

## GFP 標識ビブリオ科細菌の構築

° <sup>さわべともお</sup> 澤辺智雄 <sup>1)\*</sup>・Eric Stabb <sup>2)</sup><sup>1)</sup> 北大院水、<sup>2)</sup> University of Georgia

【目的】ビブリオ科細菌は海水から汽水域の水圏に広く生存している細菌である。この菌群は、多くの場合、海洋の脊椎動物および無脊椎動物と共存しているが、ヒトや水棲動物に疾病を引き起こす菌種も含んでいる。我々は、アワビと相互作用を示すビブリオを対象とした研究を進めており、消化管共存する菌種として *Vibrio haliotocoli* およびその類縁種、およびアワビに敗血症を引き起こす *V. carchariae* (*V. harveyi*)などを分離している。これらのビブリオは、様々な形で宿主動物とのコミュニケーションを行い、結果として共存あるいは感染という形で相互作用しているが、水中のビブリオ細菌が、海洋動物の表面に接触した後のビブリオ細菌の挙動は明らかになっていない。そこで、本研究では、ビブリオと海洋動物相互作用解析を視覚化して解析するための方法を確立することを目的とし、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する種々のビブリオ科細菌を構築した。

【方法】GFP 遺伝子挿入プラスミッド供与菌 *Escherichia coli* CC118  $\lambda$  *pir* (pEVS104(*tra trb* Kn<sup>r</sup>), pKV111(*gfp* Cm<sup>r</sup>)および pEVS104(*tra trb* Kn<sup>r</sup>), pKV112(*gfp* Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup>)と各種ビブリオ科細菌(約 40 種)を接合させ、pKV111 あるいは pKV112 が接合伝播されマーカー抗生物質に耐性となった形質転換株を選抜した。これら菌株は純粋分離を繰り返した後、GFP 蛍光の発現を確認した。また、GFP 標識に成功した 3 種の海洋性ビブリオ(*V. haliotocoli* IAM14596<sup>T</sup>, *V. pelagius* ATCC 25916<sup>T</sup>, および *V. alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup>) を供試し、GFP 発現細胞比率に及ぼす培養温度あるいは嫌気培養の影響、および栄養制限培地における GFP 発現細胞の検出限界期間を検討した。

【結果と考察】GFP 遺伝子挿入プラスミッド受容菌として供試したほとんどのビブリオ科細菌が GFP 標識された。このうち 3 種の代表的な GFP 標識ビブリオとも、培養温度 15°C で GFP 発現細胞の比率が高くなり、49-54%の細胞で GFP 蛍光が観察された。また、嫌気培養条件下においても GFP 発現細胞は観察されたが、その比率は 33-38%に低下した。さらに、これらの GFP 標識細胞を 15、20 および 25°C 下で栄養源の補強をしていない滅菌海水およびクロラムフェニコール添加海水に懸濁したところ、いずれの条件下とも GFP 発現細胞の比率は徐々に低下し、GFP 標識細胞を正確に検出できる期間は 3-4 日であることがわかった。

\* E-mail: sawabe@fish.hokudai.ac.jp.