



Title	遺伝子組換え微生物の環境利用に伴う外来性プラスミドの接合伝達挙動に関する研究
Author(s)	井上, 大介
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46837
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 いの井 うえ上 だい大 すけ介

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 19881 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 12 月 31 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

工学研究科環境工学専攻

学 位 論 文 名 遺伝子組換え微生物の環境利用に伴う外来性プラスミドの接合伝達挙動に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

助教授 池 道彦

(副査)

教 授 加賀 昭和 教 授 大竹 久夫

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子組換え微生物 (GEMs) を用いたバイオオーグメンテーションは、難分解性化学物質による環境汚染の有効な浄化戦略の一つとして期待されている。しかし、自然環境中への GEMs の導入に伴う組換え DNA (GEDS) の土着菌群への接合伝達によって、高等生物への有害影響や土着生態系の構造・機能の改変といったバイオリスクを生じる可能性があることから、GEMs の環境利用には適切なリスク評価が必要となる。本論文では、GEMs の環境利用に伴うバイオリスク発生の可能性を予測し、評価するための基礎的データの蓄積を目的として、GEDS の作製に汎用されるプラスミドの自然環境下における接合伝達の頻度を左右する各種要因を調べた。

本論文は、緒論、本論4章、総括並びに結論で構成されている。

第1章では、プラスミドの可動化に介在する mobilizer の環境分布と基本特性を調査した。Mobilizer は環境中に普遍的に存在しており、活性汚泥や汚染環境が比較的高いプラスミド可動化ポテンシャルを持つことが示唆された。また、環境中の mobilizer の多くは、不和合性群 IncP のプラスミドを保持しており、pseudomonads に属することが明らかとなったが、これらの putative mobilizer を用いたプラスミド可動化試験からは、GEDS の可動化が生じる可能性の低いことが示唆された。

第2章では、環境中の優占菌のプラスミド受容ポテンシャルを評価した。プラスミドの宿主域に含まれる細菌の大部分は受容菌となり得るが、一部の環境細菌は非常に高いプラスミド受容ポテンシャルを有することが明らかになった。また、プラスミドが高頻度で伝達された場合には、受容菌内で遺伝子再編成が生じ易く、代謝機能等が変化する可能性が示された。

第3章では、環境因子がプラスミドの接合伝達頻度に及ぼす影響を評価した。プラスミドの接合伝達頻度は、温度や pH、栄養条件等の環境因子によって決定される recipient の生理活性に大きく影響を受けることが明らかになった。また、活性汚泥プロセスや土壌環境において接合伝達に負の影響をもたらす因子が存在することを明らかにした。

第4章では、水環境及び土壌環境を模擬したマイクロコズムを用いて、実環境中におけるプラスミドの接合伝達挙動を解析した。実環境中において、自己伝達性プラスミドは宿主の生残性に関係なく伝達するが、可動性プラスミドが有意に伝達する可能性は非常に低いことが示された。実験データのモデル解析から、transconjugant を2次的供与菌とする接合伝達が高頻度で生じる可能性のあることが明らかになり、土着菌群からの2次的伝達が GEDS の環境中

における残存に重大な影響を及ぼすことが示唆された。

総括並びに結論では、本論各章における知見を体系的に整理し、自然環境下において GEDS の接合伝達が生じる可能性を論じ、GEDS の接合伝達に関連するバイオリスクの評価において重要となる mobilizer やプラスミド受容能力の高い環境細菌に関するデータベース、及びプラスミドの接合伝達挙動の解析モデルを充実していくことが重要であることを指摘した。

論文審査の結果の要旨

汚染物質の分解能に長けた外来微生物を添加するバイオオーグメンテーションは、難分解性化学物質による汚染環境の効率的な浄化戦略の1つとみなされている。特に、土着微生物にない機能を付与した、あるいは機能を強化した遺伝子組換え微生物 (GEMs) の利用は有効な手法として期待が高まっている。一方、GEMs に限らず、外来微生物を人為的に大量に環境中へ放出する際には、ヒト、動植物や生態系へ与える影響を科学的なデータに基づいて評価する必要があるが、そのための体系的なデータ整備は行われてこなかった。本論文は、有用な機能をプラスミド上に有している外来微生物、特に遺伝子組換え微生物の環境利用によって、プラスミドの接合伝達に起因してヒト、動植物への病原性/有害性が有意に高まる可能性や生態系構造とその機能が有意に変化する可能性を体系的に評価するための基礎的な知見を得ることを目的として行った一連の研究をとりまとめたものであり、その成果を要約すると以下のようになる。

- (1) プラスミド可動化ポテンシャルとして、自己伝達性プラスミドを有する mobilizer の環境分布を調査し、水環境や土壌環境に比して活性汚泥中に、また非汚染環境に比して汚染環境中に mobilizer が高い割合で存在することを明らかにしている。さらにこれらの mobilizer の多くが pseudomonads であり、IncP 群のプラスミドを有していることを明らかにするとともに、実験室条件下で三親接合試験を行い、実験室条件下では有意な可動化は生じないことを示している。
 - (2) プラスミド受容ポテンシャルとして、水環境、土壌環境および活性汚泥中の優占微生物の接合伝達によるプラスミド受容能を評価し、プラスミドの宿主域となる微生物の大部分がそのプラスミドを受容しうることを明らかにしている。また、接合伝達によって生じた transconjugant の保持するプラスミドの中には遺伝子再編成を受けるものがあることを明らかにし、その原因が高頻度のプラスミド伝達にある可能性を示している。
 - (3) プラスミドの接合伝達頻度に環境因子が及ぼす影響を評価し、温度と栄養条件が鍵となる因子であることを明らかにしている。
 - (4) 水、土壌マイクロゾム実験において、外来微生物から土着微生物へのプラスミド接合伝達挙動をモニタリングし、自己伝達性プラスミドは donor の生残性によらず土着微生物群に伝達すること、可動化プラスミドが土着微生物群に伝達される可能性は極めて低いことを明らかにした。また、実験結果をモデル解析し、生理活性が高い transconjugant は donor より高い接合伝達能力を示しうることで、これがプラスミドを保持するポピュレーションの増大に大きく寄与することを明らかにしている。
 - (5) 環境浄化を目的として外来微生物を導入した際にプラスミドの接合伝達が生じる可能性は、環境中の mobilizer の数とその特性に依存すること、transconjugant による2次的接合伝達も無視できないことを指摘し、本研究で得られた知見がプラスミドの接合伝達に起因するヒト、動植物や生態系への影響評価に大きく貢献することを示している。
- 以上のように、本論文は環境・エネルギー工学、特に遺伝子組換え微生物を用いたバイオレメディエーション技術の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。