

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-21-'97

環境保全のためのバイオテクノロジーの活用と その環境影響評価に関する研究

Studies on Application of Biotechnology to Preservation of the Environment
and on Evaluation of its Effects

平成3～7年度
FY 1991～1995

NIES



NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

SR-21-'97

環境保全のためのバイオテクノロジーの活用と
その環境影響評価に関する研究

Studies on Application of Biotechnology to Preservation of the Environment
and on Evaluation of its Effects

平成3～7年度
FY 1991～1995

環境庁 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「環境保全のためのバイオテクノロジーの活用とその環境影響評価に関する研究」
(期間 平成3～7年度)

特別研究責任者：内藤正明・森田昌敏
特別研究幹事：近藤矩朗
報告書編集担当：矢木修身・佐治 光

序

本報告書は平成3年度から7年度にかけて実施した特別研究「環境保全のためのバイオテクノロジーの活用とその環境影響評価に関する研究」をとりまとめたものである。

最近のバイオテクノロジーの発展はめざましく、中でも組換えDNA技術をはじめとする遺伝子関連技術は、様々な分野において活用され、人間生活の向上に大きく寄与するものとして期待されている。これまで、組換えDNA実験やこの技術の利用は、組換え体の生物学的および物理的封じ込めという二重の手段を講じた閉鎖系で進められてきたが、技術の進展に伴い、農業の分野においては、害虫抵抗性あるいは除草剤耐性の農作物の開放系における利用が開始されはじめた。一方、環境保全分野においても、組換えDNA技術を利用した環境指標植物や環境浄化微生物等が作成され、これらの野外における活用が期待されるまでになった。しかしながら、組換え体の安全性については未解明の部分が残されており、特に組換え体の生態系に及ぼす影響に関する研究および手法の開発はほとんど行われていない。このような背景のもとに、本研究は環境保全に有用な遺伝子を探索して遺伝子組換え生物を作成し、これらの遺伝子組換え生物のモニタリング手法を開発するとともに組換え生物の環境中における挙動を調べ、さらにこれらの生態系への影響評価手法を開発することを目的として遂行された。

その結果、グルタチオンリダクターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼ等の遺伝子の導入による汚染ガスおよび農薬耐性の植物の作出に成功し、これらの組換え体の諸性質を調べ、大気汚染や農薬耐性の機構を明らかにした。一方、水銀耐性遺伝子等を導入して作成した各種の組換え微生物を用いて、自然環境水および土壌ならびに本研究で開発した模擬生態系における挙動および生態影響を調べ、組換え体の生残・増殖性および生態系への影響は新株と同程度であることを明らかにした。本研究の成果がバイオテクノロジーの安全性の評価およびその活用に変え役立つものと考えている。

研究を推進する上で研究所外の多くの方々にご協力とご助言を頂いた。ここに深く感謝の意を表したい。

平成9年3月

国立環境研究所
所長 石井吉徳

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の目的	1
1.2	研究の構成	1
2	研究の成果	3
2.1	環境保全のための遺伝子の探索と活用に関する研究	3
2.1.1	大気保全有用遺伝子の探索ならびに有用植物の作成とその諸性質	3
2.1.2	有用微生物遺伝子の探索ならびに組換え微生物の作成とその諸性質	14
2.2	環境中における組換え微生物の挙動と挙動に及ぼす環境因子の影響に関する研究	16
2.2.1	外来遺伝子の環境中における挙動	16
2.2.2	水環境中における組換え微生物の挙動	17
2.2.3	土壌環境中における組換え微生物の挙動	19
2.3	遺伝子組換え生物の生態系への影響に関する研究	22
2.3.1	制御実験系を用いた組換え微生物の生物相に及ぼす影響	22
2.3.2	模擬生態系による組換え微生物の生態系影響評価	27
2.3.3	環境影響評価手法の開発	29
[資 料]		
I	研究の組織と研究課題の構成	37
1	研究の組織	37
2	研究課題と担当者	39
II	研究成果発表一覧	41
1	誌上発表	41
2	口頭発表	45

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

最近のバイオテクノロジーの発展はめざましく、中でも組換えDNA技術をはじめとする遺伝子関連技術は、様々な分野において活用され、人間生活の向上に大きく寄与するものとして期待されている。これまで、組換えDNA実験やこの技術の利用は、組換え体の生物学的および物理的封じ込めという二重の手段を講じた閉鎖系で進められてきたが、技術の進展に伴い、環境保全、農林水産、鉱工業等の分野において開放系での利用が考えられる段階にきている。

近年の環境問題はますます複雑化し、人間をはじめとする生物に多大なストレスを与えている。生物は種々の環境ストレスの影響を受ける一方、環境変化を緩和する能力を有しており、環境保全のために環境指標生物、環境浄化生物として利用されている。このような環境保全分野においても、組換えDNA技術を利用した環境指標植物や環境浄化微生物等の作成が進められてきており、これを野外で活用することが期待されている。

一方、遺伝子組換え生物の開放系での利用は、物理的封じ込めが不可能なことに加え、自己増殖能力を有する点で化学物質とは異なり、環境条件次第で大繁殖する可能性があるという生物特有の問題がある。さらに生物は、それを取り巻く物理化学的および生物学的環境によって、その挙動が大きく左右され、また環境にも影響を与える可能性がある。しかしながら、組換え体の生態系に及ぼす影響に関する研究および手法の開発はこれまでほとんど行われていない。本研究では、環境保全に有用な遺伝子を探索して遺伝子組換え生物を作成するとともに、それら遺伝子組換え生物のモニタリング手法を開発して遺伝子組換え生物およびその遺伝子の環境中における挙動を調べ、さらにそれらの生態系への影響を検討し、生態系影響評価手法を開発することを目的とした。

1.2 研究の構成

本研究は以下の3つのサブテーマをもって行われた。各テーマの研究の概要を以下に示す。

(1) 環境保全のための遺伝子の探索と活用に関する研究

1) 大気保全有用遺伝子の探索ならびに有用植物の作成とその諸性質

植物の大気汚染の耐性及び浄化等に関与している遺伝子を探索・単離するとともに、これらの遺伝子を導入した組換え植物を作成した。さらに、組換えDNA技術等のバイオテクノロジーを利用して、これらの植物の環境指標性、環境浄化能の向上を試みた。

2) 有用微生物遺伝子の探索ならびに組換え微生物の作成とその諸性質

有害化学物質分解に関与するマーカー遺伝子を単離するとともに、これらの遺伝子を導入した組換え微生物を作成した。さらに、マーカー遺伝子の有効性を明らかにするとともに、これらの組換え微生物の諸性質を明らかにした。

(2) 環境中における組換え微生物の挙動と挙動に及ぼす環境因子の影響に関する研究

1) 外来遺伝子の環境中における挙動

マーカーの遺伝子の安定性、伝達性の評価法を検討し、安定性及び伝達性に及ぼす環境因子の影響を明らかにした。

2) 水および土壌環境中における組換え微生物の挙動

フラスコ、カラム等の小規模のマイクロコズムから、自然環境に近い比較的大型の水および土壌マイクロコズムを作成し、組換え微生物の挙動を解明するためのマイクロコズムの適正規模等の検討を行い、組換え微生物の生残性、増殖性、拡散性、移動性等を検討した。さらに、生残性に及ぼすpH、含水率、土質、温度、光、降雨、各種土着生物等の環境因子の影響を検討し、また、移動性に及ぼす生物的・土壌的因子をモデル解析と基礎的実験により解明した。

(3) 遺伝子組換え生物の生態系への影響に関する研究

1) 制御実験系を用いた組換え微生物の生物相に及ぼす影響

微生物、原生動物、藻類を組み合わせた水圏生態系の標準マイクロコズムシステムを確立し、組換え微生物の各生物相に及ぼす影響を解明した。

2) 模擬生態系による組換え微生物の生態系影響評価

フラスコレベルのマイクロコズムを用いて、組換え微生物の一般細菌、脱窒・硝化菌、グラム陰性菌、糸状菌等の微生物、原生動物、藻類への影響、および呼吸活性、各種酵素活性等への影響を調べ、その影響要因を明らかにした。また、ライシメーター、大型水槽等を用いた大型マイクロコズムを開発し、組換え微生物の各種微生物、

原生動物、藻類、呼吸・酵素活性等への影響評価を行った。

3) 環境影響評価手法の確立

各サブテーマで得られた成果および手法を用いて、組換え生物の野外利用における環境影響評価手法を提案した。

2 研究の成果

2.1 環境保全のための遺伝子の探索と活用に関する研究

2.1.1 大気保全有用遺伝子の探索ならびに有用植物の作成とその諸性質

(1) 大気保全有用遺伝子の探索

人類の活動や地球環境の急激な変化により、植物の生育や生存が脅かされ、近い将来、食料生産や環境保全にとって大きな問題になるのではないかと危惧されている。地球の温暖化に伴って各地で生じる気候変動や砂漠化の進行、オゾン層の破壊による紫外線量の増加、大気汚染や酸性雨との接触などの環境変化にさらされたとき植物はどの程度耐えられるのであろうか。このような疑問に対しては、実験を行うことによりある程度予測することができ、個々の環境因子について、その植物に及ぼす影響を調べる研究が行われている。一方、単に影響を見積もるだけでなく、その作用機構やそれに対する植物の耐性機構を明らかにし、それらの知見に基づいて植物の耐性などを改善し、将来の食糧危機に備えたり、破壊された環境の回復に利用したり、また環境保全に活用しようとする試みがなされている。特に、遺伝子組換えを中心とするバイオテクノロジーの急速な進歩により、生物の生理機構の解明やその人為的改変が可能となりつつあり、

大きな期待が寄せられている。たとえば、植物の低温や乾燥、高塩濃度などに対する耐性機構の一部が明らかにされ、遺伝子操作によりそれらの耐性を増加させることに成功したという報告が出てきている。

このような状況において、私たちは、これまでに得られた植物の大気汚染ガスに対する反応に関する生理学的及び生化学的研究の知見に基づき、遺伝子操作により植物の大気汚染耐性を高めることが可能であるかどうかを検討するため、特別研究（「バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究」昭和61年度～平成2年度）に引き続いて本研究を行った。その結果、以下に述べるように、まだ検討すべき点は多々あるにしても、このような試みが可能であることを示唆する研究結果を得ることができた。

一般に植物の遺伝子操作研究は、**図1**のような手順で行われる。まずどのような遺伝子进行操作すればよいかを検討する。本研究では、これまでの生理学的研究の知見に基づき、植物の大気汚染耐性に関与すると思われる4つの遺伝子に着目した。次のステップはこのような遺伝子を植物あるいはその他の生物から単離することであり、それができれば、得られた遺伝子を適当に改変した後、

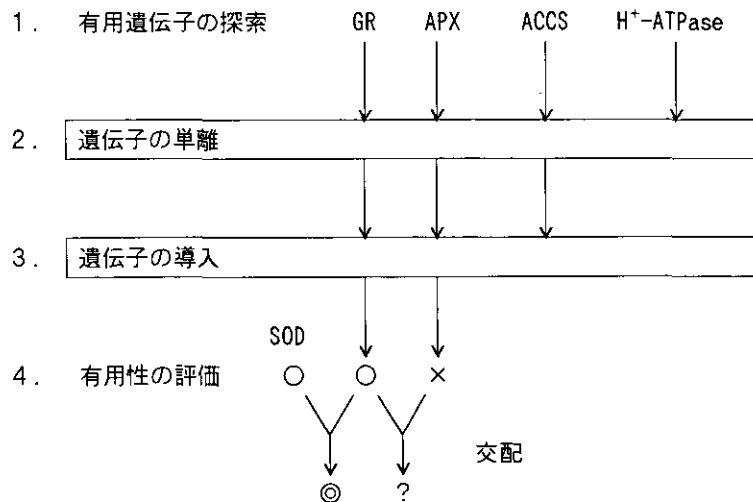


図1 遺伝子操作による大気汚染耐性植物の開発

GR：グルタチオンレダクターゼ

APX：アスコルビン酸ペルオキシダーゼ

ACCS：アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素

H⁺-ATPase：プロトンATPアーゼ

SOD：スーパーオキシドジスムターゼ

○：耐性増大，◎：顕著な耐性増大，×：効果なし

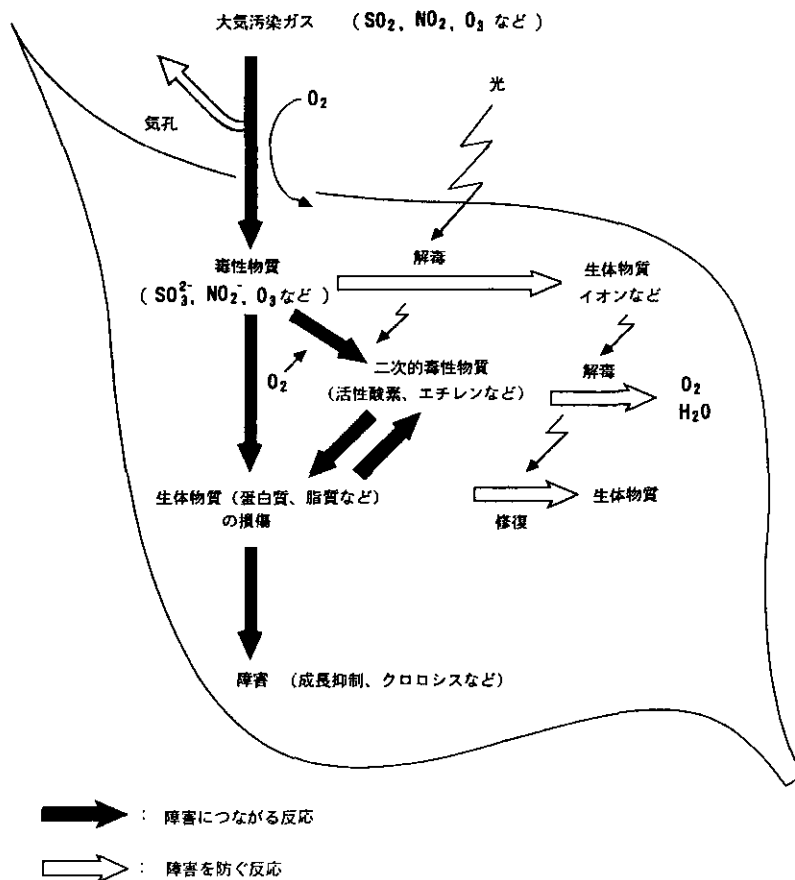


図2 大気汚染ガスと接触した植物の葉内で生じる反応

植物へ導入する。最後はこうして得られた遺伝子組換え植物を育て、導入した遺伝子の有用性（本研究の場合には大気汚染耐性）を調べる。図には本研究の現時点での進行状況が示されており、遺伝子が単離された段階のものから、組換え体の作成、さらには有用性の評価を行い耐性の増大が確認されたものがあることが分かる。

これまでの知見に基づき、大気汚染ガスと接触した植物の葉においてどのような反応が起こっているのかを大ざっぱに図示すると、図2のようになる。二酸化イオウ (SO_2)、二酸化窒素 (NO_2)、オゾン (O_3) などの大気汚染ガスは、葉の表面にある気孔を通して吸収され、組織中の水に溶け、 SO_2 や NO_2 の場合には、それぞれ SO_3^{2-} 、 NO_2^- などのイオンを生じる。これらのイオンや O_3 は反応性が高く、生物物質に損傷を与える。またこれらの物質やそれにより生じた損傷が原因となり、二次的毒性的物質である活性酸素や老化ホルモンであるエチレンなどが発生し、それらの働きにより生物物質の損傷や組織の老化がさらに進み、その結果、可視障害や生長抑制といった障害が植物に発生する。以上が障害につながる反応の

概略であるが、一方、細胞内では障害を防ぐための反応も起こっており、毒性的物質を解毒したり、損傷を受けた生物物質を修復したりしている。

このように、多くの反応が大気汚染ガスと接触した植物の葉内で生じており、これらの反応に関与している因子はすべて遺伝子操作の対象として有望である。私たちは、これまでの知見を考慮して、いくつかの酵素をその対象とした。それは、気孔の開閉に関与と思われるプロトン ATPアーゼ (H^+ -ATPase)、二次的毒性的物質である活性酸素を消去する反応系の酵素であるグルタチオンレダクターゼ (GR)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、エチレンの生合成の鍵を握っているアミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素 (ACCS) (図1) である。以下、それらについての研究結果を報告する。

(2) H^+ -ATPase 遺伝子の単離

大気汚染ガスは主に葉の表面にある気孔を通して吸収されるため、気孔の数が多く開度が高い植物ほどガスを

よく吸収する。したがって気孔は、植物の大気汚染浄化能や感受性を決める重要な因子の一つとなっていると思われる。このうち気孔の数を決める機構についてはまだ何も分かっていないのに対し、その開度の制御については、細胞レベルおよび分子レベルでの研究が進み、関与すると思われる物質がいくつか明らかになってきている。なかでも、細胞の表面にあって、エネルギー依存的に細胞内から細胞外へ水素イオンをくみ出す働きをしている H^+ -ATPaseは、主な浸透圧調節物質であるカリウムイオンの細胞内への取り込みの原動力となる膜電位形成に関与するため、極めて重要な役割を担っている。そこでこの酵素の遺伝子操作により、植物の気孔開度の変化、さらには大気汚染ガス吸収量の改変ができる可能性がある。

以上の考えに基づき、私たちは、 H^+ -ATPaseの遺伝子の単離を試みた。この酵素の遺伝子は、すでに他の研究者によりいくつかの植物種から単離されていたが、実際に気孔の開閉にかかわっているものを単離するために、ソラマメから気孔の孔辺細胞を集め、それからmRNAを

単離し、cDNAライブラリーを作成した。これより、ATPaseの共通配列を基にPCR法を用いて H^+ -ATPase遺伝子の単離を試み、2種類のcDNAクローンを得た。そのうち長い方のクローンのDNA塩基配列を決定したところ、アミノ酸配列において、他の植物種で決定された H^+ -ATPaseと77.1~86.5%相同なタンパク質の暗号を含んでいることが分かった(図3, 表1)。

次に、得られたcDNAを用いて、この遺伝子の孔辺細胞および葉肉細胞における発現を調べたところ、後者よりも前者において強く発現していることが分かった(図4)。しかし厳密にいうと、複数存在すると思われる H^+ -ATPase遺伝子のうち、ある特定の遺伝子のみが孔辺細胞で強く発現しているのか、どの遺伝子も概して孔辺細胞における発現量が高いのかは不明である。いずれにしろ、この結果は孔辺細胞における H^+ -ATPaseの重要性を示唆しており、気孔の開閉におけるこの酵素の関与を裏付けている。したがって今後この遺伝子进行操作することにより、植物の大気汚染ガス吸収を人為的に制御する

```

1  MAAISLEQIK NESVDLEKIP IEEVFAQLKC TREGLSSTEG ESRIQIFGPN KLEEKESKF
61  LKFLGFMWNP LSWMEAAAV MAIALANGGG QPPDWQDFVG IVCLLVINST ISFIEENNAG
121 NAAAALMAGL APKTKVLRDG KWSEQEAAIL VPGDIISIKL GDIIPADARL LEGDPLKVDQ
181 AALTGESLPV TRHPGQEVFS GSTCKQGEIE AVVIATGVHT FFGKAAHLVD NTNNVGHFQM
241 VLKSIGNFCI CSIAVGLMAE IIVMYPQHR KYRDGIDNLL VLLIGGIPIA MPTVLSVTMA
301 IGSKLSQQG AITKRMTAIE EMAGMDV LCS DKTGTLTLNK LSVDRNLIEV FIKGMDKEHV
361 ILLAARAART ENQDAIDAAI VGMLADPKEA RAEITEVHFL PFNPNDKRTA LTYIDNKDGT
421 WHRASKGAPE QIIELCNMRE DAQKKIHSMI EKFAERGLRS LGVARQEVPE KTKESAGAPW
481 QFVGLLSVFD PPRHDSAETI RQALNLGVNV KMITGDQLAI AKETGRRLGM GTNMYP SATL
541 LGLDKDSSVA SMPVEELIEK ADGFAGVFPE HKYEIVKKLQ ERKHICGMTG DGVNDAPALK
601 KADIGIAVAD ATDAARGASD IVLTEPGLSV IISAVLTSRA IFQRMKNYTI YAVSITIRIV
661 FGMFIALIW KFDFSPFMIL IIAILNDGTI MTISKDRVKP SPLPDSWKLK EIFATGVMLG
721 GYQALMTVIF FWIVQGTKFF PDRFGVRHIH DNPDELTAAL YLQVSIVSQA LIFVTRSRSR
781 LMLNAPGLLL LGAFLIAQLI ATLIAVYANW AFARIQGIGW GWAGVIWLYS IIFYIPLDII
841 KFATRYFLSG KAWSNLENKT AFTTKKDYGK GEREAWAHA QRTLHGLEPP ESSGIFHEKN
901 SYRELSEIAE QAKRRAEVAR LRELHTLKGH VESVVKLKGL DIDTIQQHYT VYKGNT

```

図3 ソラマメ孔辺細胞から単離した H^+ -ATPaseのcDNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列

