

右端に, bacteria の division を示す. ほとんどの 16S rDNA クローンは *Proteobacteria* に属し, その割合は全体の66%となった. 2番目に優占度が高かったのは, *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* で13%の割合となった. その他5種類の division の細菌が検出されたが, 特に優占度が高いものはなかった. また, その出現井戸や期間によってグループ化できるものに関しては, 図中に①～⑤の記号を付記した. 微生物解析の期間中, メタン酸化性細菌の近縁種は, *Methylophilus* group, *Methylomonas methanica* subgroup, *Methylosinus trichosporium* subgroup の3種類が検出された. *Methylophilus* group は2種類が検出され, ②Aはメタン注入時, ②Bはメタン注入前後に検出された. 検出時期から分かるように, ②Aの *Methylophilus* group および③の *M. methanica* subgroup がメタン注入時に検出され, これらの細菌がメタンあるいはTCE分解に係わったと推測される. その他, ⑤の *M. trichosporium* subgroup, ①の *Acidovorax* group, ④の not classified α は検出された期間がメタン注入期間と関係がないことから, この地域の土着細菌と思われる.

また, 取得した 16S rDNA クローンを安全性という観点で調査した. その結果, *Legionella* subgroup に近縁な 16S rDNA が3回検出されたことが明らかとなった(メタン注入時期とはずれており実質的には問題がないと考えられる). そこで, これらのクローンに関しては, 16S rDNA 全域の塩基配列を決定し, 近縁株との相同性を調査した. その結果, これらのクローンはすべて, 病原体の危険度レベル2である *Legionella birminghamensis* の NCTC12437 株に最も近縁であることが分かった. しかしながら相同

性は92～93%であり, 江崎らが提案した細菌の同定フロー⁴⁾を利用し, *L. birminghamensis* とは異なる細菌であると判断した. 江崎らのフローに従えば, 16S rDNA 全域の塩基配列の相同性が98%以上でないと既存の細菌と同種とは見なされない. この手順に従って, 1回検出された *Rickettsia* subgroup に近縁な 16S rDNA クローンも調査したが, 既存の病原菌とは異なることが分かった. 以上のように, 検出された 16S rDNA クローンの中に病原菌や日和見感染菌などの危険な細菌由来のものは見いだせなかった.

おわりに

以上, 16S rDNA クローンを基にした出現微生物の詳細な解析および安全性の検討結果を紹介した. 今後は, このような分子生物学的手法を利用した出現微生物の解析が継続して行われることにより, 微生物を使用する際の未知の不安が徐々に低減され, 開放系での微生物有効利用がますます盛んになることを期待したい.

本研究は, 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により委託を受けた「土壌浄化プロジェクト」の一環として地球環境産業技術研究機構(RITE)により実施したものである.

文 献

- 1) Tsien, H. C. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3155 (1989).
- 2) Semprini, L., P. V. et al.: *Ground Water*, **28**, 715 (1990).
- 3) 中村寛治ら: 環境工学研究論文集, **37**, 267 (2000).
- 4) 江崎孝行ら: 日本細菌学雑誌, **55**, 545 (2000).

外来遺伝子の水平伝播と安全性

福田 雅夫

平成4年1月に改訂された文部科学省の組換えDNA指針では, 旧指針で安全な宿主一ベクター系として認定されていた *Agrobacterium tumefaciens* がリストから除外された. 今回の変更は *A. tumefaciens* が動物細胞にも外来遺伝子を導入(伝達)する活性を有することが報告されたりことを受けたものである. 抗生物質などの薬剤に対する耐性遺伝子の水平伝播による薬剤耐性菌の拡散は古くからの問題であるが, 近年, 組換え作物や組換え食品からの遺伝子伝播に関する議論が盛んになってきている. また組換え微生物の環境中での利用が検討されており, 環境に放出された微生物からの遺伝子伝播についての議論

もある.

細菌における遺伝子の水平伝達

細菌間の遺伝子交換では接合伝達性プラスミドによる接合伝達がよく知られている. さらに接合伝達するトランスポゾンも報告されている. 接合伝達以外に遺伝子交換をもたらすメカニズムとしては, フェージによる形質導入や自然形質転換が知られている.

