanagawa, K. Yamada, M. Torimura, T. Yokomaku, Y. Kamagata, and R. Kurane. 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY[®] FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res.* 29: (6), e34.
 - 3) Kurata, S., T. Kanagawa, Y. Magariyama, K. Takatsu, K. Yamada, T. Yokomaku, and Y. Kamagata. 2004. Reevaluation and reduction of a PCR bias caused by reannealing of templates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7545–7549.
 - 4) Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria - problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593–600.
 - 5) Maruyama, A., and M. Sunamura. 2000. Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as target. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2211–2215.
 - 6) Ravensschlag, K., K. Sahm, and R. Amann. 2001. Quantitative molecular analysis of microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 387–395.
 - 7) Sunamura, M., and A. Maruyama. A digital imaging procedure for seven-probe-labeling FISH (Rainbow-FISH) and its application to estuarine microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* In press.
 - 8) Sunamura, M., Y. Higashi, C. Miyako, J. Ishibashi, and A. Maruyama. 2004. Two bacteria phylotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 955–959.
 - 9) Suzuki, M.T., and S.J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625–630.