表1 単離したcDNAから推定されるアミノ酸配列と他の植物のH⁺-ATPaseのアミノ酸配列との相同性

植物種	cDNAクローン	相同性 (%)	文献
<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)	aha1	85.0	(Harper et al. 1990)
	aha2	85.8	(Harper et al. 1990)
	aha3	83.1	(Harper et al. 1990)
	aha9	81.7	(Houlne and Boutry 1994)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (タバコ)	pma1	78.5	(Perez et al. 1992)
	pma2	79.6	(Perez et al. 1992)
	pma3	79.1	(Perez et al. 1992)
	pma4	86.5	(Moriau et al. 1993)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (トマト)	lha	79.4	(Ewing et al. 1990)
<i>Oryza sativa</i> (イネ)	osa1	78.0	(Wada et al. EMBL AC;D10207)
	osa2	77.1	(Ookura et al. 1994)
<i>Solanum tuberosum</i> (ジャガイモ)	pha1	79.2	(Harms et al. Genbank. AC;X76536)
	pha2	86.5	(Harms et al. Genbank. AC;X76535)
<i>Zostera marina</i> (アマモ)	zmuzha	81.9	(Fukuhara et al. Genbank. AC;D45189)

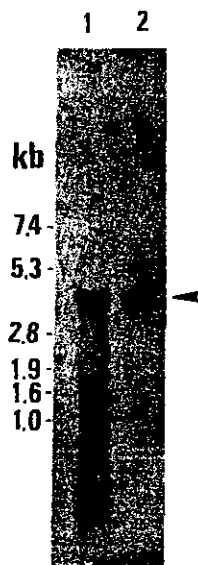


図4 H⁺-ATPaseのmRNAのノーザンブロットングによる解析
列1及び列2はそれぞれ孔辺細胞および葉肉細胞から単離したRNAを用いた。矢印はH⁺-ATPaseのバンドの位置を示す。

ことができるかも知れない。

(3) エチレンの発生および作用機構の解明と ACCS 遺伝子の単離

植物が大気汚染ガスと接触すると、植物ホルモンの一つであるエチレンが発生し、様々な影響をもたらす。そ

の際のエチレンの発生の仕組みや作用機構については、まだよく分かっていなかった。そこで私たちは、トマトを材料に用い、それらの点を明らかにしようとした。まずトマトを0.2ppmのオゾンと接触させたところ、エチレン生成量が速やかに増加し、4時間後にその値がピークとなり、その後減少した(図5)。このようなエチレン生成の仕組みについては、脂質の酸化などが考えられていたが、このホルモンの生合成のキーエンザイムであるACCSの活性がオゾンと接触したトマトの葉において速やかに上昇し、エチレン生成速度と同じような経時変化を示すことが分かり(図6)、図7のような経路でエチレンの合成が起こっていることが示唆された。これをさらに裏付ける証拠として、トマトにあらかじめこの酵素の阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン(AVG)を投与すると、オゾンによるエチレン生成の誘導が強く抑えられた(図8)。またこのAVGの前処理によってエチレン生成が抑制されたトマトは、AVG処理をしなかったトマトよりも高いオゾン耐性を示すことが分かり(図9)、発生したエチレンに障害を促進する作用があることも分かった。

次に、エチレンによるオゾン障害促進作用の機構を明らかにするため、エチレンの、受容体様タンパク質に対する競合阻害剤である2,5-ノルボルナジエン(NBD)の効果を調べた。トマトをオゾンと1時間接触させた後、

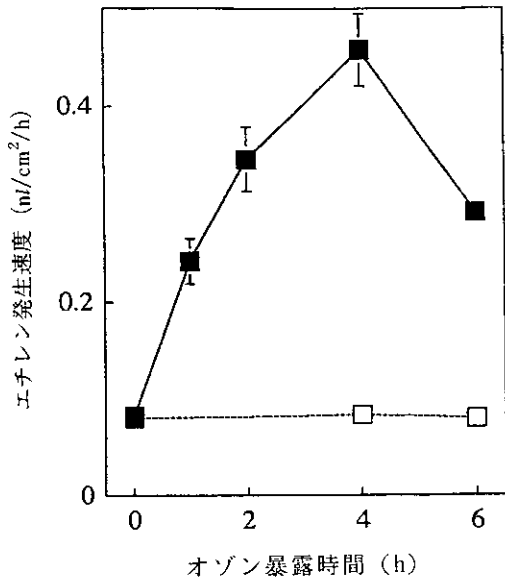


図5 オゾンと接触したトマトの葉におけるエチレン生成
■: 0.2ppmオゾン, □: 対照

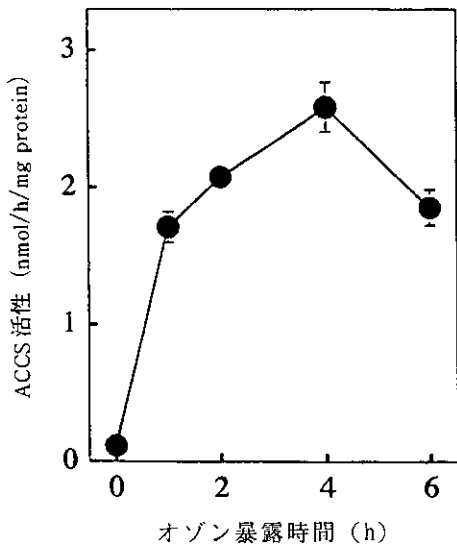


図6 オゾンと接触したトマトの葉におけるACCS活性

30ppmのNBDと5時間接触させ、様々な時刻に葉組織の障害の程度を調べたところ、NBD処理により障害の進行がくい止められていることが分かった(図10)。一方、NBDで処理しなかったトマトでは、時間の経過とともに障害の進行が認められた。この結果から、エチレンの障害促進作用は、その受容体様タンパク質を介する情報伝達経路の活性化を通じてもたらされることが示唆され(図7)、エチレンによって引き起こされる他の様々な生理反

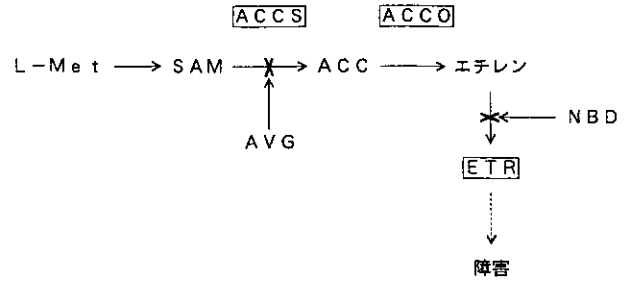


図7 大気汚染ガスによって誘導されるエチレン生合成経路とその作用

L-Met:メチオニン, SAM:S-アデノシルメチオニン, ACC:アミノシクロプロパンカルボン酸, ACCS:ACC合成酵素, ACCO:ACCオキシダーゼ, AVG:アミノエトキシビニルグリシン, NBD:2,5-ノルボルナジエン, ETR:エチレン受容体様タンパク質, →×は阻害剤の作用部位を示す。

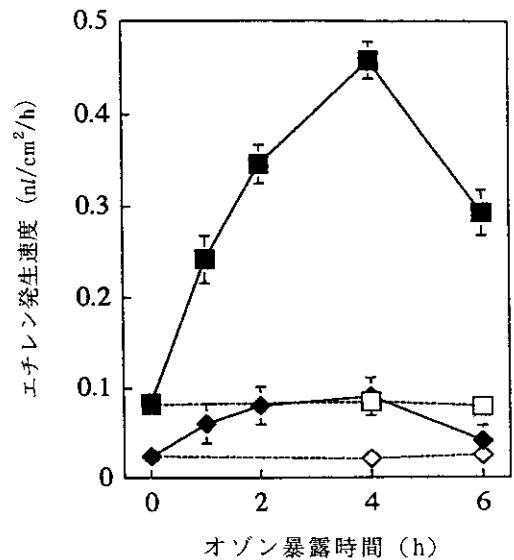


図8 オゾンによるトマト葉のエチレン生成誘導とそれに対するAVGの効果

トマトを0.1mMのAVGで噴霧処理または非処理後0.2ppmのオゾンと接触させた。

□: 対照, ■: オゾン処理, ◇: AVG処理, ◆: オゾン+AVG処理

応の作用機構との共通性が示された。

AVGやNBDの効果によって分かるように、エチレンの発生や作用を抑えることにより、植物のオゾンなどによる障害を軽減させることができると予想される。特にACCSは、エチレン生成の調節において中心的役割を果たしていると考えられるため、遺伝子操作によりその発現量を制御することで、植物の大気汚染耐性などを変化させることができると思われる。

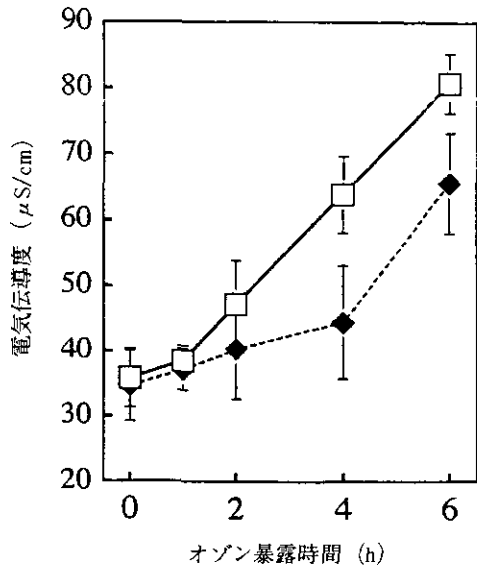


図9 AVGで処理または非処理後オゾンと接触させたトマト葉組織からの電解質の漏出
0.1mMのAVGで噴霧処理(◆)または非処理(□)後0.2ppmのオゾンと接触させたトマトから葉片を切り出し、イオン交換水に30分間浮かべて水の電気伝導度を測定した。この値の上昇は、葉組織の内容物の漏出を示し、早く上昇するほど大きな障害を受けていることを意味する。

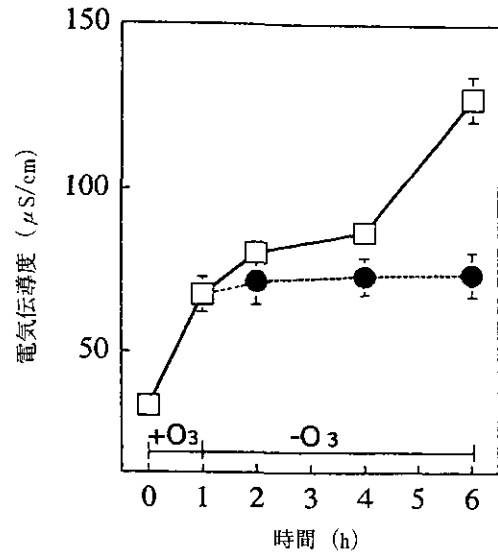


図10 オゾンと接触後NBDで処理したトマト葉組織からの電解質の漏出
0.2ppmのオゾンと1時間接触させた後、照射下に放置し、その間30ppmのNBDと様々な時間接触させた(●)かまたはさせなかった(□)トマトから葉片を切り出し、図9で述べた方法で電気伝導度を測定した。

```

PAS1 1' MVFKLNShLLSRlASSDGHGEDSPYFDGWKAYSDPHPTDNPNGVIQMGLAENQLCFDL
      .***.**.* ***.*****. . * ****.*****. *
PAS2 1' MERQHQLLSKlATNDRHGENSPYFDGWKAYDKNPFHPTDNPdGVIQMGLAENQLSADS

61' IQDWLKKPKASlCSPEGLNEFRElAlFQDYHGLPEFRNAVANFMKVRGNRVTFDPDRl
  * **.**.*****.***. . *..** *****. *..**..***.*****
59' lIDWIKKHPKASlCNPEGVHMFKDlANFQDYHGLPEFRQAlAKFMGRVRGGRVTFDPDRl

121' VMSSGATGAHETlAFCLADPGEAFLVPTPYPGFDRDLRWRtGVKlIPVDSdSSNFMVt
  *****. * * *****.*****.*****. * ** *****. ....*****. *
119' VMSSGATGANELlMFCLADPGdAFLVPSPYPAFYRDLGWRtGVQlVPVDCdSSNFQlT

181' REAlENAYEKAlQdNlKVKGLlITNPSNPLGtILDREtLRSlVRf INEKNIHLVCDElYA
  .***.**.*** *.*.****.*****.*****. ....*****.*****
179' KVALeAAyDKAQdGINVKGLlITNPSNPLGtILDREtLKCLLSf INEKNIHlVCDElYA

241' AtVfSQPDFlSVRRlQEDlECNLDLVHlVYSLSKdMGfPGLRVGlIYSYNDAvVSCARk
  **.*. .*.**.. . . * . . * **.*.*****.***.****.*****.***
239' AtlFSSQNFVSVSEVlEEVMDcNRDLIHlVYSLSKdMGLPGfRVGlVYSYNDAvVNCGRk

301' MSSfGLVStQTQYlIASMLSDNEfVEMf lRESKRRLAARyRVfTRGLdQVGlECLKtSNA
  *****.*****.*****.*** *..**.* *..**.*.*.***.*.*
299' MSSfGLVSSQTQYLLASMLSDfEFVEdFLAESSKRLKRHGfTKGLRQlGlsCL-ESKA

361' GLfLWMDLSRLLKQQtFKAEMLWRVlIHEVKLNvSPGCSfHCLKPGWfRVCfANMDdEt
  **.*. .*.***.*. .*****. ....*****.*****.*****.*****
358' GLfVWMDLRHLLKEQtNDGEMELWRVlVNDVKLNvSPGSSfHCVfEGWfRVCfANMDdEt

421' MQVALSRlKtFV---NKEA---DTKSRKNLR-WQGSLLKLNspRIYDDf INSPHSPlP
  ...**.*.***. . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . *
418' LEVALKRlHAFVGEQKEREtLStKtKdMPsKtKcWkKNLRSfSSRlFEEGlGSPlAMSP

473' QSPLVRARN
      .*****
478' HSPLVRART
  
```

図11 ポプラから単離した2種類のACCs (PAS1, PAS2)のcDNAから推測されるアミノ酸配列
* : 同一アミノ酸, . : 類似アミノ酸

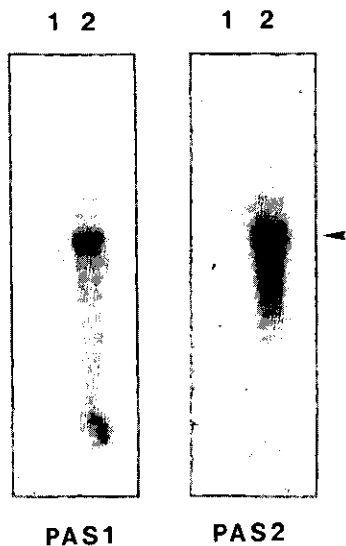


図12 ポプラACCS遺伝子発現のノーザンブロットングによる解析
 対照(列1)または0.2ppmのオゾンと4時間接触させた(列2)ポプラの葉からmRNAを単離し、PAS1またはPAS2をプローブにしてノーザン解析を行った。矢印はACCS遺伝子のバンドの位置を示す。

H⁺-ATPaseの場合と同様に、ACCSの遺伝子は、すでにいくつかの植物から単離されていたが、本研究ではオゾンによってその発現が誘導されるような遺伝子が操作の対象としてふさわしいと考えられることから、そのような遺伝子の単離を試みた。

オゾンと接触させたトマトやポプラの葉からmRNAを単離し、cDNAライブラリーを作製した。これまでに報告されているACCSのアミノ酸配列のうち保存性の高い領域のPCRプライマーを化学合成し、これをプローブとしてライブラリーからACCSのcDNAを単離した。たとえばポプラからは、ACCSの暗号指定領域の全長を含む2種類のクローンが得られた。これらのDNA配列から予想されるアミノ酸配列を図11に示す。得られたcDNAをプローブとして用いたノーザンブロットングにより、それぞれの遺伝子の発現を調べたところ、いずれの遺伝子の場合も、そのmRNA量が、オゾンと接触させたポプラの葉で顕著に増加することが分かった(図12)。したがってこれらの遺伝子が、オゾンによるエチレン生成において重要な鍵を握っていると予想される。私たちは、現在ACCS遺伝子のタバコ、ポプラなどの植物への導入を行っている。

(4) APX 遺伝子のタバコへの導入

様々な生理、生化学的研究により、O₃やSO₂を吸収した植物の体内で、O₂⁻やH₂O₂などの活性酸素分子種が発生し、それらが障害と深くかかわっていることや、そのような物質を消去する反応系が植物の大気汚染耐性に関与していることが示唆されている。したがって、この活性酸素消去系の酵素の遺伝子进行操作することにより、植物の大気汚染耐性を高めることができると期待され、私たちはそのような研究を行っている。前期の特別研究において、このような酵素のうち、APXのcDNAをシロイヌナズナから単離する一方、大腸菌由来のGR遺伝子をタバコに導入し、得られた組換え植物がSO₂や除草剤のパラコートに対して高い耐性を示すことを発見した。

今期の特別研究では、これらの研究を引き継ぎ、APX遺伝子をタバコに導入して組換え体を作成するとともに、GR遺伝子をポプラに導入し、組換え樹木を作成し、また、GRとSODの活性がともに高い組換えタバコを作成して、これらの組換え植物の性質を調べた。

APXは、アスコルビン酸の還元力を利用して、H₂O₂をH₂Oへと解毒する酵素で、葉緑体のチラコイド膜上やストロマ、またサイトゾルにイソ酵素が存在する。そのうちサイトゾルのもののcDNAを、前期特別研究でシロイヌナズナから単離した。その後私たちは得られたcDNAを用いて、シロイヌナズナからサイトゾル型APXのゲノムDNAを単離し、その遺伝子構造を明らかにした。またこの遺伝子の発現を調べたところ、O₃やSO₂と接触させたシロイヌナズナの葉で、その酵素(図13)やmRNA(図14)の量が増加することが分かり、植物の大気汚染耐性におけるこの酵素の重要性が示唆された。

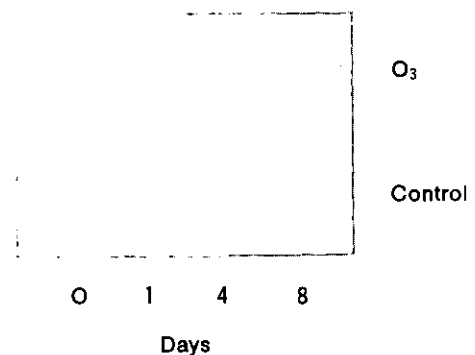


図13 オゾンと接触させたシロイヌナズナにおけるサイトゾル型APX量のイムノブロットングによる解析
 14時間明/10時間暗の周期下で0.1ppmのオゾンに連続的に暴露した。

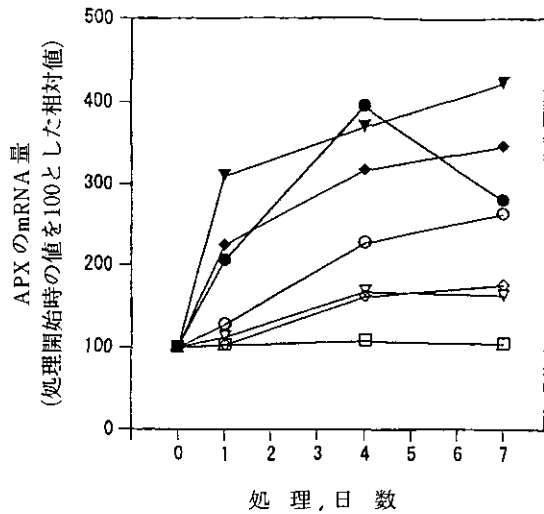


図14 大気汚染ガスと接触させたシロイヌナズナにおけるAPXのmRNA量の変化

●: 0.1ppm O₃, ◆: 0.12ppm O₃, ▼: 0.15ppm O₃,
○: 0.1ppm SO₂, ◇: 0.12ppm SO₂, ▽: 0.15ppm SO₂,
□: 対照

単離したシロイヌナズナ由来サイトゾル型APXのcDNAを、トマトのリプロース二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子のプロモーターの下流につないでタバコに導入し、組換え植物を作成した。得られた組換え体の葉は、個体により様々なAPX活性を示し、高いものでは、対照の非組換え体のものの5~10倍の活性を持つものもあった。シロイヌナズナのサイトゾル型APXに対する単クローン性抗体を用いてイムノブロッティングを行ったところ、APXの酵素タンパク質量の増加がAPX活性増加の原因になっていることが示唆された(図15)。さらに、宿主であるタバコのAPXとは結合しない単クローン性抗体を用いることにより、導入したシロイヌナズナのAPX遺伝子が発現していることが確かめられた。このような組換えタバコは、以前報告したGR遺伝子の組換えタバコの場合と同様に、対照の非組換えタバコとほぼ同様な形態および成長を示した。

まず、得られた組換えタバコの活性酸素耐性を調べるため、組換え体及び対照のタバコの葉片を除草剤のパラコートで処理し、生じた障害の程度を比較した。パラコートは、光照射下で光合成の電子伝達系から電子を受け取り、それを酸素に付与することにより、細胞内で活性酸素を生成することが分かっており、植物の活性酸素耐性を調べる際に最もよく用いられる。タバコの葉片をパラコート溶液に浮かべ、吸引処理により葉の組織内にパラ