接合伝達 (conjugal transfer) プラスミドが細菌細胞間で伝播することは接合伝達として知られている. 接合伝達は系統的に大きく離れた異種細菌間でも高頻度に

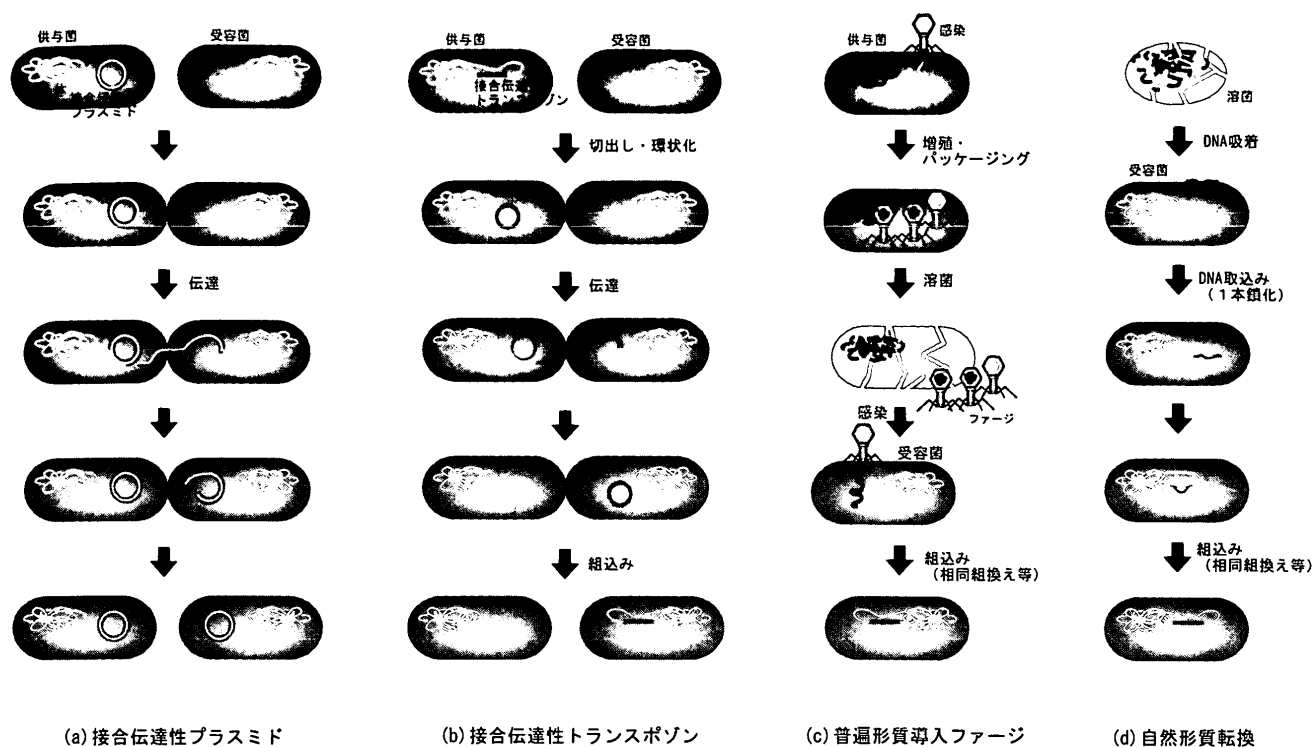


図1. 細菌における遺伝子の水平伝達経路

起こり、薬剤耐性プラスミド（R 因子）による薬剤耐性の伝播や分解系プラスミドによる環境汚染物質分解能の伝播など、環境中での多様な遺伝情報の伝播に深く関わっていると考えられている。接合伝達においてはまず、プラスミドをもつ供与菌の細胞がプラスミドをもたない受容菌の細胞に繊毛を使って密着し、*oriT* と呼ばれる部位で1本鎖切断を受けて1本鎖となったプラスミドDNAが受容菌細胞に移動する。移動したプラスミドDNAは受容菌細胞内で複製されて2本鎖DNAとなり、伝達が完了する（図1a）。前述の *A. tumefaciens* では植物だけでなく真菌類にも遺伝子を伝達することが知られているが、接合伝達と共通のメカニズムによることが示唆されている。単独で接合伝達できる自己伝達性プラスミドは接合伝達に関わる一連の機能をコードする *tra* 遺伝子群を持つが、この *tra* 遺伝子群の機能により共存する非伝達性プラスミドがそれぞれの *oriT* から高頻度で伝達される共伝達 (co-transfer, mobilization) の現象があり、グラム陰性細菌に限らず放線菌を含むさまざまな細菌に大腸菌のもつ組換え体を導入する手段としても利用されている。一部のプラスミドは、染色体に組み込まれたのちに染色体DNAを受容菌に伝達する染色体移行能をもち、大腸菌染色体の遺伝子地図の基礎はFプラスミドが染色体に組み込まれた Hfr 株を利用して作製された。

接合伝達は系統的に大きく離れた異種細菌間でも高頻

度に関わり得ることから、自然界での遺伝子伝達の主役と考えられる。このことは、(1)接合伝達性プラスミドが自然界のさまざまな場所から採取された細菌から分離されていること、(2)土壌や水系の模擬環境におけるプラスミドの接合伝達が認められること、(3)環境中に導入した細菌から土着細菌へのプラスミドの接合伝達が土壌中や活性汚泥中で認められることなどから、支持されている。²⁾ また自然環境中での接合伝達が栄養分の添加や粘土鉱物、根圏で促進されることが示唆されている。³⁻⁵⁾ 栄養分の添加は供与菌の活性を高めたと考察される。粘土鉱物は荷電により細菌や栄養分を吸着し、供与菌と受容菌の接触の機会を増やすと考えられる。根圏は植物が放出する栄養分に富み、土壌中で微生物の活性が特別に高い場として知られている。

接合伝達性トランスポゾン (conjugal transposon)