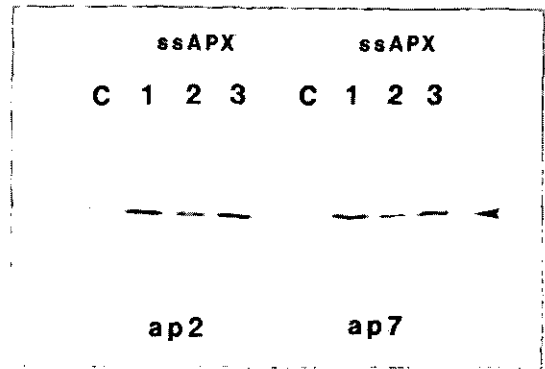


図15 遺伝子組換えタバコ(ssAPX1, 2, 3)及び非組換えタバコ(c)の葉抽出液の抗APX単クローン性抗体を用いたイムノブロッティング像
単クローン性抗体ap2はシロイヌナズナとタバコのAPXをとともに認識するのに対し、ap7はシロイヌナズナAPXと特異的に結合する。矢印はAPXのバンドの位置を示す。

コートを十分しみ込ませた後、イオン交換水に浮かべて光照射下に放置すると、発生した活性酸素によって細胞膜が障害を受け、細胞の内容物が漏出し、イオン交換水の電気伝導度が時間の経過とともに増加した(図16A)。パラコートを投与しなかった場合や投与後葉片を暗所に放置した場合にはこのような障害はほとんど観察されなかった。APX遺伝子を導入した組換え体と対照のタバコの葉片にパラコートを投与し、光照射下に放置したところ、どの個体の葉片においても、APX活性とは無関係にほぼ同様な障害の進行が観察された(図16B)。障害の進行状況は、パラコートの濃度や光の強さ、葉の令などの条件によって影響を受けたが、いずれの場合にも組換え体と非組換え体の間で再現性のある差は見いだされなかった。したがって、少なくとも本研究で調べた条件下においては、サイトゾル型APXは、活性酸素耐性の制限因子にはなっていない可能性が示唆された。O₃感受性についても調べたが、組換え体と対照のタバコの間で再現性のある差は観察されなかった。

一方、パラコート処理を行った葉片のアスコルビン酸含量を測定したところ、組換え体、非組換え体のいずれにおいてもその値はパラコート処理後急激に減少することが分かった(図17)。APXの活性がアスコルビン酸の非存在下で失活することが知られているので、それについても測定したところ、予想通り、アスコルビン酸量の減少に伴ってこの酵素の失活が起こっていることが観察された(図18)。組換え体、非組換え体のいずれの場合でも、パラコート処理後3時間目にはAPX活性は全く検出

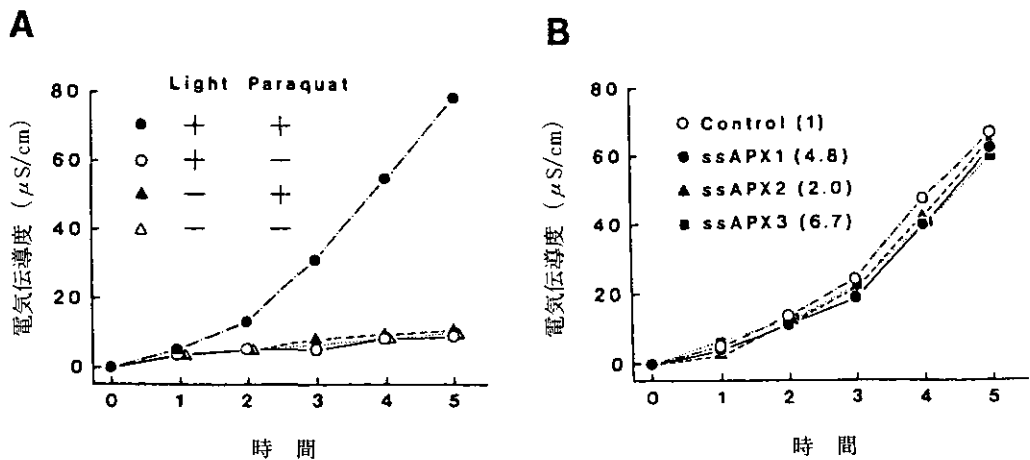


図16 パラコート処理したタバコ葉片からの電解質の漏出
 A. 非組換えタバコの葉片に対し、図中に記述したように、パラコートを投与し、または投与せずに、その後照射下または暗所に放置した。横軸は放置時間。
 B. 遺伝子組換えタバコ (ssAPX1, 2, 3) 及び非組換えタバコ (Control) の葉片にパラコートを投与し、照射下に放置した。括弧内の数値は材料として用いた葉片のAPX活性の相対値を示す。

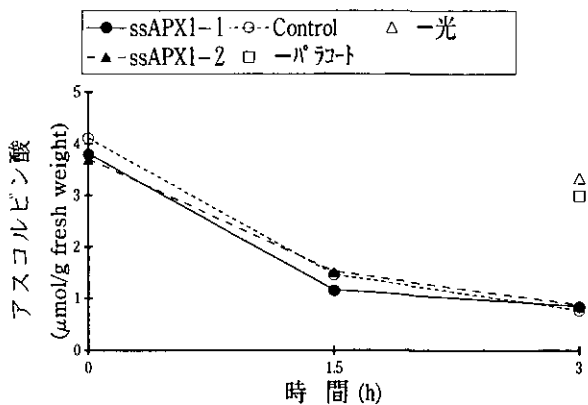


図17 パラコート処理したタバコのアスコルビン酸含量
 遺伝子組換えタバコ (ssAPX1-1, -2) 及び非組換えタバコ (Control) の葉片にパラコートを投与した後、照射下に放置した。

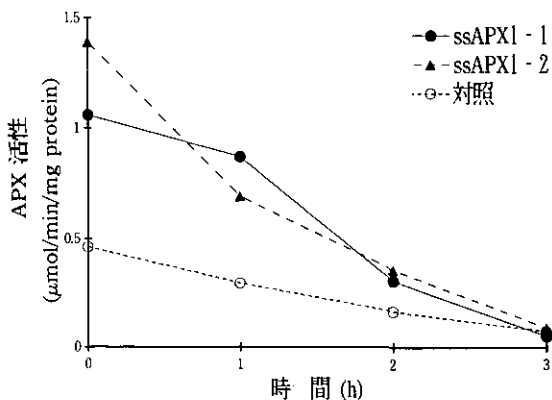


図18 パラコート処理した遺伝子組換えタバコ及び非組換えタバコ葉片のAPX活性
 葉片にパラコートを投与した後、照射下に放置した。

されなくなった。したがって少なくともここでの条件下においては、APXの活性を高めるよりもアスコルビン酸量を高レベルに維持することの方が防御反応として重要なのかも知れない。GR遺伝子を導入した組換えタバコが、同様な条件下で、高いパラコート耐性を示すことも、GRがアスコルビン酸の再生に関与していることから、この考えと合致する。

(5) GR遺伝子のヤマナラシへの導入

GRは、NADPHの還元力を利用して、酸化型グルタチオンを還元型に変換する酵素で、上で述べたように、アスコルビン酸を再生する反応系であるアスコルビン酸-グルタチオン経路に属する酵素である。またこの酵素の反応によって生じる還元型グルタチオンは、酸化的に障害を受けたタンパク質や脂質などの修復などにも関与していると考えられている。私たちは、前期特別研究で、この酵素の大腸菌由来の遺伝子をタバコに導入し、得られた組換え植物が、パラコートやSO₂に対して高い耐性を示すことを見いだした。一方、O₃に対しては、はっきりとした耐性獲得は確認されなかった。

今期の特別研究では、シロイヌナズナ、ホウレンソウ、酵母からのGRのcDNAの単離と構造決定を行うとともに(図19)、GRの遺伝子操作によるストレス耐性付与の一般性を確かめるため、樹木であるヤマナラシへの遺伝子導入を行った。導入には、タバコの場合に用いたのと


```

spi 1:-----EDNHSTVEDDAANYDFDL FVIGAGSGGV
ara 1:MASTPKLSTSISSSSPSLQFLCKLPIAHLPPSSSSSFLPKLTLVSLRPRIALLSHRRYHSRRFSVCASTOHGAESORHYDFDLFTIGAGSGGV
pea 1:MNQAMATPLSLSCCSPPTLT--RSTLFFTKTFFFSRSFS--TPLPLSTKTLISLSP-----PHRTFAVRAESQNGADPARQYDFDLFTIGAGSGGV
pse 1:-----MSFDFDL FVIGAGSGGV
eco 1:-----MTKHYDY IATIGGSGGI
yea 1:-----NTKHYDYLVIGGSGGL
hum 1:-----ACRQEPQPQPAAAGAVASYDYLVIIGGSGGL
      * * * * *
=====
spi 101:RAARFANL GAKYICELPFHPISSEVIGGVGGT CVIRGCVPKLLVYGASFGGELED-AKNYGNELNEKIDFNWKKLLQKKTDEIIRLNMIYKRLLSNA
ara 101:RASRFAT SFGASAAVCELPFSTISSDTAGGVGGT CVLRGCVPKLLVYASKYSHEFED-SHGFGWKYETEPSHDWTL IANKNAELQRLTG IYKNTLSKA
pea 101:RASRFASNF GASSAVCELPFSTISSDTGGVGGT CVIRGCVPKLLVYASKYSHEFEE-SNGFGWRYDSEPKHDWSL IANKNAELQRLTG IYKNTLSKA
pse 101:RAARFAAGFGARVAVAESRY-----LGGT CVNVGCVPKLLVYGAHSEDFEQ-ARAYGWS-AGEAQFQWATL IGNKNREIQLRNGIYRMLLVNS
eco 101:ASINRAAMYQKCALIE-----AKELGGT CVNVGCVPKVMHAAQIREAIHMYGPDYGFDTT INKFNWETL IASRTAYIDRIHYSYENVLGKN
yea 101:ASARRAASYGAKTLLVE---AKALGGT CVNV-G-CVPKK-VMHYASDLATRVSHANEYGLYQNLPLDKEHLTFNHPFEKQRDAYVHRLNGIYQKNLEKE
hum 101:ASARRAAELGARAAYVE-----SHKGGT CVNVGCVPKVMHMTAVHSEFMHD-HADYGFP-SCEGKFNWRVYIKERDAYVSRNLNAIYQNLTKS
      * * * * *
      +
spi 201:GVKLYEGEGKIV-GPN-EVQVTQLDGTKLSYSAKHILIAIGSRAQRP---NIPGQELAITSDAELSL EEFPKRVVILGGYISVEFASINRWGMGADVHL C
ara 201:NVKLEIEGRKVI-DPH-TYDV---DG-KI-YITRNIL IAVGGRPFIP---DIPGKEFAIDSDAALDLPSPKPKIAIVGGGYIAL EFAGIFNGLHCEVHV F
pea 201:GVKLYEGEGKIV-DAH-TYDV---DG-KL-YSAKHILVSVGGRRPFIP---DIPGKEYAIDSDAALDLPSPKPKIAIVGGGYIAL EFAGIFNGLHCEVHV F
pse 201:CVTLLEGHARLL-DAH-SYEV---DG-QR-FSAKHILVATGGMPQVP---DIPGKEHAITSNEAFFLERLPRRVLVVGGGYIAVEFASIFNGL GAETLL L
eco 201:NVDVIKGFARFV-DAK-TLEV---NG-ET-ITADHILIAIGGRPSHP---DIPGVEYIGDSGDFALPALPERVAVVYAGYI AVELAGVNLGAKTHL F
yea 201:KYDVVYFG--WARFNKDGNEVQKRDHTEVYSANHILVATGGKAIFP---ENIPGFEIGTSDGDFRLEEQPKKVVVYAGYIGIELAGVFNGLGSETHL V
hum 201:HIIRGHAAFTSDPKPIEV---SG-KK-YTAPHIL IATGGMPSTPHSEQIIGASLIGTSDGFFQLEELPGRSVIVYAGYIAVEMAGEL SALGSKTSLM
      * * * * *
      // / /
spi 301:FRKELPLRGFODEMRAAVARNLEGRGVNHPRTTL TELVKT DGG-VVAR--TDHGE-----EIEADVVL FATGRSPNTKRLMLEALGV ELDRTGAVKVD
ara 301:IRQKKVLRGFDEVDVDFVGEQMSLRGIEFHTEESPEAIIKAGDG-SFSL-KTSGT-----VEGFSHVHFATGRKPNTKRLGLENVGKMAKNGAIEVD
pea 301:IRQKKVLRGFDEEIRDFVAENMALRGIEFHTEESPAITKAADG-SLSL-KTNKGT-----EEGFSHMFATGRSPNTKDLGLESVGVKVAKNGDSEIYD
pse 301:YRRDLFLRGFDRSVREHLRDELGKKGDLQFNSDIARIDKQADG-SLAA-TLKDGR-----VLEADCVFYATGRRPMLDDLGL ENTAVKLTDKGFIAYD
eco 301:VRKHAPLRSFOPMISETLVEVMNAEQPQLHTNAIPKAVVKNTDG-SLTL-EL EDGR-----SETVQCL IWAIGREPANDINLEAAGVKTNKGYIYVD
yea 301:IRGETVLRKFDCEIQNTITDHYKKEGINVHKLK IYKVEK-NV-ETDKLKHMHND---SKSIDVDEL IWTIGRKS HLGMSG-ENVGKILNSHDEIAD
hum 301:IRHDKVLRFSDFSMISFNCTEEL ENAGVEVLRFSQVKEVKKTLGLEVSMVAVPGRPLPVMTMIPDQCLLWAI GRVPNTKOLSLNKLGIQTDDKGHIIYD
      * * * * *
      / /
spi 401:EYSRTSVPSIWAIGDVTNRMNLT PVALHEGTCTFAKTVF--GGQNSKP-DYSNIIACAVFSIPPLAVVGLSEEQAEQASGD--ILVFTSSFNPKMNTISGR
ara 401:EYSQTSVPSINAVGOVTDRIINLT PVALHEGGALAKTLF--QNEPTKP-DYRAVPCAVFSQPPIGTVGLTEEQAEQY-GD--VDVYTSNFRPLKATLSGL
pea 401:EYSQTSVPSINAVGDATNRVNLTPVALHEGVALAKTLF--QNEPTKP-DYRAIPSAVFSQPPIGTVGLTEEQAAEQY-GD--IDVFTANFRPKATLSGL
pse 401:EHYQTSSEPSILALGDVIGRVQLTPVALAEGMAVARRLF--KPEYRVPDYKLIPTAVFSLPHIGTVGLTEEEALSA--G-HKVKIFESRFRPMKLTLD
eco 401:KYQNTNIEGIYAVGQNTGAVELTPVAVAAARRLSERLF--NNKPDHLDYSNIPVTVFVSHPPIGTVGLTEEQAREQY-GDDQVYVYKSSFTAMHYAVTTH
yea 401:EQYQNTNPNIIYSLGDVVYKVELTPVAIAAGRKL SNRLFGPEKFRNDKLOYENVPVYFVSHPEAGSIGSEKFA-IEKYGKEMIKVYNSKFTAMHYAAMLSE
hum 401:EFQNTNPKGIYAVGVCGKALLTPVAIAAGRKL AHRLFEY--KEDSKLDYNNIPTVVFVSHPPIGTVGLTEDEA IHKY-GIENKVTYSTSFTPMYHAVTKR
      * * * * *
      * *
      +
spi 501:QEKTIMKLVDAE-TDKVLGASMC GPDAAEIMQGIAIALKFGATKAQFDSTVGIHPSAAEEFVTHREPSRRVP GAGKPKTNL-----
ara 501:PDVRFMKLIVCAN-TNKVLGVHNCGEDSPEIIQGFVYAKGLTKADFATVGVHPTAAEEFVTHRAPTRKFRK-DSSEKASPEAKTAAGV
pea 501:PDVRFMKLIVSAE-TNYVLGLHMCGEDAAEAJQGFVYAKGLTKADFATVGIHPTAAEEFVTHRTPTKRVRKNQASQSGKSOSKAKAVAGS
pse 501:QEKTIMKLVDAH-DORVLGCHMVGAEEIILQGIYAVAKGATKQAFDEYIGIHPATAEEFVTLRTPTR-----
eco 501:RQPCRMLL-VCVGSEKIVGIIHGIFGMDHMLQGFVYAKGLTKADFATVGVHPTAAEEFVTHR-----
yea 501:KSPTRYK-IVGAGPNEKVVYGLHIVGSSAAEILQGFVYAKGATKAQFDONCAIHPATAEEFVTHR-----
hum 501:KTKCVMKM-VCANKEEKVYGIHQGLGCOEHLQGFVYAVYAKGATKAQFDONTVAIHPTSEELVTLR-----
      * * * * *
      * *
      +

```

図19 様々な生物で決定されたGRのアミノ酸配列

spi: ホウレンソウ, ara: シロイヌナズナ, pea: アラスカエンドウ, pse: *Pseudomonas aeruginosa*, eco: 大腸菌, yea: 酵母, hum: ヒト, *: すべての生物間で一致したアミノ酸, @: 活性部位, +: GSSGの結合部位, /: NADPHの結合部位, =: FADの結合部位

同じ、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターに大腸菌GR遺伝子をつないだキメラ遺伝子を用いた。さらに、タバコの場合と同様、GRを葉緑体内に蓄積させるための通過ペプチドのDNAを付加したものも作成し、導入に用いた。その結果、様々なGR活性を示す組換えヤマナラシが得られ、タバコの場合と同様に、GRをサイトゾルや葉緑体に蓄積した個体は、パラコート(図20)やSO₂(図21)に対して高い耐性を獲得していることが確認された。またO₃に対する耐性に変化が見られなかった点も、タバコの場合と同じであった。したがって、GRの役割についての種を超えた一般性が確認されるとともに、このような遺伝子導入技術が植物のストレス耐性を改善する上で有効であることが裏付けられた。ヤマナラ

シは、街路樹としての優れた性質を持っているため、大気汚染耐性の付与は、実用面でも有意義であると考えられる。

(6) GRとSOD活性がともに高い組換えタバコの作成
 活性酸素消去系酵素のうち、上で述べたようなGRのほか、SODについても植物への遺伝子導入実験が盛んに行われており、それによるパラコートやO₃に対する耐性増加が報告されている。しかしながら、このような一つの遺伝子のみの操作によってもたらされる耐性増加の程度はあまり大きなものではなく、複数の遺伝子を同時に操作する有効性が議論されていた。そこで私たちは、当研究室で作成した、サイトゾルにGRを蓄積している組換

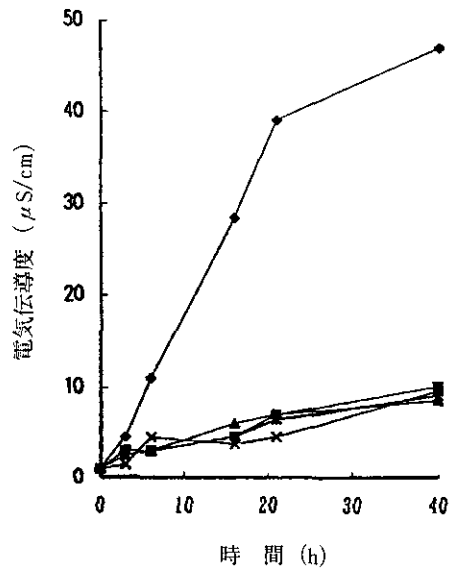


図20 パラコート処理したヤマナラシ葉片からの電解質の漏出
 処理法については図16の説明文を参照。
 ◆：非組換え体，■▲：大腸菌GRをサイトゾルにもつ組換え体，×*：大腸菌GRを葉緑体にもつ組換え体

エタバコと、京都府立大学の田中國介教授のもとで作成された、サイトゾルにSODを蓄積している組換えタバコを互いに交配し、これら二つの酵素活性がともに高いような植物の作成を試みた。こうして得られたタバコを、交配親となったGRやSODのみの組換えタバコ、非組換えタバコなどとともに育て、その性質を調べた。交配によって得られたタバコは、GRの組換えタバコと同程度の高いGR活性を示し、一方SOD活性は、SODの組換えタバコよりは低い非組換えタバコよりは有意に高い値を示した(図22A)。これらの植物のパラコート感受性を、上で述べたように、処理した葉片からの電解質の漏出量によって調べたところ、GRやSODの組換えタバコは、非組換えタバコよりも若干高い、ほぼ同様な耐性を示したのに対し、交配によって得られたタバコは、これらをさらに上回る、極めて高い耐性を示した(図22B)。このように、一連の代謝系に属する複数の酵素の遺伝子を同時に操作することが、植物の生理的性質を改善するのに非常に有効であることが明らかとなった。

以上述べてきた、活性酸素消去系酵素の遺伝子操作によって得られた様々な系統のタバコのパラコート耐性をまとめて図示すると、図23のようになる。APXとGR、APXとSODの間でも交配を行い、種子が得られている。それらの植物のパラコート耐性を近々調べる予定で

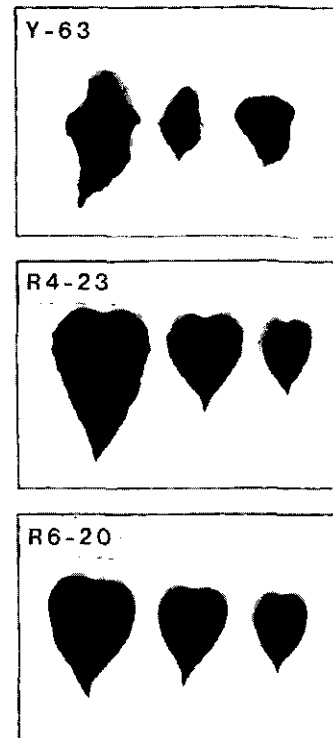


図21 大腸菌GR遺伝子を導入したヤマナラシのSO₂耐性組換え体及び非組換え体ヤマナラシを照射下で1ppmのSO₂と5時間接触させ、翌日これらの植物から葉を採取して写真撮影した。
 Y-63：非組換え体，R4-23，R6-20：大腸菌GRをそれぞれサイトゾルまたは葉緑体にもつ組換え体。

ある。ここに示されているのは、あくまでも私たちが行った、サイトゾルにおけるこれらの酵素活性を変化させたタバコの実験結果であり、今後葉緑体における酵素活性を変化させた場合や、他の植物種に対して行った場合などについて、さらに検討する必要があると思われる。

以上の研究結果は、遺伝子操作技術が植物の大気汚染ガスなどに対する耐性の改善に有効であることを示唆している。しかし今後この技術の有効性をさらに高めるためには、植物のストレス耐性機構の解明やそれにかかわる遺伝子の単離がまだまだ必要である。大気汚染耐性機構についても、これまでに分かっていることはまだほんの一部に過ぎず、単離されている遺伝子の数も少ない。一方、シロイヌナズナやイネなどの植物におけるゲノム解析研究により植物の遺伝子に関する情報が急ピッチで蓄積されつつあり、また突然変異体を用いた遺伝学的及び分子生物学的研究により、植物の生理機構の解明や遺伝子単離に新たな展開がなされようとしている。私たちも今後こういった技術を導入しながら研究をさらに進めていきたいと考えている。

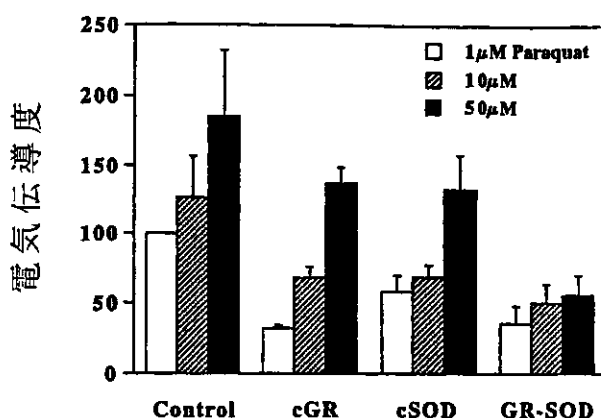
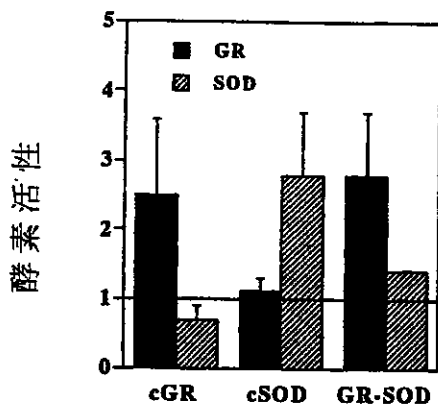


図22 遺伝子組換えタバコの性質

- A. 葉のGR及びSOD活性 (非組換え体の値に対する相対値)。
 B. 葉片のパラコート感受性 (異なる濃度のパラコートを投与した後5時間光照射下に放置した葉片からの電解質漏出量の相対値, 非組換え体を1 μMパラコートで処理した時の値を100とした)。
 cGR, cSOD: サイトゾルにそれぞれGRまたはSODを過剰生産している組換え体,
 GR-SOD: cGRとcSODを交配してできたタバコ, Control: 非組換えタバコ

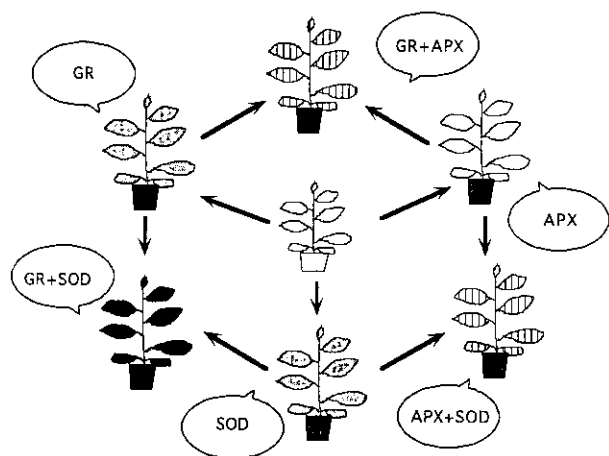


図23 活性酸素消去系酵素の遺伝子を操作したタバコのパラコート耐性

葉の色の濃いものほど耐性が高い。GR+APX 及び APX+SOD の植物のパラコート耐性については現在調査中。

2.1.2 有用微生物遺伝子の探索ならびに組換え微生物の作成とその諸性質

(1) 組換え微生物検出用マーカー遺伝子の単離

組換え微生物を自然環境中で利用するためには、そのマーカーとなる遺伝子を組み込む必要がある。塩化第二水銀分解酵素遺伝子 (水銀分解遺伝子) は塩化第二水銀を金属水銀に還元する機能を有しているため、マーカー遺伝子ならびに環境浄化への有用遺伝子としても利用が可能と考えられる。そこで水銀分解遺伝子の単離を行い、各種微生物へ導入し、水銀化合物分解能を有する組換え

微生物を作成するとともに水銀化合物分解能をマーカーとする組換え微生物の効率の良い検出法の開発を行った。

まず、水銀化合物分解酵素遺伝子群merオペロンがコードされている大腸菌由来のプラスミドNR1を単離し、merオペロンを精製した。これを広宿主域ベクターpSUP104に組み込んで作製した組換えプラスミドpSR134を宿主である *Pseudomonas putida* PpY101に電気パルス法を用いて導入した。その結果、100mg/lの塩化第二水銀を含む平板培地においても増殖できる著しく水銀化合物分解能の高い組換え微生物を作成することができた (図24)。

水銀化合物分解能が各種の微生物で発現が可能であればマーカーとしての有効性が高いと考えられるため、各種の微生物への水銀マーカーの導入を試みた。*P. putida* PRS2000, *P. fluorescens* LB303, *P. aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* HB101, *Klebsiella oxytoca* KR16に水銀マーカーを電気パルス法及び塩化マグネシウム法によって導入した。すべての宿主への導入が認められ、表2に示すような水銀化合物分解能を有する各種の組換え微生物を作成することができた。水銀マーカーは広範囲の宿主で利用可能であることが認められた。

水銀化合物分解酵素遺伝子 (水銀マーカー) を組み込んだ組換えプラスミドpSR134の電気パルス法による *P. putida* PpY101への導入最適条件を検討した。パルス電圧, パルス時間, DNA濃度, 菌体濃度について検討した結果、最適な条件はそれぞれ12.5KV/cm, 4.5~11.9msec.

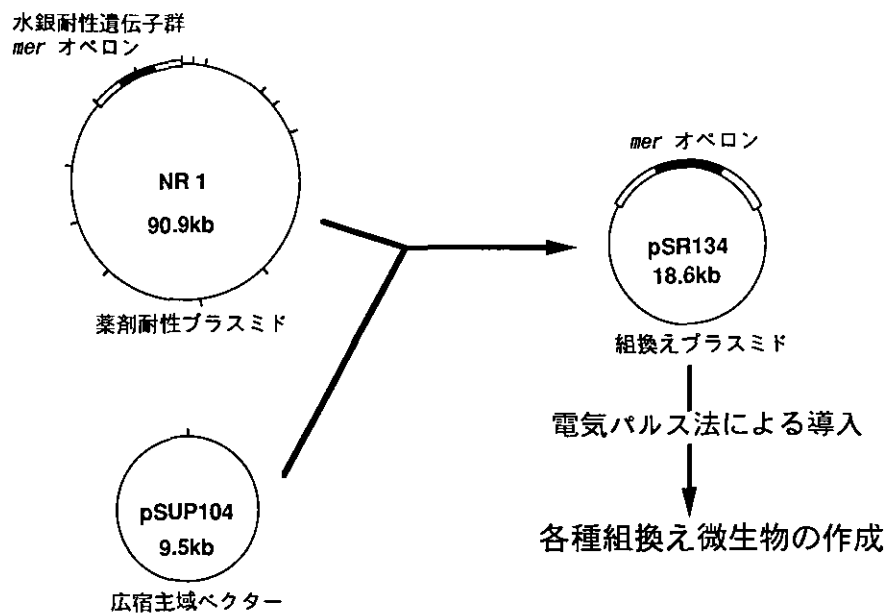


図24 マーカー付き組換え微生物の作成

1 $\mu\text{gDNA/ml}$, 10^9 細胞/mlであることが認められた。最適条件でPpY101の形質転換を行った結果、非常に高い効率 (1.11×10^5 形質転換菌数/ μgDNA) で組換えプラスミドの導入が可能であった。

(2) 組換え微生物の諸性質

水銀マーカーをPpY101, PRS2000, LB303, PAO1, HB101, R16に導入して得られた各種組換え体とその宿主の比増殖速度, 塩化水銀耐性能及び塩化水銀分解能の比較検討を行った。増殖速度はいずれの菌株においても組換え体の方が若干遅いことが認められた。組換えプラ

表2 各種菌株への組換えプラスミドの導入

菌株	形質転換効率 (形質転換菌数/ $\mu\text{g DNA}$)	
	電気パルス法	塩化マグネシウム法
<i>Pseudomonas putida</i> PpY101	1.11×10^5	2.53×10^4
<i>Pseudomonas putida</i> PRS2000	8.76×10^4	8.65×10^3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LB303	5.10×10^4	1.05×10^4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	7.50×10^3	2.86×10^5
<i>Escherichia coli</i> HB101	2.50×10^4	7.00×10^2
<i>Klebsiella oxytoca</i> R16	3.75×10	ND*

ND* ; 検出されず

スミド pSR134にコードされている塩化水銀およびテトラサイクリン耐性能を調べた結果、いずれの組換え体もこれらの耐性能が高まったことが示された (表3)。さらに各種組換え体の塩化水銀分解能をX線フィルム法によって確認した。

水銀化合物分解酵素遺伝子 (水銀マーカー) をベクター pSUP104に組み込んだ組換えプラスミド pSR134を電気パ

表3 各種組換え微生物と宿主における塩化水銀及びテトラサイクリン耐性能の比較

菌株	EC ₅₀ * (ppm)	
	塩化水銀	テトラサイクリン
<i>P. putida</i> PpY101	5	7
PpY101/pSR134	72	47
<i>P. putida</i> PRS2000	5	7
PRS2000/pSR134	54	82
<i>P. fluorescens</i> LB303	70	16
LB303/pSR134	73	25
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	5	22
PAO1/pSR134	113	32
<i>E. coli</i> HB101	14	7
HB101/pSR134	70	56
<i>K. oxytoca</i> R16	16	48
R16/pSR134	122	68

*EC₅₀ : 生育を50%阻害する薬剤濃度

ルス法により, PpY101, PRS2000, LB303, PAO1, HB101, R16に導入して得られた各種組換え体およびその宿主の世代時間および水銀化合物分解酵素遺伝子発現能の比較検討を行った。世代時間はいずれの菌株においても組換え体の方が若干長くなることが認められた(表4)。さらにいずれの組換え体においても水銀化合物分解酵素遺伝子が発現し, 金属水銀が生成されていることを確認した(図25)。

(3) 組換え微生物の検出法

一般に微生物を検出計数する場合, 寒天平板培養法が最も簡便な方法である。そこで水銀マーカを導入した

表4 LB培地及び10倍希釈LB培地における各種組換え微生物とその宿主の世代時間

菌株	世代時間 (分)	
	LB培地	1/10LB培地
<i>P. putida</i> PpY101		
宿主	52	85
組換え体	55	91
<i>P. putida</i> PRS2000		
宿主	48	70
組換え体	50	70
<i>P. fluorescens</i> LB303		
宿主	45	54
組換え体	45	55
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
宿主	30	51
組換え体	34	56
<i>K. oxytoca</i> R16		
宿主	38	64
組換え体	41	69
<i>E. coli</i> HB101		
宿主	33	70
組換え体	33	71

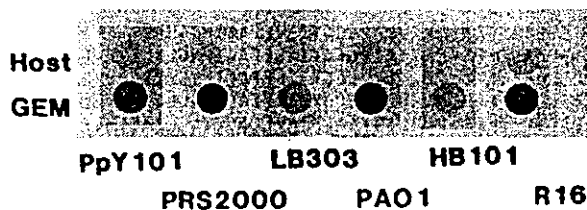


図25 X線フィルム法による各種微生物の塩化水銀還元能の比較

組換え微生物の検出には, 塩化第二水銀を含む寒天平板培養法を用いた。使用する水銀量を最小限にするため, 20mg/lの塩化第二水銀を含む2mlの軟寒天培地に試料を加え, あらかじめ作成した薬剤を含まない寒天平板培地の上に重層する軟寒天重層法を開発した。

また, 環境中の組換え微生物を検出するためには, 環境試料から組換え微生物を回収あるいは分散させて適当に希釈する必要がある。水環境中では組換え微生物は水中に分散しているため特に問題がないので, 土壌環境中からの組換え微生物の分散, 回収法について検討した。その結果, 試験管ミキサーを用いた3分間振とう分散法が最も操作が容易でかつ大量の試料の処理が可能であることが明らかとなった。さらに土壌試料においては寒天平板培地上で糸状菌が生育し組換え微生物の検出を困難にするため, 糸状菌の生育を抑える手法について検討を加えた。糸状菌に特異的に働いてその生育を阻害する抗生物質であるシクロヘキシミドを上記の軟寒天培地2mlに対して5mg添加する手法を開発した。

2.2 環境中における組換え微生物の挙動と挙動に及ぼす環境因子の影響に関する研究

2.2.1 外来遺伝子の環境中における挙動

(1) 遺伝子の安定性

各温度でのPpY101における水銀マーカを組み込んだ組換えプラスミドpSR134の保持率を比較検討した(図26)。10℃が最も安定性が高く7日後でも90%以上の菌がプラスミドを保持していた。さらに各種組換え体PRS2000, LB303, PAO1, HB101, R16を栄養培地で増殖させ, 世

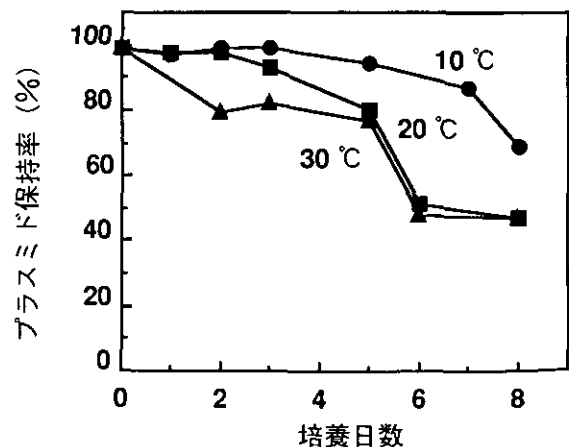


図26 各温度における組換えプラスミドの保持率

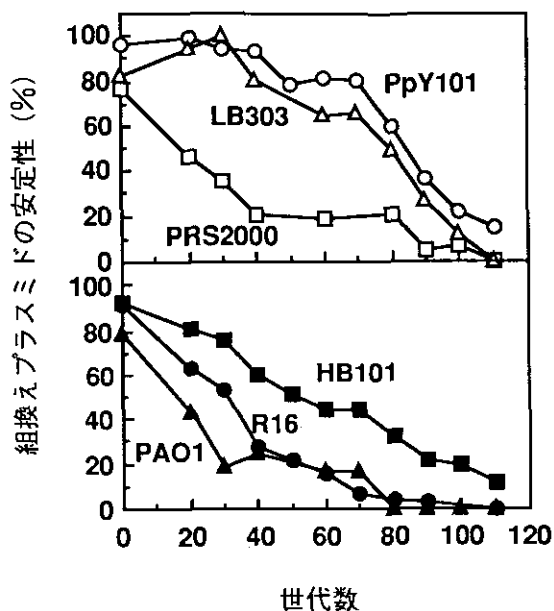


図27 各種宿主における組換えプラスミドの安定性

代数と組換えプラスミド安定性との関係を求めた(図27)。安定性は宿主により大きく異なることが示された。

(2) 遺伝子の伝達性

多くの微生物においてその遺伝情報が接合によって他の微生物へ伝達することが知られている。伝達に関与する遺伝子群 (tra遺伝子) は、微生物のプラスミド (伝達性プラスミド) にコードされていることが多い。また伝

達性プラスミドを保持する微生物 (ヘルパー) を共存させると、本来単独では伝達が認められない非伝達性プラスミドが可動化して他の菌へ伝達していくことも知られている。環境中に導入した組換え体の遺伝情報が他の菌へ接合伝達する可能性があるため、水銀マーカーのメンブランフィルター上での伝達性試験を行った。組換えプラスミドを保持する菌株、受容菌およびヘルパーの培養液をメンブランフィルターでろ過し、平板上で伝達を行わせた。水銀マーカー単独での伝達は認められなかったが、伝達性プラスミドの共存下では $5.2\sim 7.1\times 10^{-4}$ (伝達菌/受容菌)の頻度で伝達することが認められた(表5)。また染色体にtra遺伝子がコードされている場合 (S17-1/pSUP104)でも伝達することが示され、用いる宿主によっては環境中へ組換え遺伝子が拡散する可能性が示唆された。

2.2.2 水環境中における組換え微生物の挙動

(1) 水質の影響

水銀化合物分解組換え微生物を用いて、組換え微生物の挙動に及ぼす環境因子の影響を調べた。500ml容三角フラスコに手賀沼水、桜川河川水、筑波山湧水を200ml入れ水系マイクロコスムを作成した。いずれの環境水中においても水銀耐性菌は検出されず、水銀マーカーは組換え体の検出に有効であることを確認し、これに組換え体 (PpY101/pSR134) 及び非組換え体 (PpY101) をそれ

表5 組換えプラスミドのフィルター上での伝達性試験

供与菌/プラスミド	受容菌	ヘルパー	伝達菌
			伝達頻度(伝達菌数/受容菌数)
<i>E. coli</i> HB101/pSR134	<i>P. putida</i> PpY101		<i>P. putida</i> PpY101/pSR134 0*
<i>E. coli</i> HB101/pSR134	<i>P. putida</i> PpY101	<i>E. coli</i> HB101/pKT2013	<i>P. putida</i> PpY101/pSR134 7.1×10^{-4}
<i>P. putida</i> PpY101/pSR134	<i>E. coli</i> HB101	<i>E. coli</i> HB101/pKT2013	<i>E. coli</i> HB101/pSR134 5.2×10^{-4}
<i>E. coli</i> S17-1/pSUP104	<i>P. putida</i> PpY101		<i>P. putida</i> PpY101/pSUP104 5.5×10^{-4}

* 検出限界以下

ぞれ接種した。環境水をあらかじめメンブランフィルターで処理してあらゆる生物を除いたろ過水中では、組換え体と非組換え体はいずれも実験開始後14日目まではほとんど減少が認められなかったが、無処理水では5日目までに急激な減少が認められ、環境水中の他の生物との相互作用によって組換え体が減少していくことが示唆された(図28)。また減少速度には組換え体と非組換え体とで大きな差は認められなかった。次に、原生動物等の真核生物の生育を阻害する抗生物質シクロヘキシミドを手賀沼水に添加し、組換え体の生残性を検討した。原生動物の活動を抑えることにより組換え体の減少速度は低下した。環境水中における組換え体の減少の要因として、原生動物の捕食作用が重要と考えられた。

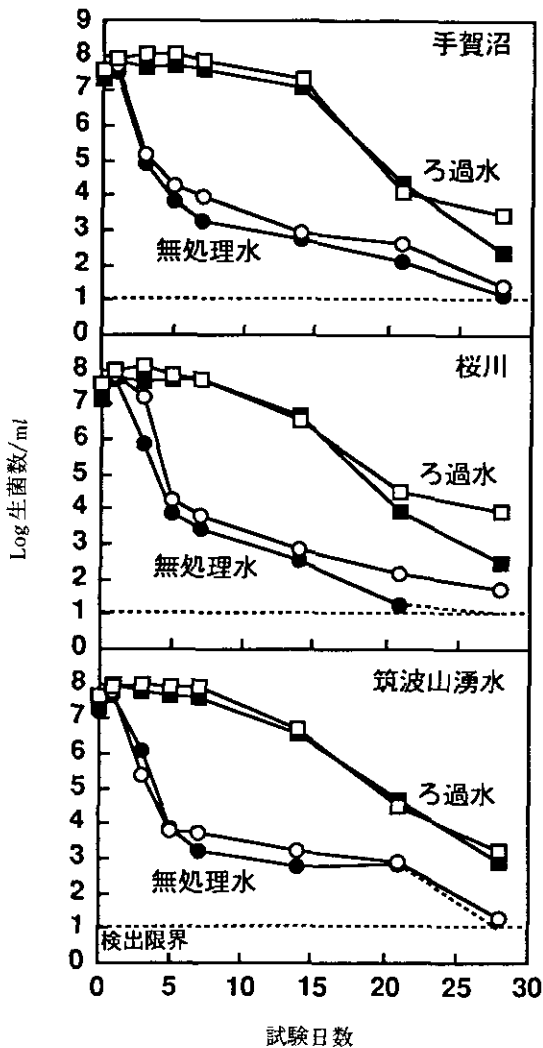


図28 各種環境水中における組換え微生物の生残性
 ■, ●; 組換え体
 □, ○; 非組換え体

(2) 光の影響

水銀化合物分解組換え微生物を用いて、組換え微生物の挙動に及ぼす光の影響を調べた。500ml 容三角フラスコに手賀沼水200mlを分注し、これを水系マイクロコズムとした。これに組換え体 (PpY101/pSR134) 及び非組換え体 (PpY101) をそれぞれ接種した。5,000ルクスの光照射と暗所の系における生残性を比較した(図29)。光照射により組換え体、非組換え体ともに生残性は悪くなった。光により藻類の活性が高まるとともに微生物、原生動物等の生物活性が強くなり、外来の生物である組換え体との競争、捕食作用が強まりその結果、組換え体の死滅が速くなったと考えられる。また、組換え体と非組換え体の生残性に大きな違いは認められなかったが、若干組換え体の方が速く死滅した。