トランスポゾンは通常、細菌細胞内で染色体やプラスミドのゲノム間を転移する遺伝因子であるが、細胞間で接合伝達するトランスポゾンが知られている。接合伝達性トランスポゾンと呼ばれ、グラム陽性の *Enterococcus faecalis* の Tn916 やグラム陰性の *Bacteroides thetaiotaomicron* の CTnDOT など、多様な細菌から分離されている。プラスミドの接合伝達と同様に自ら接合伝達できる自己伝達性のものと、共存する他の接合伝達性トランスポゾンの活性により伝達される可動性 (mobilizable) のもの

がある。接合伝達性トランスポゾン(供与菌ゲノムから切り出されて環状化した後に接合伝達し、受容菌のゲノムに組み込まれる(図1b)。プラスミドの場合と同様に *oriT* 部位から1本鎖となって接合伝達するメカニズムが想定されている。受容菌ゲノムへの組み込み位置は *Tn916* ではランダムであるが、CTnDOTでは7カ所に限定される。

Tn916 については活性汚泥中で導入菌株から土着細菌への接合伝達が報告されている。⁶⁾

形質導入 (transduction) バクテリオファージ(ファージ)は細菌細胞に感染したのち、ファージDNAが複製されて増幅され、同時に合成されたファージタンパク質でファージDNAをパッケージして多数のファージ粒子を産生する。通常は最後に宿主細胞を溶菌して周囲に広がり、新たな感染を繰り返す溶菌サイクルと呼ばれる生活環で増殖する。感染の際には付着した標的細胞内に自らのゲノムを確実に送り込むメカニズムをもっている。λファージでは、このメカニズムが *in-vitro* packaging system として大腸菌への効率的な遺伝子導入手段として利用されている。大腸菌のP1ファージなどは直列に増幅したファージDNAを単位長さごとに切り出してファージ粒子にパッケージするが、このメカニズムが宿主の大腸菌染色体にもはたらき染色体DNAをパッケージしたファージ粒子が生産される。供与菌のさまざまな位置の染色体DNA断片をパッケージしたファージ粒子は、受容菌細胞にこのDNAを確実に導入できるので、供与菌染色体DNAをランダムにかつ効率的に伝達することになる。このようなファージによるランダムな遺伝子領域の伝達は普遍形質導入 (generalized transduction) と呼ばれている(図1c)。一方、ファージによっては宿主菌染色体に組み込まれて宿主と共存する溶原化の過程を含む溶原化サイクルと呼ばれる生活環もあり、染色体から切り出される際に周辺の遺伝子領域を含めて切り出されることがあり、組み込み部位周辺の特定の遺伝子を受容菌細胞に伝達することができる。このようなファージに付随した特定の遺伝子領域の伝達は特殊形質導入 (specialized transduction) と呼ばれる。