(3) 接種量の影響

水銀化合物分解組換え微生物を用いて、組換え微生物の生残性に及ぼす接種濃度の影響を調べた。500ml 容三角フラスコに手賀沼水200mlを分注し、これを水系マイクロコズムとした。これに組換え体 (PpY101/pSR134) 及び非組換え体 (PpY101) を $10^3 \sim 10^7$ CFU/ml のオーダーで変化させそれぞれ接種し、5,000ルクスの光照射条件下における生残性を比較した。いずれの濃度の場合も培養一週間後には $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml のオーダーに低下したが、その後3週間まではほとんど同数を維持した。水系マイクロコズム中では細胞数が低い場合は長期間の生残が可能であること、また組換え体の方が非組換え体に比べ

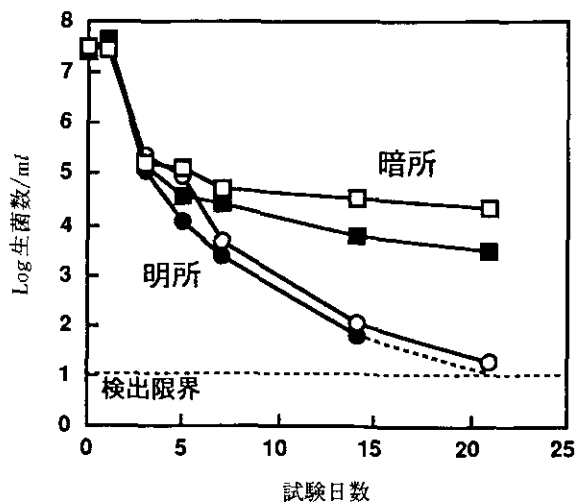


図29 組換え微生物の生残性に及ぼす光の影響
 ■, ●; 組換え体
 □, ○; 非組換え体

や速い速度で死滅するものと考えられた (図30)。

2.2.3 土壤環境中における組換え微生物の挙動

(1) 土壤の種類の影響

水銀マーカーを導入した組換え微生物の生残性に及ぼす土壤の種類の影響を調べた。500ml 容深型シャーレに黒ボク土および砂質土を充てんし、これを土壤系マイクロコズムとした。これに組換え体 (PpY101/pSR134) および非組換え体 (PpY101) を 10^7 生菌数/g 接種し、その生残性を比較した (図31)。組換え体、非組換え体とも

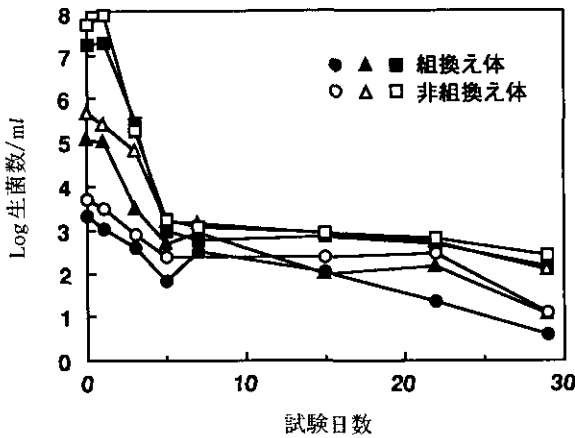


図30 手賀沼水中における組換え体および非組換え体の生残性に及ぼす接種量の影響

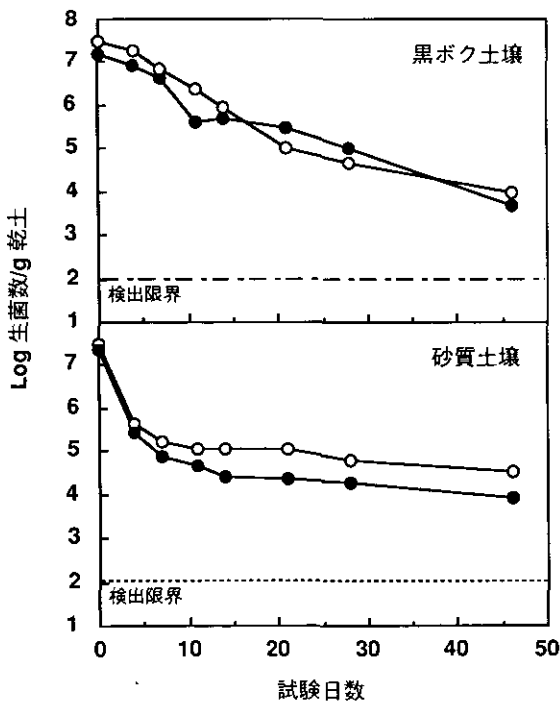


図31 各種土壤中における組換え体の生残性
●; 組換え体, ○; 非組換え体

黒ボク土においては試験期間を通じて穏やかな減少を示した。また両者の生残性に大きな違いは認められなかった。一方、砂質土壌では4日後に急激に死滅したが、その後は非常に穏やかに減少を示した。また組換え体の方が非組換え体に比べてやや早い速度で死滅することが認められた。

(2) 水分含量の影響

組換え微生物の生残性に及ぼす土壤水分の影響を、土壤系マイクロコズムを用いて調べた。生土の場合、沖積土では *K. oxytoca* R16, *P. putida* PpY101とも、最大容水量の40%の水分含量の時に生残性が最も良く、8週後でも菌数はほとんど減少しなかった。20%では1週間目に菌数が大きく減少し、8週目には検出限界 (10^2 CFU/g・乾土) 以下となった。一方、60%以上では、水分含量が多くなるほど生残性が悪くなる傾向にあり、*K. oxytoca* は灌水状態で6週目に検出限界以下となった。また、火山灰土では沖積土に比べて全体的に生残性が悪かったが、水分の影響をみると沖積土の場合と同じような傾向にあった (図32)。

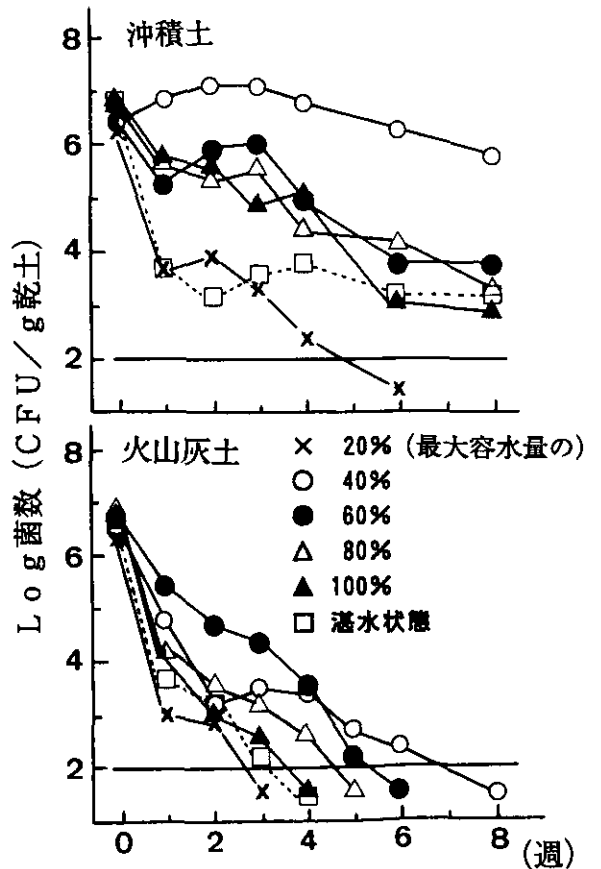


図32 *Pseudomonas putida* 生残性に及ぼす土壤水分の影響

土壤カラムにおけるBHC分解菌の移動に及ぼす土壤水分、灌水量、数種の添加有機物質の影響を調べた。淡色黒ボク土を充てんした透水カラム及び不透水カラム（充てん土層の厚さ：13cm、その含水比：最大含水量に近い量）の土壤上端1cmにBHC分解菌を 10^8 匹/g・乾土添加した後、透水カラムのみに菌添加直後と1、7、8日後に灌水（24.5ml）を行って、両カラムにおける本菌の生残数と移動性を調べた。BHC分解菌の検出限界は数匹/g・乾土であった。本菌は水で洗脱されやすい状態と洗脱されにくい状態で土壤中に生残しており、灌水は前者の菌を速やかに下方移動すると推測された。

(3) 土壤pHの影響

土壤系マイクロゾウムにおけるBHC分解菌の生残性、増殖性等の挙動に及ぼすpHの影響を調べた。6種類の土壤（砂土2種、沖積土2種、火山灰土2種）を用い、BHC分解菌の生残性に及ぼす土壤pHの影響、土着の生物の影響を調べた。その結果、BHC分解菌の生残性は、沖積土で最も高く、以下火山灰土、砂土の順であった（図33）。土壤pHを7に補正した場合には、特に火山灰土で生残性が高まり、沖積土とほとんど差がなくなった。また、土壤を滅菌して土着の生物の影響を除いた場合には、ほと

んど土壤でBHC分解菌の生残性は高まり、8週後でも添加直後の菌数が維持され、土壤間差も小さかった。ただし、pHの低い土壤では、菌数は低いレベルで維持された。土壤に添加されたBHC分解菌の生残性に土着の生物、土性、土壤pHは大きな影響を及ぼすことが判明した。

(4) 接種量の影響

土壤中の生残に及ぼす接種菌体濃度の影響について調べた。 $10^5 \sim 10^9$ CFU/g・乾土のオーダー接種したところ、組換え体、非組換え体ともにいずれの濃度においても死滅速度に大きな差は認められなかったが、濃度が高い方がやや速い死滅速度を示した（図34）。

(5) 土壤ライシメータにおける挙動

土壤生態系をシミュレートできるライシメータを作成した。すなわち淡色黒ボク土壤（茨城県旧筑波町内の畑地の80cm以浅の下層土）を粉碎し、4.75mmのメッシュのフルイに通した供試土壤をステンレス製ライシメータ（75（縦）×75（横）×60（深さ）cm）に充てんした。あらかじめライシメータ底部の排水口部にはステンレス製メッシュを取り付け、その上層には薄く小型の磁性ボール（径約15mm）を敷き詰めた。土壤を土層の厚さが10数cm

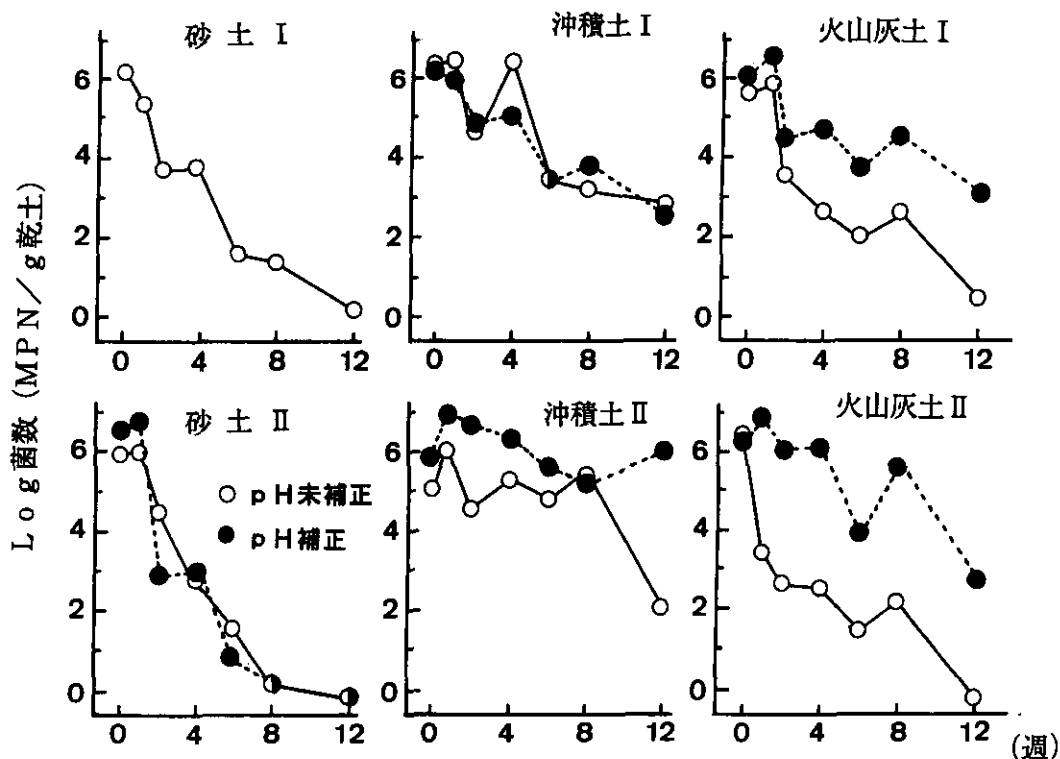


図33 各種土壤中でのBHC分解菌数の消長

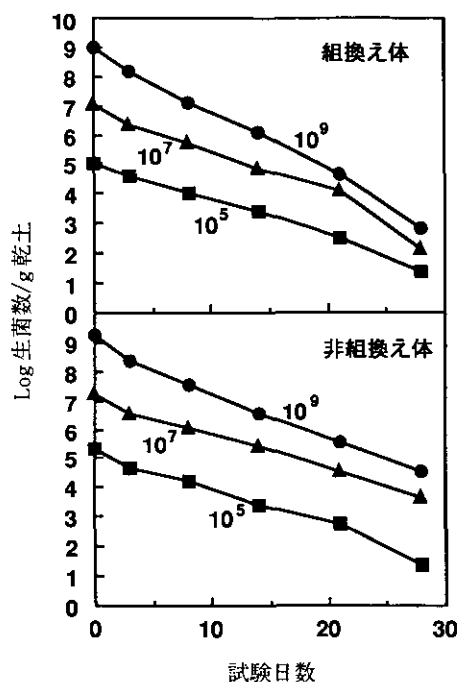


図34 黒ボク土壌における組換え体、非組換え体の生残性に及ぼす接種量の影響

になるまで充てんし、適量の蒸留水で湿らせた後、押し固め、土壌硬度計で測定される充てん土層全体の密度がほぼ均一となるようにした。土壌を充てんしたライシメータは、25℃に制御したガラス温室に設置した。充てんした土壌に週2回灌水(計4.5l)を2カ月以上行い、その土壌生態系が安定化するようにした。

次いで、菌体散布法の検討を行った。水銀化合物分解組換え体 (PpY101/pSR134)、非組換え体 (PpY101) 及びBHC分解菌 (SS86) をそれぞれ培養し、噴霧器を用いてライシメータ土壌表面全体に均一となるように散布した。散布量は表層10cm中に約 10^7 匹/g・乾土とした。

サンプリング法についても検討し、接種した菌の垂直方向への移動性を調べるために、深さ方向のサンプリングが可能なステンレス製の土壌試料採取器(内径20mm、長さ60cmの直管)を作製した。本採取器は採取した土壌の取り出しを容易にするため、縦に2分割できる構造になっている。

本実験で使用した土壌における水銀化合物分解組換え体及び非組換え体の検出限界は、乾燥土壌1g当たり10匹であった。接種後3日目には組換え体、非組換え体ともに菌数は接種時の1/10以下となった。その後は穏やかな減少を示し、56日後には組換え体は検出限界以下(<10CFU/g)となり、非組換え体においてもほぼ検出

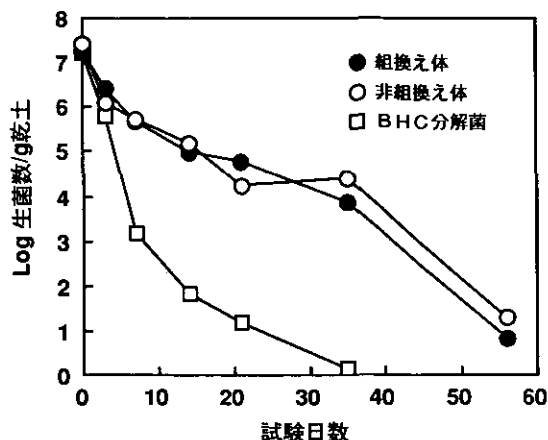


図35 ライシメータ表層土壌における組換え微生物及びBHC分解菌の生残性

限界の10CFU/gとなった(図35)。組換え体と非組換え体の生残性には、違いは認められなかった。また、試験期間を通じて、組換え体及び非組換え体はライシメータ土壌の下層には検出されず、10cm以上の垂直方向への移動は認められなかった。一方、BHC分解菌は、灌水によって土壌中を下方移動することが認められた。表層土壌中のBHC分解菌は接種後速やかに減少し、35日目には全く検出されなかった(図35)。BHC分解菌の下方移動は比較的速やかに起こり、接種後3日目には最下層(40~50cm深)の土壌にも検出された。

(6) 水田における挙動

水士系マイクロコズムにおける組換え窒素固定菌 *K. oxytoca* の挙動を調べた。2lのプラスチック製ポットに沖積土壌を灌水しつつ充てんした後、溜水し水士系マイクロコズムとした。また菌の生残性に及ぼす植物の影響を調べるために水稻を植えた系も用意した。供試菌はポット土壌の表層5cmに 10^7 CFU/g・乾土オーダーを添加し混和した。水稻栽培は温度:20(暗時)~30℃(明時)、湿度:70~75%、照度:ポット上面1~2万ルクスの人工環境条件下で行った。非組換え窒素固定菌NG13、組換え体R16及び水銀分解能を導入したR16/pSR134の土壌層及び溜水層における生残性を比較した。土壌層、溜水層ともに非組換え体NG13が最も生残性が良く、次いでR16、R16/pSR134の順であった(図36)。また、添加菌の生残性に及ぼす水稻の影響は認められなかった。

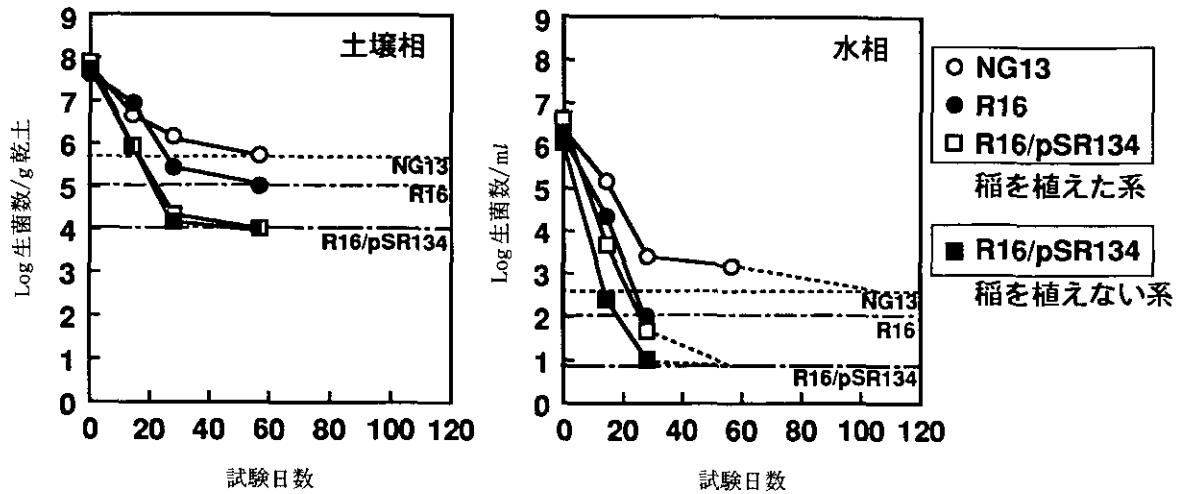


図36 水・土壌マイクロコズムにおける組換えおよび非組換え窒素固定菌の生残性

2.3 遺伝子組換え生物の生態系への影響に関する研究

2.3.1 制御実験系を用いた組換え微生物の生物相に及ぼす影響

(1) 水圏モデル微生物生態系フラスコマイクロコズムシステムの作製

マイクロコズムとは制御環境条件下で個体群または群集をある容器内で培養し、生物、物理、化学的要因とそれらの相互作用から生じる現象をエコシステムレベルにおいて解析できるモデルである。本研究で用いたマイクロコズムは種構成完全既知の Gnotobiotic 型マイクロコズムであり、生産者としての藻類として緑藻類 *Chlorella* sp., 糸状藍藻類 *Tolypothrix* sp., 捕食者の原生動物として繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma*, 微小後生動物として輪虫類 *Philodina* sp., 貧毛類 *Aeolosoma hemprichi*, 分解者の細菌として *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp., *Coryneform bacteria* から構成される。このフラスコマイクロコズムは、実際の自然環境水を人工培地を用いて継代培養を繰り返すことにより作製された系であるため、実際の水環境中に存在する生物間相互作用、物質循環、エネルギーフローを含有する系であり、より実際の生態系に近い系をモデル化したものである。また、非常に高い再現性と安定性を有していることを特徴とするモデル水圏微生物生態系である。