効率的な遺伝子導入メカニズムをもつファージが、実際の土壌や水系で導入した細菌や土着の細菌を形質導入することが報告されている。^{7,8)} 土壌中での実験では、ファージや細菌を吸着する粘土鉱物の存在がファージの増殖率や生残性を高めることが示唆された。ファージによる形質導入を介した環境中での遺伝子伝達は無菌湖水等を用いた水系環境で調べられており、受容菌が溶原化

していることや水中の粒子の存在が頻度を高めることが報告されている。⁹⁾ 前者は溶原化した受容菌を用いることで、溶菌サイクルによる受容菌の死滅を抑えた結果と推定される。後者は粒子が前述の粘土鉱物と同様のはたらきをしたと思われる。土壌や水系試料から容易にファージが検出されることから、さまざまな細菌にそれぞれ特異的なファージが環境中に広く分布していることが示唆される。しかしファージの宿主特異性が高く、遺伝子伝達の範囲は主として同種の細菌間に限られることから、ファージによる形質導入の環境中における遺伝子伝達への関与は比較的小さいと考えられている。

自然形質転換 (natural transformation) カルシウムなどの金属イオンで処理して大腸菌にDNAを取り込ませるDNA形質転換は遺伝子操作の基本技術の一つであるが、対数期あるいは定常期の特定の増殖段階で人為的な処理なしに外界から細胞内にDNAを取り込む細菌が知られている。この現象は自然形質転換と呼ばれ、40種を超える細菌が報告されている。自然形質転換においてはヌクレアーゼで1本鎖にされたDNAが、特異的なDNA取り込みタンパク質により細胞内に取り込まれる(図1d)。DNAが2本鎖のまま取り込まれる人為的な形質転換とは異なるメカニズムによるものである。

環境中ではDNAは主に細菌が生産するDNaseによりすみやかに分解される。しかしながら、DNAの一部が何ヶ月も環境に残ることが報告されており、¹⁰⁾ 粘土鉱物などによる吸着が関与することが示唆されている。¹¹⁾ 自然形質転換能の発現は一般に一定の栄養分の添加により促されることが示唆されているが、その他の要素は細菌種によりさまざまである。海水から分離した細菌の1割以上が自然形質転換能を示したという報告があり、¹²⁾ 環境中には自然形質転換能をもつ細菌が少なからずいると考えられている。土壌や水系を用いた模擬環境に導入した細菌における自然形質転換が報告されている。^{13,14)}

組換え作物における遺伝子の水平伝達

組換え作物由来の花粉が周辺の在来種と交配し、組換え遺伝子をもつ雑種が生じることが議論されている。ナタネを用いた実験では2 kmを越えて飛散した花粉が例外的にあったものの、大半は400 m程度の非組換えナタネの緩衝地帯を周辺に設けることで実質的な影響は防げると結論されている。¹⁵⁾ ただ生態的な影響も含めた安全性が確認されている組換え体が在来種と交雑しても、特段のリスクはないと考えられる。

組換え作物の遺体から遊離したDNAが自然形質転

換能をもつ細菌に取り込まれることが問題視されている。細菌による自然形質転換については前項ですでに述べたので、植物のDNAによる自然形質転換を調べた例を挙げる。カナマイシン耐性遺伝子を導入したテンサイのDNAと、部分欠失を含むカナマイシン耐性遺伝子をもつ *Acinetobacter* を殺菌土壌に接種し、 $10^9/\text{cell}$ の頻度で形質転換体を得たものである。殺菌していない土壌を用いた際には形質転換体は得られていない。¹⁶⁾