フラスコマイクロコズムの培養は、300ml 容三角フラスコに Taub の無機塩溶液にポリペプトン（日本製薬製）50mg/l を添加した TP₅₀ 培地 200ml に 2 カ月間継代培養しているフラスコマイクロコズムを種として 5 ml 接種した

後、温度 25℃、照度 2,800ルクス（明期 12 時間、暗期 12 時間）、静置条件下で行った。この方法を繰り返すことにより、同様の種構成・バイオマス量を示すフラスコマイクロコズムが作成された。

フラスコマイクロコズムの微生物相の変遷は図 37 に示すとおりである。フラスコマイクロコズムは遷移期を経て培養開始後 16 日目には安定期に達し、*C. glaucoma* は 1.0×10^2 N/ml 程度、*Lepadella* sp. は 3.0×10^1 N/ml 程度、*Philodina* sp. は 4.0×10^1 N/ml 程度、*A. hemprichi* は 1.0×10^1 N/ml 程度、*Chlorella* sp. は 2.0×10^4 N/ml 程度、*Tolypothrix* sp. は 1.0×10^2 cm/ml 程度、細菌類は 10^6 N/ml 程度の個体数が維持され、いずれの微生物も欠落することなく共存可能であった。また、この系は 100 日以上に渡っ

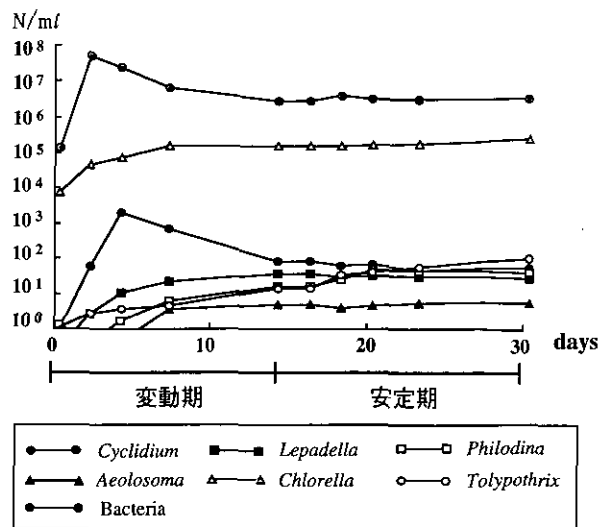


図37 マイクロコズムにおける微生物相の変遷

て維持された。

よって、遺伝子組換え生物の環境影響評価のための制御生態系として有用である、再現性が高く、長期間安定性が高いフラスコマイクロコズムが作製された。

(2) フラスコマイクロコズムの構成微生物の組み合わせについての検討

水圏モデル微生物生態系としてフラスコマイクロコズムを用い、その種構成の違いが生物間および生態系の安定性にいかなる影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として検討を行った。構成微生物は分解者の細菌類として *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Coryneform bacteria*, 生産者の藻類として藍藻類 *Tolypothrix* sp., *Oscillatoria agardhii*, *Anabaena flosaquae*, *Microcystis viridis*, 緑藻類 *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Chlamydomonas monticola*, 捕食者の微小動物として原生動物繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma*, *Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium campylum*, 後生動物輪虫類 *Lepadella* sp., *Philodina* sp., 後生動物貧毛類 *Aeolosoma hemprichi* を対象とし種構成の異なる24系のマイクロコズムを作成して検討を行った。各系の種構成の組み合わせは表6に示すとおりである。

その結果、安定生態系を得るためには、特に原生動物と緑藻類の組み合わせが重要であることが分かった。藻

類, 原生動物, 後生動物の種構成の組み合わせ数と系の安定性との関係は図38に示すとおりである。その結果、安定系の形成された8種類のマイクロコズムシステムは、単に種構成が多様であることに基づくのではなく、種構成が単純でも、いかなる種と組み合わせるかが重要であることが分かった。すなわち系の安定性と種の多様性との関連性は低いことが明らかとなった。

また安定系の得られた種構成の異なるマイクロコズムを用いて遺伝子組換え微生物としての外来細菌 *Escherichia coli* HB101/pBR325 および微生物農薬 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* KH の挙動追跡および影響評価を行ったところ、いずれの系においても同様の結果が得られた。これより従来より用いてきたフラスコマイクロコズムは環境影響評価を行う上での標準モデルとして活用できることが分かった。

(3) フラスコマイクロコズムでの遺伝子組換え細菌の消長と土着生物への影響

フラスコマイクロコズムを用いて遺伝子組換え細菌の消長と系の土着生物への影響を検討した。遺伝子組換え細菌としては *E. coli* HB101/pBR325, *E. coli* S17-1/pCRO1, 微生物農薬 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KH を用いた。その結果、図39に示すようにここで用いた外来細菌はいずれも添加直後に減少し、系内で異常増殖することはな

表6 マイクロコズムの種構成の選定

微生物	系	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>Pseudomonas putida</i>		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Bacillus cereus</i>		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Acinetobacter</i> sp.		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Coryneform bacteria</i>		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Chlorella</i> sp.		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Scenedesmus quadricauda</i>													○				○	○	○				○	○	○
<i>Chlamydomonas monticola</i>								○					○							○	○	○	○	○	○
<i>Tolypothrix</i> sp.		○	○						○	○	○	○	○										○	○	○
<i>Oscillatoria agardhii</i>					○	○																	○	○	
<i>Anabaena flos-aquae</i>							○	○					○												
<i>Microcystis viridis</i>												○	○												
<i>Cyclidium glaucoma</i>		○	○	○	○	○	○								○			○			○		○	○	○
<i>Tetrahymena pyriformis</i>							○	○	○		○	○	○		○			○			○			○	
<i>Colpidium campylum</i>						○	○	○		○	○	○	○			○			○			○			
<i>Lepadella</i> sp.		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○										○	○	○
<i>Philodina erythroptalma</i>		○	○		○	○			○	○	○	○											○	○	○
<i>Aeolosoma hemprichi</i>		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○											○	○
*系の安定性		○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×	○	×

*○：安定，×：不安定

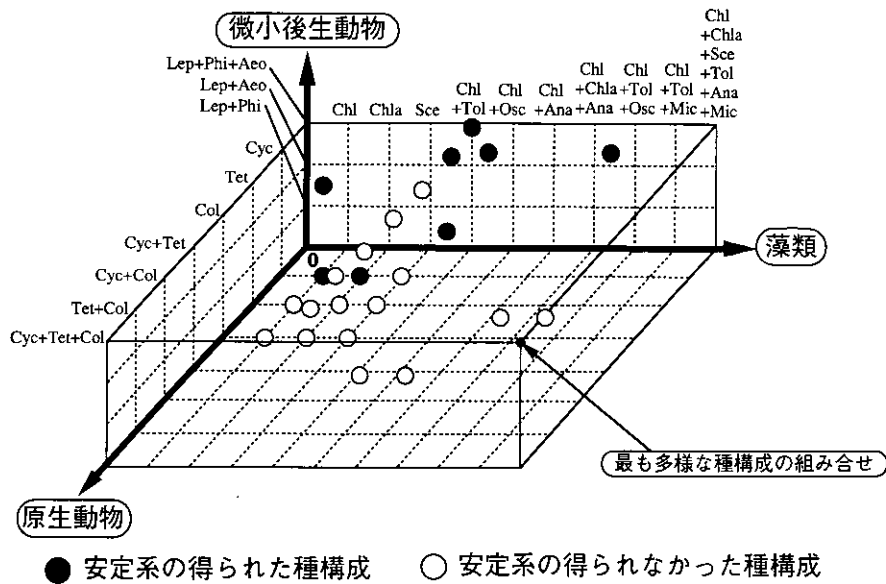


図38 マイクロコズムにおける種構成と系の安定性

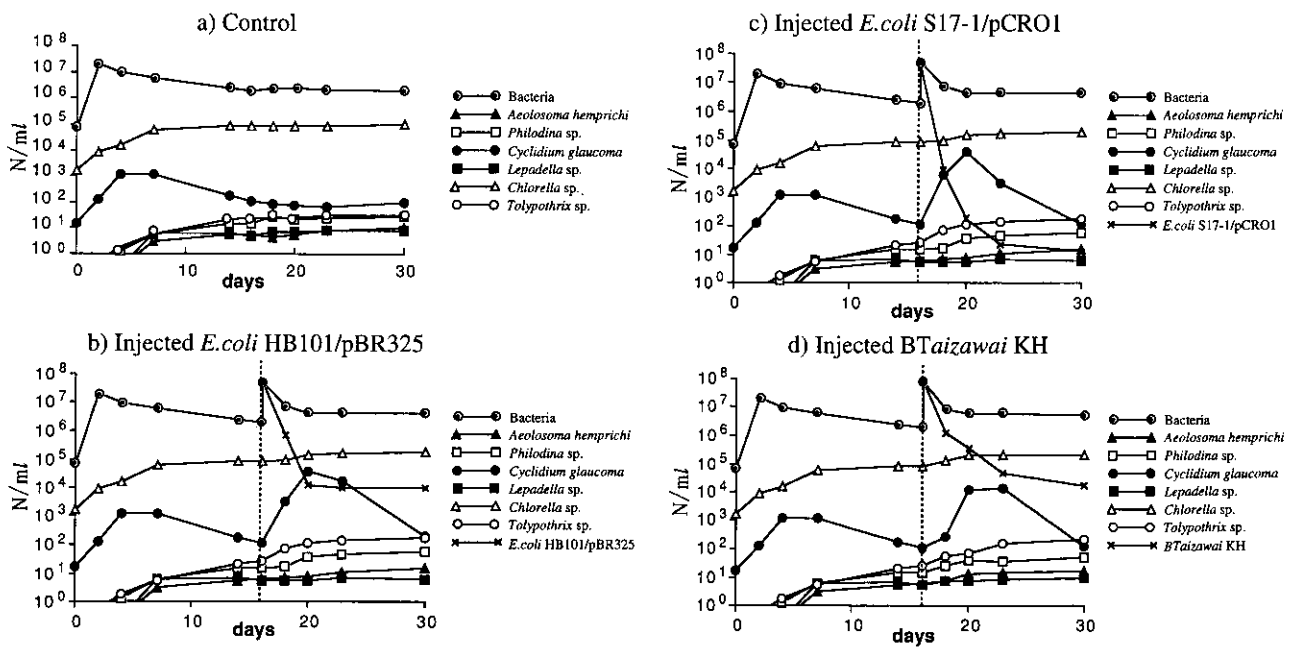


図39 フラスコマイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の消長と構成生物の固体数の変遷

かった。各遺伝子組換え細菌の減少速度は種類によって様々な傾向を示し、*E. coli* HB101/pBR325、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KHは添加後減少するものの低い個体数で生残り、*E. coli* S17-1/pCRO1は添加後急速に減少した。また、いずれの系においても添加直後に原生動物 *Cyclidium glaucoma* の増殖が認められた。このことは二者培養捕食被食試験の結果とも一致していた。また、それ以外の構成生物の個体数には大きな変動は認められなかった。

これらのことから外来細菌の消長には微小動物の捕食圧が大きな影響を及ぼしていることが分かった。

(4) フラスコマイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の消長と温度との関係

遺伝子組換え細菌としての微生物農薬 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KH (BT菌) を対象として、フラスコマイクロコズムを用いて、温度条件を変化させた場合におけ

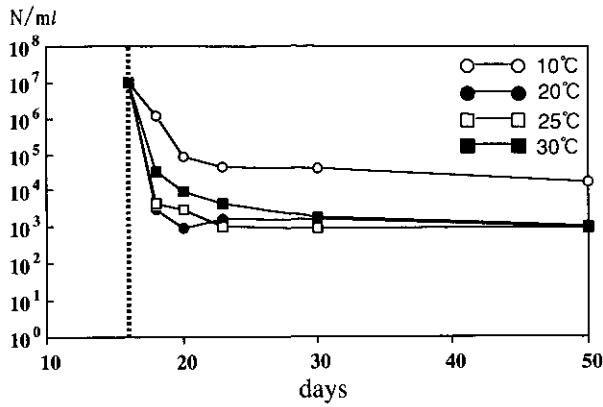


図40 各培養温度でのフラスコマイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌 *B.t.aizawai*/KH の消長

る微生物農薬の消長と、マイクロコズム構成種に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験的検討を行った。その結果、図40に示すように、遺伝子組換え細菌の挙動および生残性は温度に大きな影響を受け、低温条件下 (10°C) においてはBT菌の孢子形成が行われ、高温条件下 (20°C, 25°C, 30°C) よりも長期に渡って生残することが明らかになった。また、生物相がより多様で生物活性が高いと考えられる高温条件下では原生動物をはじめとする微小動物の捕食作用がBT菌の消長に大きな影響

を及ぼし、BT菌は微小動物の捕食作用を受けて減少したものと考えられた。これらのことから、BT菌の消長は季節変遷や気候変化により大きく異なり、低温条件下ではBT菌の孢子形成や微小動物の捕食活性の低下により捕食作用の影響が小さくなり長期に渡って生残し、高温条件下では微小動物の捕食作用の影響を受けて急激に減少するものと考えられた。

(5) 遺伝子組換え細菌の共存するフラスコマイクロコズムの継代培養における挙動解析

遺伝子組換え細菌として *E. coli* HB101/pBR325, *Pseudomonas putida* PRS2000 および *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KH を対象として、フラスコマイクロコズムを用いて生態系が変動期を経て安定期に至る過程を繰り返した場合における遺伝子組換え細菌と土着微生物との相互作用を解析することを目的として実験的検討を行った。その結果、図41に示すようにいずれの遺伝子組換え細菌を添加した場合でも添加直後に原生動物 *Cyclidium glaucoma* の急激な増殖が認められ、微小動物の捕食圧が遺伝子組換え細菌の消長に大きな影響を及ぼしていることが確認された。また、図42に示すように変動期の有無にかかわらず、非土着細菌である遺伝子組換え細菌はい

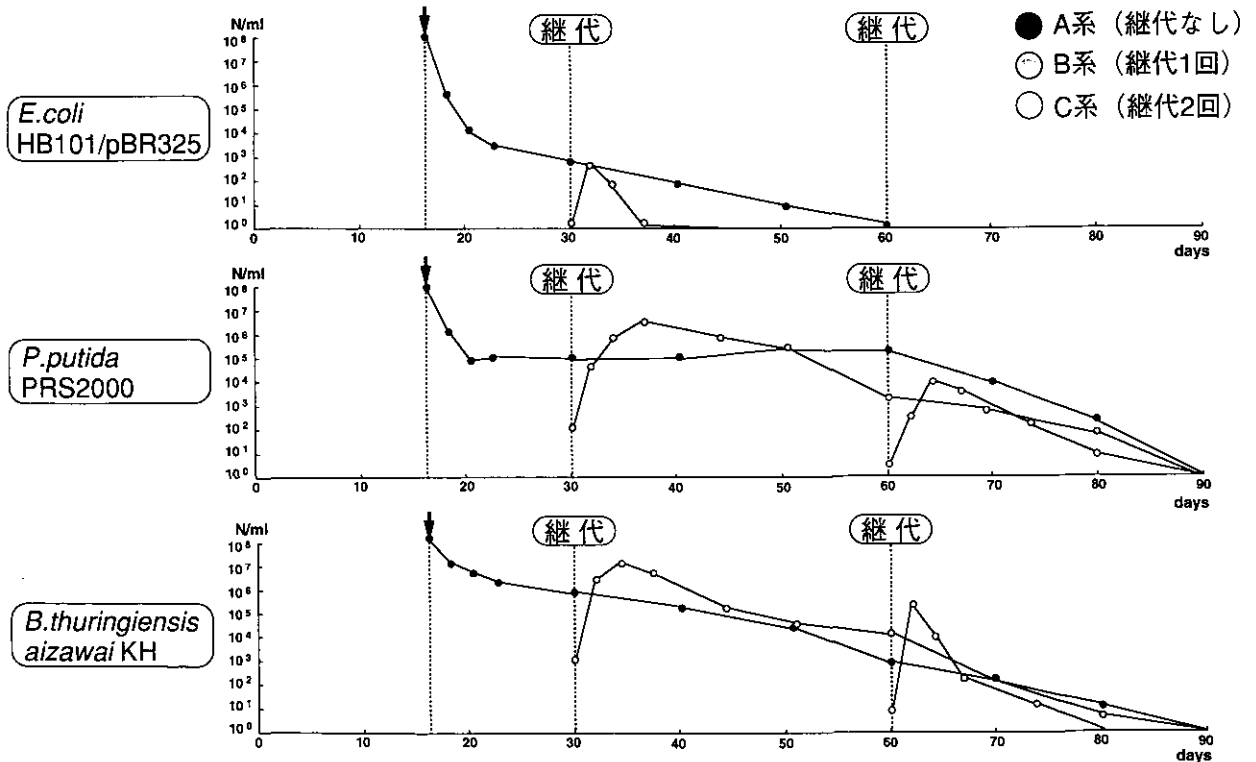


図41 変動期と安定期の繰り返しの培養条件の違いと遺伝子の組換え細菌の消長パターン

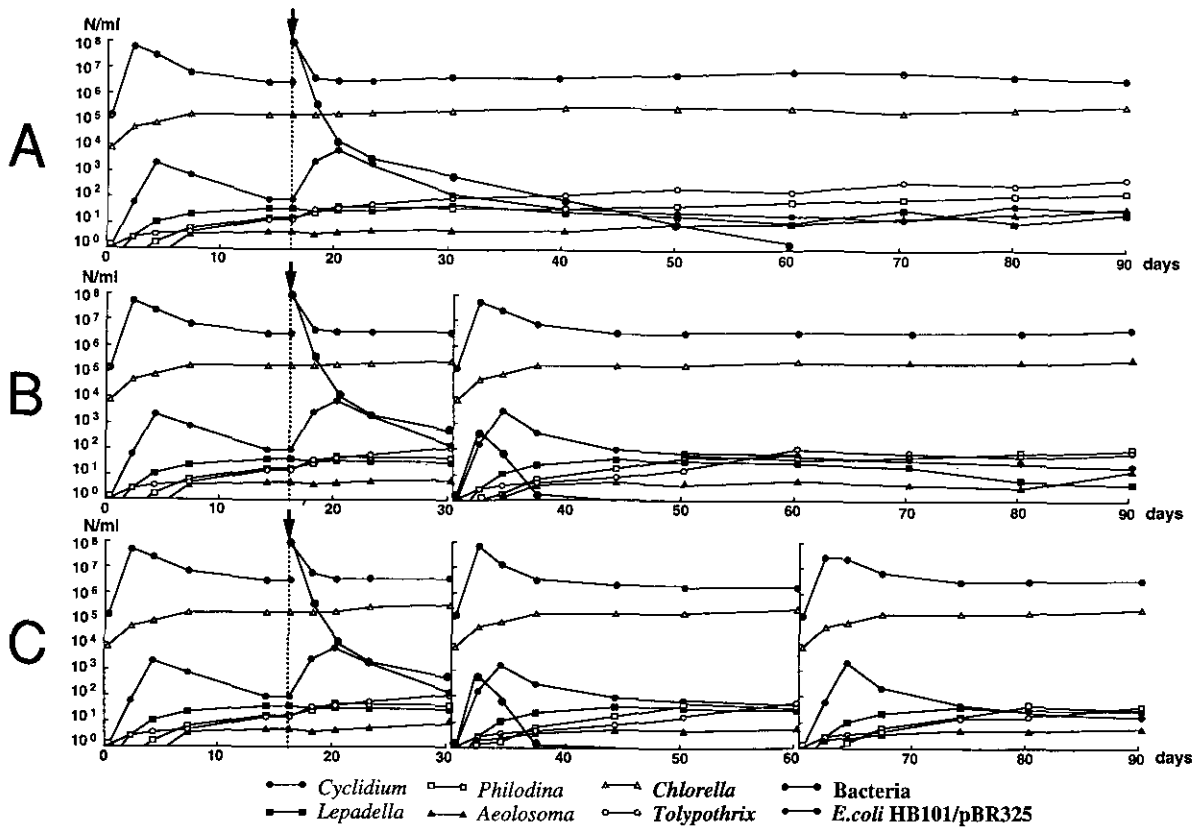


図42 遺伝子組換え細菌 *E. coli* 添加系におけるマイクロコズム構成微生物相の変遷

ずれも減少し、最終的には系外へ排除されたが、変動期の回数が多くなるほど生残期間が短くなる傾向にあった。さらに、フラスコマイクロコズムにおける生残性は *B. thuringiensis* \geq *P. putida* $>$ *E. coli* となり、土着細菌に近い種ほど長期間生残することが分かった。これらのことより、遺伝子組換え細菌が外来種として既存の生態系に侵入した場合には土着細菌に近い種の方が長期間残存し、系内に定着しやすい可能性が示唆されたが、本研究で用いた非土着細菌の遺伝子組換え細菌は変動期、安定期を繰り返す過程で土着細菌との競争に負け、最終的には消滅することが分かった。