組換え食品・飼料における遺伝子の水平伝達

組換え食品あるいは組換え飼料を摂取した場合に、組換え体由来のDNAが口腔や胃や腸に棲む細菌や摂取したヒトや動物の組織細胞に水平伝播する可能性が議論となっている。もっとも可能性のあるメカニズムとして、組換え食品が消化分解されて漏出した組換え食品由来のDNAによる細菌細胞の形質転換が想定されている。実際に唾液を含む消化液で構成した模擬環境や動物実験では、DNAは口腔内に長時間残留して *Streptococcus* や *E.coli* などの供試菌で形質転換が認められた。一方、腸管ではDNAは速やかに分解し、形質転換が認められたのは最初だけであった。^{17,18)} この結果は胃や腸で組換え食品由来のDNAが水平伝播する可能性は低いことを示唆するものである。一方、DNAそのものを経口投与したのち、そのDNAの一部を腸の上皮のみならず血液や肝臓、脾臓の細胞にも検出したとの報告もあるが、¹⁹⁾ 大量にDNAを投与したケースであり、投与DNAが抗原として免疫系を活性化して免疫関連細胞に捕捉されたとの見方もでき、解釈の難しい結果である。

おわりに

接合伝達により水平伝達を高頻度に起こし得るプラスミドに、ヒトや動植物の健康や生態系に悪影響のある遺伝子を組み込んだ組換え体を環境中に放出するリスクは容易に理解できるところである。したがって、組換え遺伝子を染色体に組み込んで、水平伝達を抑えることが求められる。しかし、特に組換え作物や組換え食品で注目される自然形質転換により、自然界において組換え遺伝子の水平伝達が発生し得るかどうかは微妙な問題を含んでいる。科学的には頻度の問題であるが、供与DNAの濃度や受容体生物の濃度も考慮する必要がある。

環境中で頻度を調べる実験は特定の細菌種とDNAを大量に導入する系で実施されている。このような極端な条件を用いてようやく検出できる頻度であるとすれば、実際には起こり得ないと考えて良いように思われる。

一方では、極端な条件であっても検出されたことは実際に起こる可能性があると解釈する見方もある。このような見方に対して科学的に応えるには、環境中での水平伝達頻度に関する実験データをさらに充実する必要があると思われる。ただ、実際に起こるとすると、そのような水平伝達は組換え生物に限定して起こるものではなく、長い歴史の中で多様な生物間で遺伝子交換が繰り返されてきたと考えられる。したがって、組換え体であるからと問題視する意味はなくなるが、リスクのある遺伝子を水平伝達により環境中に放出することは避けねばならない。

文 献

- 1) Kunik, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1871 (2001).
- 2) Dröge, M. *et al.*: *Biol. Fert. Soils*, **29**, 221 (1999).
- 3) Götz, A. and Smalla, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1980 (1997).
- 4) Stotzky, G.: *Gene Transfer in the Environment*, p. 305, McGraw-Hill, New York (1986).
- 5) Lilley, A. K. *et al.*: *Microbiology*, **140**, 27 (1994).
- 6) Marcinek, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 626 (1998).
- 7) Zeph, L. R. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1731 (1988).
- 8) Ripp, S. *et al.*: *Mol. Ecol.*, **3**, 121 (1994).
- 9) Saye, D. J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 987 (1987).
- 10) Romanowski, G. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3012 (1992).
- 11) Khanna, M. and Stotzky, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1930 (1992).
- 12) Frischer, M. E. *et al.*: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**, 127 (1994).
- 13) Demanèche, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2617 (2001).
- 14) Williams, H. G. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2994 (1996).
- 15) Rieger, M. A. *et al.*: *Science*, **296**, 2386 (2002).
- 16) Nielsen, K. M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1237 (2000).
- 17) Mercer, D. K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 6 (1999).
- 18) Duggan, P. A. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **191**, 71 (2000).
- 19) Schubert, R. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **259**, 569 (1998).