(6) フラスコマイクロコズムの単純化と三種系マイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の消長

細菌類 4 種類、藻類 2 種類、原生動物 1 種類、後生動物 3 種類からなるフラスコマイクロコズムを単純化し、生産者としての緑藻類 *Chlorella vulgaris*、消費者としての原生動物繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma* および分解者としての細菌類 *Pseudomonas putida* から構成される三者系マイクロコズムを作成した。この三者系マイクロコズム

を用いて、遺伝子組換え細菌として *E. coli* S17-1/pSUP104, *E. coli* S17-1/pCRO1 および *E. coli* HB101/pBR325 を対象として、遺伝子組換え細菌の消長と、三者系マイクロコズム構成生物に及ぼす影響を解析することを目的として実験的検討を行った。その結果、図43に示すように非土着細菌は添加後繊毛虫類により捕食され減少するが、繊毛虫類にはそれ以上捕食できない細菌個体数密度が存在するために、非土着細菌がその密度まで減少すると捕食圧の作用が低下するため、系内で一定の個体数密度で生残することが分かった。また、三者系マイクロコズム構成細菌と非土着細菌の三者系マイクロコズムの定常状態で生残する個体数密度の違いは、土着細菌が低濃度の基質でも増殖できること、各種代謝産物の存在下でも増殖速度が速いことによるものと考えられた。

(7) 三者系フラスコマイクロコズムの数理モデルを活用した遺伝子組換え細菌の消長に関するシミュレーション解析

遺伝子組換え細菌のマイクロコズムにおける消長を予測するために、単純化した三者系マイクロコズムの数理

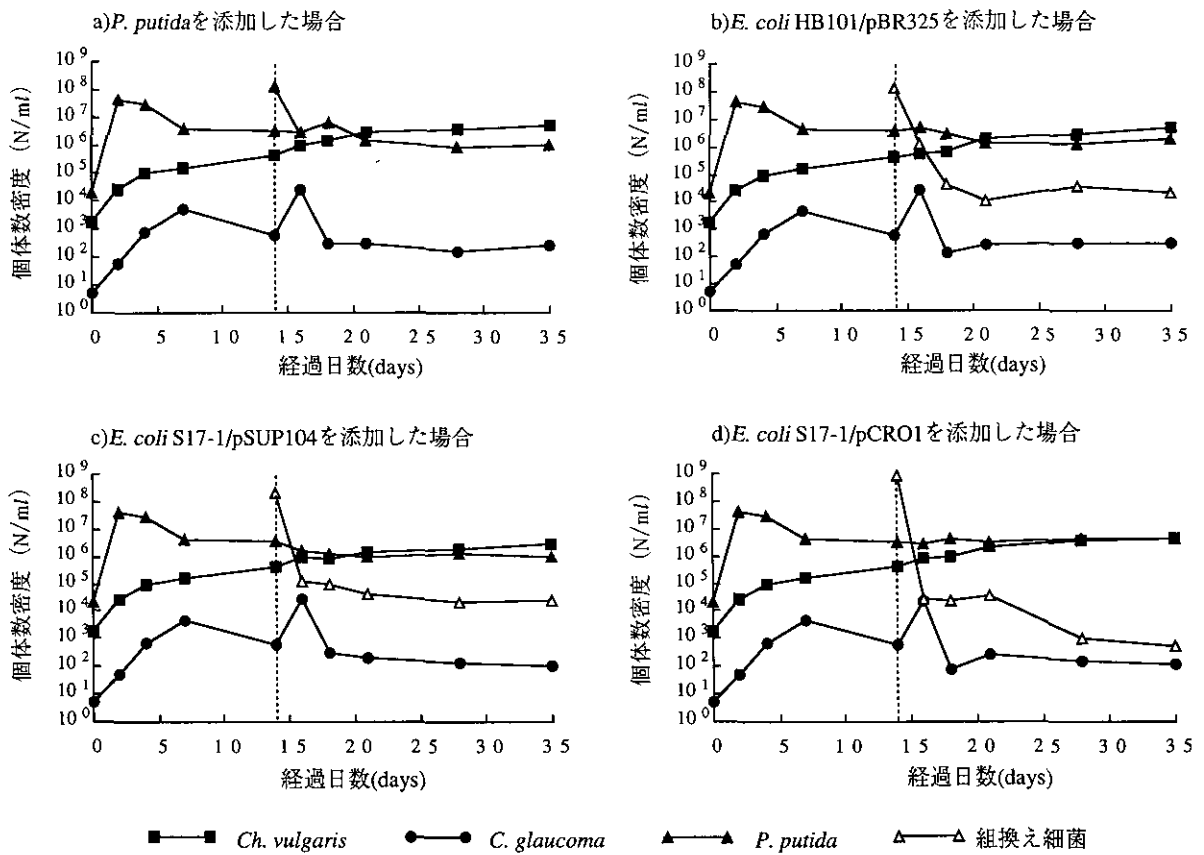


図43 遺伝子組換え細菌 10^8 N/ml 添加した場合の三者系マイクロコズムの変遷

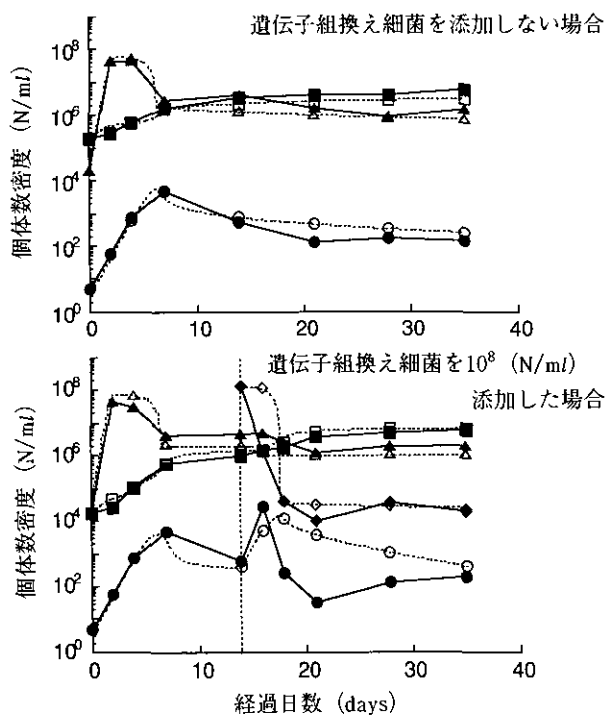


図44 三種系マイクロコズムに遺伝子組換え細菌を添加した場合のシミュレーション結果

- 緑藻 □--□ 緑藻(シミュレーション)
- ▲—▲ 土着細菌 △--△ 土着細菌(シミュレーション)
- ◆—◆ 組換え細菌 ◇--◇ 組換え細菌(シミュレーション)
- 原生動物 ○--○ 原生動物(シミュレーション)

モデルを作成し、遺伝子組換え細菌の消長と土着生物の個体群動態のシミュレーション解析を行った。その結果図44に示すように、実測値と計算値がほとんど一致し、遺伝子組換え細菌の消長、および三者系マイクロコズム構成生物の個体群動態の予測に用いることができるものと推察された。

2.3.2 模擬生態系による組換え微生物の生態系影響評価

(1) 水系マイクロコズム

500ml 容三角フラスコに手賀沼水200ml を分注し、これを水系マイクロコズムとした。各種菌体濃度 ($10^3 \sim 10^7$ CFU/ml) になるように組換えおよび非組換え *P. putida* PpY101/pSR134, *P. putida* PpY101 をそれぞれ接種し、一般細菌数、原生動物数及び藻類(クロロフィルa) に及ぼす影響を検討した。組換え体、非組換え体ともいずれの生物数に及ぼす影響も認められなかった(図45)。

さらに野外試験の前段階の環境影響評価試験に位置すると考えられる模擬環境マイクロコズム試験により検討を行った。模擬環境マイクロコズムの概要は図46に示すように、自然環境水を40l 容の亚克力水槽に注水し、培

養温度25℃, 照度2,800ルクス(明期16時間/暗期8時間), エアポンプでの微攪拌条件下で培養する系とした。この模擬環境マイクロコズムに, 遺伝子組換え細菌として

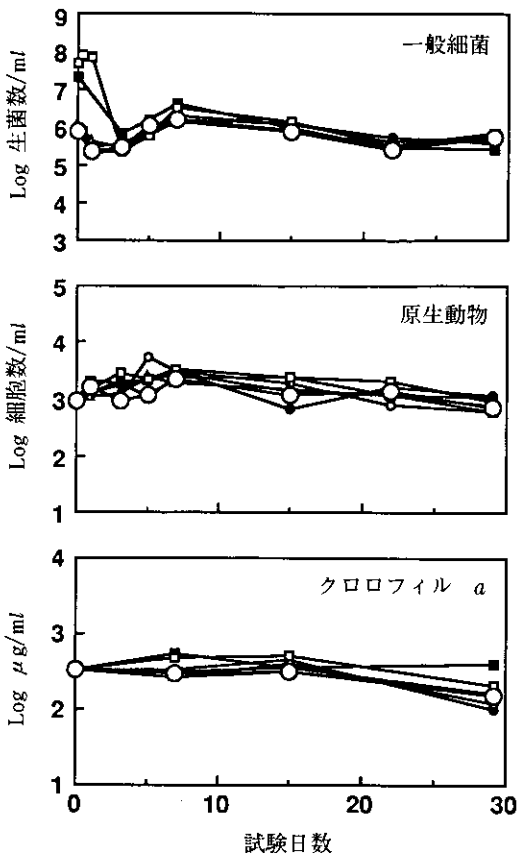


図45 手質沼水中の各種生物に及ぼす組換え体, 非組換え体接種の影響
 組換え体接種: ●(10³CFU/ml), ▲(10⁵CFU/ml), ■(10⁷CFU/ml)
 非組換え体接種: ○(10³CFU/ml), △(10⁵CFU/ml), □(10⁷CFU/ml)
 無接種: ○

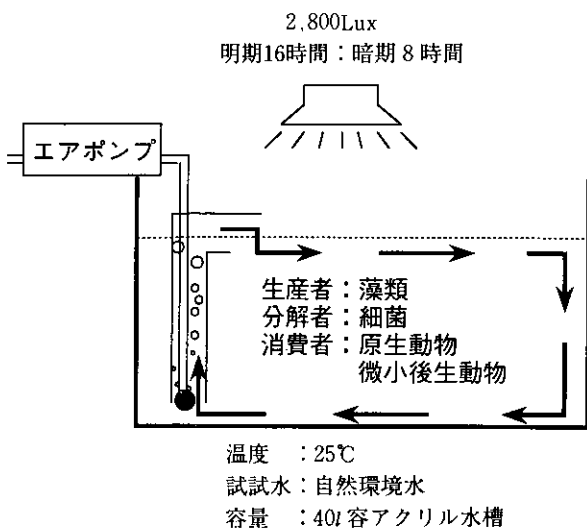


図46 模擬環境マイクロコズム試験の概要

E. coli S17-1/pCRO1, *E. coli* HB101/pBR325, *P. PAO1* および, *P. putida* PRS2000を用いた。環境水としては湖水として西湖, 海水として駿河湾, 浜名湖および伊勢湾, 河川水として大井川上流および下流を用いた。その結果, 図47に示すように挙動は種ごとに異なり, 系内に生残せずに減少するタイプと, 減少するものの低い個体数で生残するタイプとに分けられた。また, 土着生物については, 実験開始後, 原生動物等の個体数の増加が認められたが, それ以外の土着生物については個体数の大きな変動は認められなかった。この外来細菌の消長の原因に対して, その要因としては, 生物的要因として微小動物の捕食圧, 物理化学的要因として藻類の代謝産物, 微量化学物質の影響などが関与しているものと推察された。

(2) 土壌マイクロコズム

500ml 容深型シャーレに黒ボク土壌および砂質土壌を充てんし, これを土壌マイクロコズムとした。これに10⁷ 細菌数/gの組換え体 (*P. putida* PpY101/pSR134) および非組換え体 (*P. putida* PpY101) を接種し, 一般細菌, 糸状菌に及ぼす影響を検討した。組換え体接種, 非組換え体接種および対照として無接種のマイクロコズム土壌の微生物数を比較した (図48, 49)。試験期間を通じて, 組換え体, 非組換え体接種のいずれの微生物数に及ぼす影響は認められなかった。

(3) ライシメータ

2.2.2 (5) に記述したように, 粉碎して4.75mmのメッシュのフルイに通した淡色黒ボク土壌を充てんしたステンレス製ライシメータ (75(縦)×75(横)×60(深さ)cm) における組換え体接種の影響評価を行うために, まずライシメータの垂直方向における土壌微生物の分布を調べた (図50)。表層から10cmごとの土壌を50cmまでサンプリングし, それぞれの土壌試料に含まれる微生物数を計数した。その結果, 本ライシメータにおいては表層から10cmまでの土壌中に全体の90%以上の微生物が生息していることが明らかとなった。また, 組換え体の接種は土壌表面の散布により行われるため影響評価は, 表層から10cmの土壌について行うこととした。

水銀化合物分解組換え体 (PpY101/pSR134), 非組換え体 (PpY101) およびBHC分解菌 (SS86) をそれぞれ培養し, 噴霧器を用いてライシメータ土壌表面全体に均一となるように散布した。散布量は表層10cm中に約10⁷匹/g

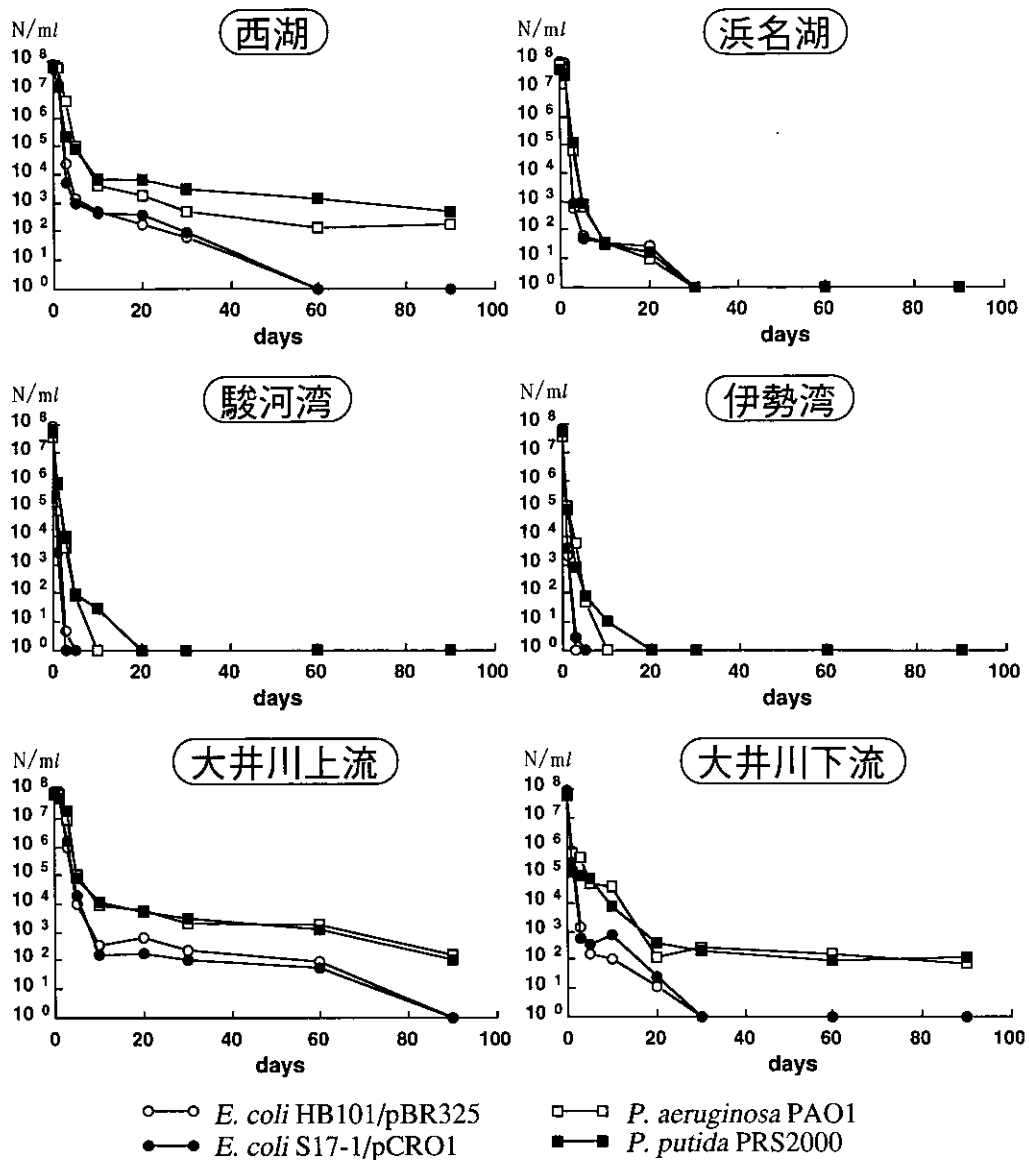


図47 各模擬環境マイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の挙動

乾土とした。表層から10cmまでの土壌をサンプリングし、供試微生物接種後のライシメータ土壌中の一般細菌、グラム陰性菌、糸状菌及びβ-グルコシダーゼ等の土壌酵素活性への影響を調べたところ、組換え体、非組換え体、BHC分解菌いずれも土壌微生物および酵素活性への影響は認められなかった(図51)。

供試微生物接種後のライシメータの土壌含水率及び土壌pHの変化を調べた。土壌pHはいずれのライシメータにおいても若干低くなったが微生物の接種による影響は認められなかった。また、ライシメータ土壌の全炭素、全窒素及びC/N比に対する影響について検討した結果、微生物を接種したことによる影響は認められなかった。

2.3.3 環境影響評価手法の開発

フラスコレベルおよび模擬生態系による実験結果から、遺伝子組換え微生物の野外利用における環境影響評価手法について検討を行った。試験手法としては、生態系を構成する土着生物への影響からの評価と遺伝子組換え微生物の消長からの評価に分けられ、基本的には両評価ともに問題がなければ使用可とすることとして解析を行うこととした。

(1) フラスコマイクロコズムにおける系の土着生物への影響からの評価

フラスコマイクロコズムを用いた系の安定性試験における影響評価試験方法としては、フラスコマイクロコズ

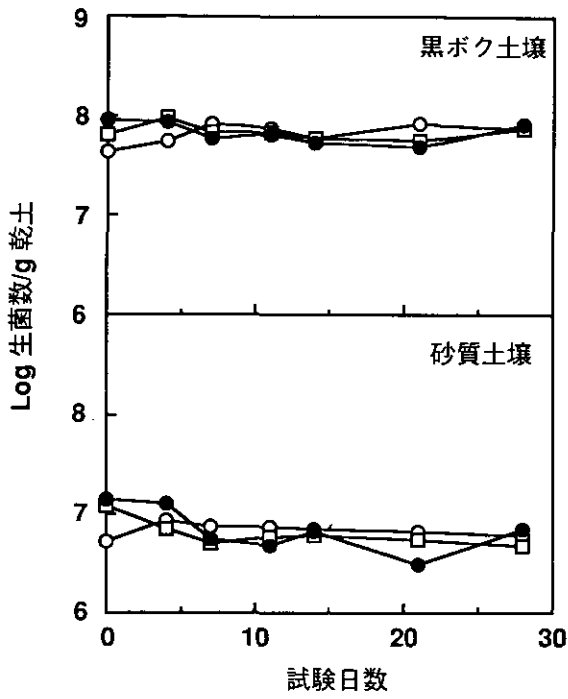


図48 各種土壌中の一般細菌に及ぼす組換え体の影響
○；組換え体接種，□；非組換え体接種，●；無接種

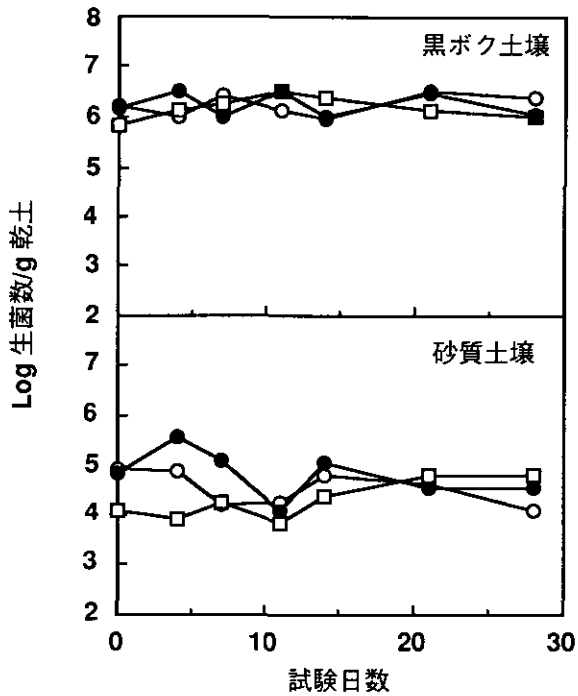


図49 各種土壌中の糸状菌に及ぼす組換え体の影響
○；組換え体接種，□；非組換え体接種，●；無接種

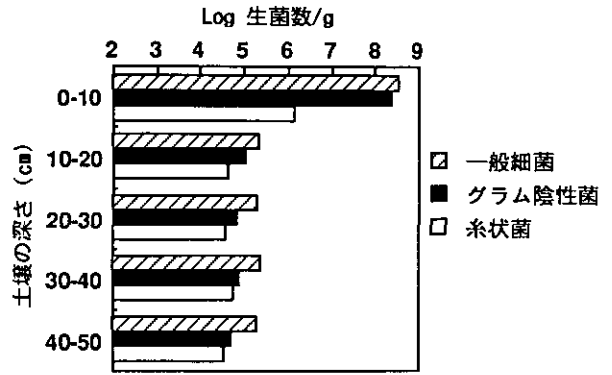


図50 ライシメータ土壌の垂直方向での微生物分布

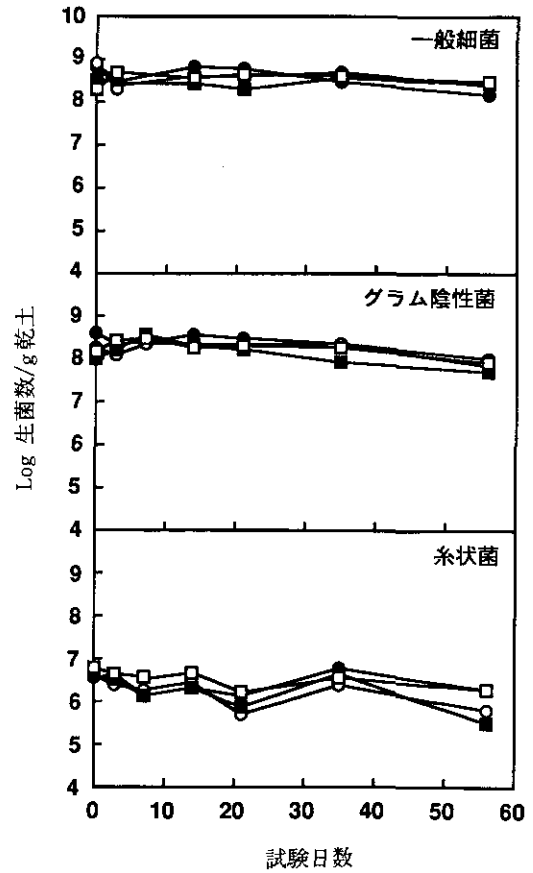
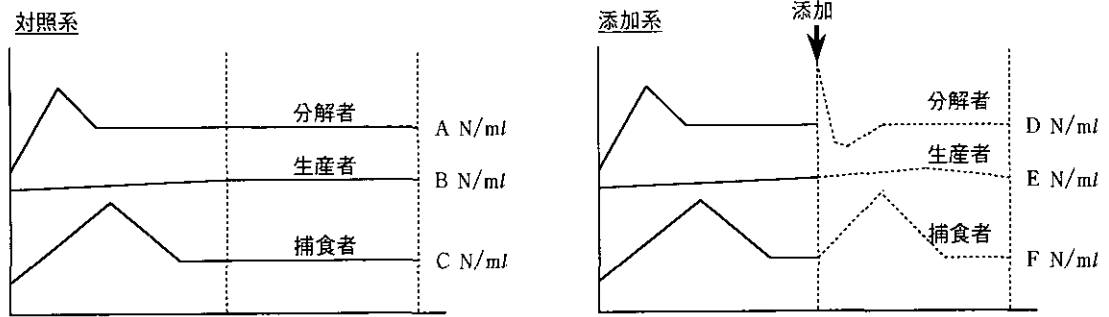


図51 ライシメータ土壌の各種微生物に及ぼす組換え体の影響
●；組換え体接種，○；非組換え体接種，
■；BHC分解菌接種，□；無接種



評価の基準 添加後、一定期間培養し、各構成微生物の個体数を対照系と比較する

$A = D$ $B = E$ ならば影響なし $C = F$	$A \neq D$ $B \neq E$ $C \neq F$ いずれか一つでも該当すれば 影響あり
---------------------------------------	--

図52 フラスコマイクロコズム試験における系の安定性評価試験の概念図

ムの個体群動態に着目すると①フラスコマイクロコズム生態系無影響濃度、②フラスコマイクロコズム生態系が影響を受けた後元通り系が回復する濃度、③フラスコマイクロコズム生態系で、変化する種があるが生産者・分解者・捕食者としては維持される濃度、④フラスコマイクロコズム生態系が崩壊する（生産者、分解者、捕食者のいずれか、あるいはすべてが変化する）濃度、の4つに分けられるものと考えられる。すなわちこのような高い再現性と安定性を示すフラスコマイクロコズムシステムを用いて、系の土着生物に及ぼす影響評価を行う必要があると考える。

フラスコマイクロコズムは長い年月に渡って継代培養を繰り返し、種の淘汰を経て現在の種構成となり、極めて安定であることが確認された生態系である。系の安定性については現在存在するシステムの中では最も信頼度の高いものであり、このシステムが崩壊するということは生態系での異常や悪影響が生じる可能性が非常に高いと判断して差し支えないものと考えられる。系の土着生物への影響試験で用いるフラスコマイクロコズム試験では添加開始後のマイクロコズムの構成微生物の個体数を計測し、その結果を解析して系の安定性に及ぼす影響に関する判断を行うこととした（図52）。

〔評価法〕

フラスコマイクロコズム培養開始後、所定の時期に遺伝子組換え微生物を接種し、所定の期間培養後、構成微生物の個体数を計測して、接種しない対照系と比較した上で評価する。対照系の比べて個体数が大きく異なれば、

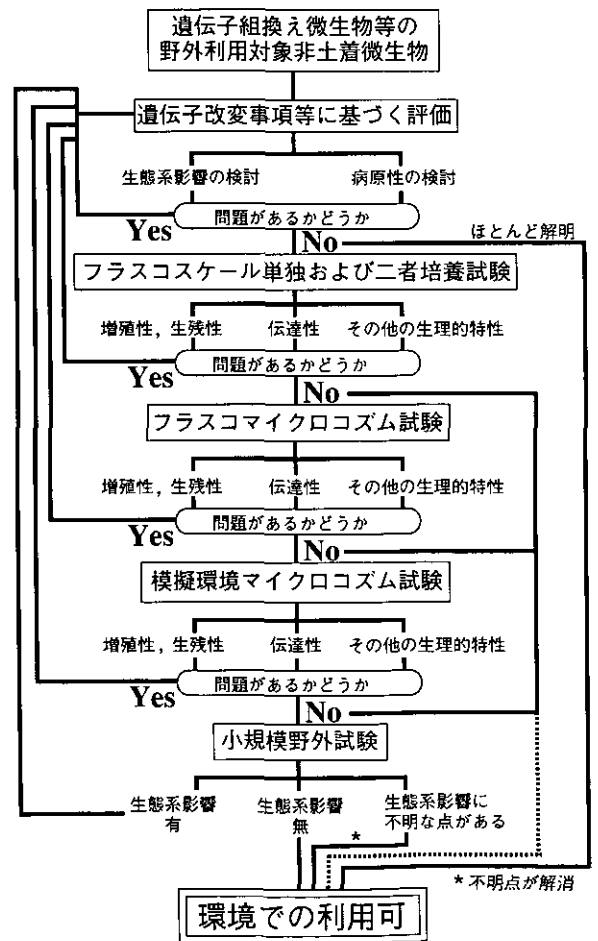


図53 遺伝子組換え微生物の全体の評価フロー

接種遺伝子組換え微生物では系の土着生物に影響を及ぼすと判断する。

(2) マイクロコズムを用いた遺伝子組換え生物の消長からの評価

遺伝子組換え微生物のマイクロコズムシステムを用いた生残性試験では、図53に示すような段階的影響評価が必要となってくると考えられる。

フロック非形成細菌をはじめ二者培養試験で微小動物の好適な食物源となり減少するタイプについては、フラスコマイクロコズム試験、模擬環境マイクロコズム試験においても同時に減少することが推定できる場合は野外試験散布可と判断する。また、フロック形成細菌をはじめ二者培養試験で捕食圧を受けにくく、生残性が高くなる危険性の高いタイプについては、フラスコマイクロコズム試験および模擬環境マイクロコズム試験で生物間相互作用等の影響を受けて減少することが確認される場合にのみ野外試験散布可と判断される。さらに、二者培養試験、フラスコマイクロコズム試験とも生残性が高いと判断される微生物に関しては、模擬環境マイクロコズム試験で最終的に評価し、生物間相互作用等の影響を受けて減少することが確認される場合にのみ野外試験散布可と判断する。このように、試験の簡便性を考えれば、まず第一段階の二者培養試験で評価すべきであり、本試験において、捕食されにくいという結果が得られれば、生残の可能性が高いと考えられるため、第二段階のフラスコマイクロコズム試験に進んで評価するものとし、さらにフラスコマイクロコズムにおいて生残性が高いことが確認されれば、第三段階の模擬環境マイクロコズム試験に進んで評価する。

生残性試験で用いるマイクロコズム試験では遺伝子組換え微生物自体の個体数密度を計測し、その消長に着目して判断を行うこととする。

[評価法]

二者培養試験: 遺伝子組換え微生物を食物源とした場合の微小動物の増殖に及ぼす影響については、増殖曲線から求めた微小動物の比増殖速度 (μ) および最大個体数密度 (N_{max}) の対照に対する相違の大小から評価する。得られたデータについては統計的処理を行い、遺伝子組換え微生物を食物源とした系と対照微生物を食物源とし

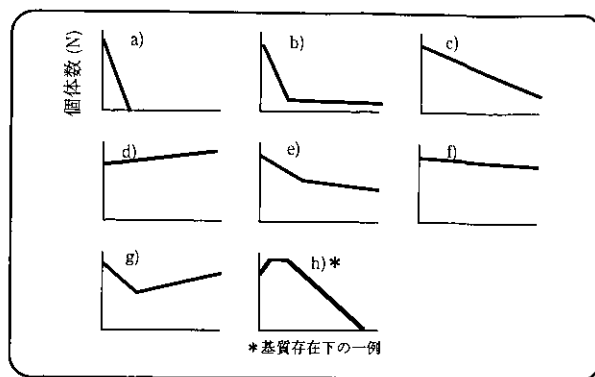


図54 マイクロコズム系内での遺伝子組換え細菌の消長パターンからの評価
外来微生物は閉鎖系から漏出した場合野外で分解対象基質が分解された後減少パターン(a), (b), (c), (e), (h))を示さず増殖パターン(d), (g))を示すタイプは問題有と評価

た系との有意差の有無を検定し判断する。

フラスコマイクロコズム試験: フラスコマイクロコズムシステムに培養開始後所定の時期に遺伝子組換え微生物を接種した後の消長をグラフ化し、供試微生物の消長パターンを解析して評価する(図54)。遺伝子組換え微生物接種後、異常増殖することが確認された場合には、水界微生物生態系に影響を及ぼす可能性があるとして判断する。

模擬環境マイクロコズム試験: フラスコマイクロコズム試験と同様に微生物農薬の生残性について評価し、模擬環境マイクロコズムに遺伝子組換え微生物接種後、異常増殖することが確認された場合には、水界微生物生態系に影響を及ぼす可能性があるとして判断する。

このように、フラスコマイクロコズムを活用した遺伝子組換え細菌の環境影響評価を行う上では、図55に示すように、土着生物への影響からの評価と遺伝子組換え微生物の消長からの評価が必要であり、この両者において問題がなければ、自然生態系に影響を及ぼす可能性は低いと判断される。それゆえ、二者培養試験、フラスコマイクロコズム試験、模擬環境マイクロコズム試験の結果をもとに確実に生態系影響がないと判断される場合は、小規模野外試験をスキップすることが可能と判断する必要がある。

以上に示したように、遺伝子組換え微生物の環境に及ぼす影響評価を行う上では、二者培養試験、フラスコマイクロコズム試験、模擬環境マイクロコズム試験を段階的に行うことが重要と考えられる。

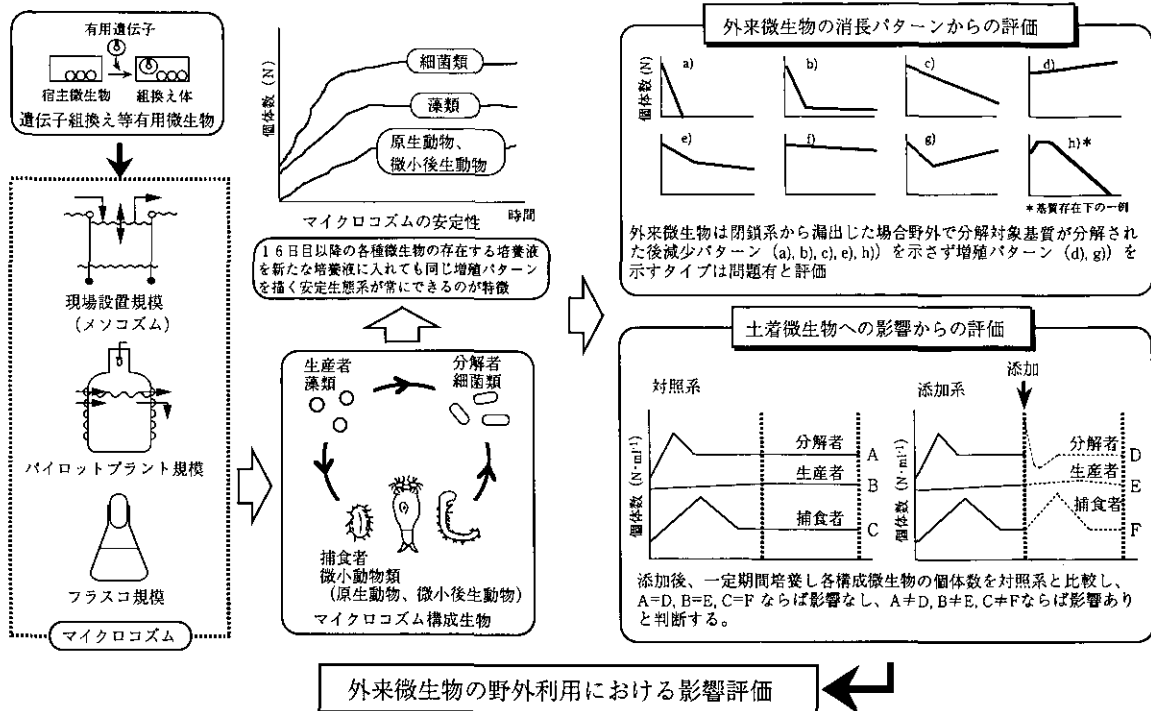


図55 マイクロコズムシステムの活用における環境影響評価フロー

[資料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

地域環境研究グループ

統括研究官	森田昌敏
上席研究官	中杉修身
新生生物評価研究チーム	近藤矩朗・佐治 光・中嶋信美・岩崎一弘
水環境改善国際共同研究チーム	稲森悠平・高木博夫・水落元之
湖沼保全研究チーム	松重一夫

水圏環境部

水環境質研究室	矢木修身・内山裕夫・富岡典子
水環境工学研究室	今井章雄
土壌環境研究室	向井 哲・服部浩之

生物圏環境部

環境植物研究室	大政謙次・名取俊樹・清水英幸
環境微生物研究室	渡邊 信・広木幹也
分子生物学研究室	久保明弘・青野光子

[B 客員研究員]

魚住 武司	(東京大学)	(平成3～7年度)
中原 忠篤	(筑波大学)	(平成3～4年度)
中村 以正	(筑波大学)	(平成3～6年度)
石塚 皓造	(筑波大学)	(平成3～7年度)
国府田悦夫	(筑波大学)	(平成3～7年度)
祥雲 弘文	(筑波大学)	(平成3～4年度)
日下部 功	(筑波大学)	(平成5～7年度)
田中 秀夫	(筑波大学)	(平成6～7年度)
神戸 敏明	(筑波大学)	(平成4～7年度)
大竹 久夫	(広島大学)	(平成4～7年度)
藤井 貴明	(千葉大学)	(平成6～7年度)
矢崎 仁也	(日本大学)	(平成3～7年度)
中嶋 睦安	(日本大学)	(平成4～7年度)
杉崎善治郎	(東京理科大学)	(平成3～7年度)
瀬戸 裕之	(東京理科大学)	(平成3～7年度)
石橋 良信	(東北学院大学)	(平成3, 6, 7年度)
川澄 俊之	(日本女子大学)	(平成7年度)
小沢 秀明	(長野県衛生公害研究所)	(平成5～6年度)

戎野 棟一	(東邦大学理学部)	(平成3年度)
遠藤 銀朗	(東北学院大学工学部)	(平成3年度)
川端善一郎	(愛媛大学農学部)	(平成3年度)
栗原 康	(奥羽大学歯学部)	(平成3年度)
青山 莞爾	(東邦大学理学部)	(平成3～7年度)
岡田 光正	(東邦大学理学部)	(平成3～7年度)
須藤 隆一	(東北大学工学部)	(平成3～7年度)
村上 和仁	(岡山県環境保健センター)	(平成6～7年度)
戸塚 績	(東京農工大学農学部)	(平成3～7年度)
伊豆田 猛	(東京農工大学農学部)	(平成3～7年度)
岩月善之助	(財服部植物研究所岡崎分室)	(平成3～7年度)
小野 莞爾	(熊本大学理学部)	(平成3～7年度)
小川 和雄	(埼玉公害センター)	(平成4～5年度)
鳥山 尚志	(東京大学農学部)	(平成2～4年度)
〃	(名古屋大学農学部)	(平成5～6年度)
和田 正三	(東京都立大学理学部)	(平成2～6年度)
手塚 修文	(名古屋大学農学部)	(平成2～5年度)
〃	(〃 情報文化部)	(平成6年度)
竹内 裕一	(北海道東海大学工学部)	(平成2～5年度)
竹葉 剛	(京都府立大学生活科学部)	(平成2～6年度)
田中 國介	(京都府立大学農学部)	(平成2～6年度)
鈴木 隆	(山形大学教育学部)	(平成2～6年度)
大森 正之	(東京大学海洋研究所)	(平成2, 3年度)
〃	(〃 教養学部)	(平成4～6年度)
平井 篤志	(名古屋大学農学部)	(平成2, 3年度)
〃	(東京大学農学部)	(平成4～6年度)
渡辺 昭	(名古屋大学農学部)	(平成2～5年度)
〃	(東京大学理学部)	(平成6年度)
長田 敏行	(東京大学理学部)	(平成2～6年度)
庄野 邦彦	(東京大学教養学部)	(平成2～6年度)
米田 好文	(東京大学遺伝子実験施設)	(平成2～5年度)
後藤 潔	(聖徳大学短期大学部)	(平成4～6年度)
井上 康則	(東京理科大学理工学部)	(平成4, 5年度)
酒井 慎吾	(筑波大学生物科学系)	(平成5, 6年度)
森川 弘道	(広島大学理学部)	(平成4年度)

2 研究課題と担当者（*客員研究員）

（1）環境保全のための遺伝子の探索と活用に関する研究

近藤矩朗・佐治 光・中嶋信美・大政謙次・名取俊樹・清水英幸・渡邊 信・
広木幹也・久保明弘・青野光子・矢木修身・岩崎一弘・内山裕夫・戸塚 績*・
伊豆田猛*・岩月善之助*・小野莞爾*・小川和雄*・鳥山尚志*・和田正三*・手塚修文*・
竹内裕一*・竹葉 剛*・田中國介*・鈴木 隆*・大森正之*・平井篤志*・渡辺 昭*・
長田敏行*・庄野邦彦*・米田好文*・後藤 潔*・井上康則*・酒井慎吾*・森川弘道*

（2）環境中における組換え微生物の挙動に及ぼす環境因子の影響に関する研究

矢木修身・岩崎一弘・内山裕夫・富岡典子・向井 哲・服部浩之・魚住武司*・
中原忠篤*・中村以正*・石塚皓造*・国府田悦夫*・祥雲弘文*・日下部功*・田中秀夫*・
神戸敏明*・大竹久夫*・藤井貴明*・矢崎仁也*・中嶋陸安*・杉崎善治郎*・瀬戸裕之・
石橋良信*・川澄俊之*・小沢秀明*

（3）遺伝子組換え生物の生態系への影響に関する研究

稲森悠平・高木博夫・水落元之・松重一夫・今井章雄・矢木修身・岩崎一弘・内山裕夫・
富岡典子・向井 哲・服部浩之・戎野棟一*・遠藤銀朗*・川端善一郎*・栗原 康*・
青山莞爾*・岡田光正*・須藤隆一*・村上和仁*

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者	題目	掲載誌	巻(号)	ページ	刊年
M.Aono, A.Kubo, H.Saji, T.Natori, K.Tanaka, N.Kondo	Resistance to active oxygen toxicity of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> that expresses the gene for glutathione reductase from <i>Escherichia coli</i>	Plant & Cell Physiol.	32	691-697	1991
K.Kasamo, H.Yamanishi, F.Kagita, H.Saji	Reconstitution of tonoplast H ⁺ -ATPase from mung bean (<i>Vigna radiata</i> L.) hypocotyls in liposomes	Plant & Cell Physiol.	32	643-651	1991
A.Kubo, N. Kondo	Differences in the probability of cloning specific DNA between primary and amplified libraries: theoretical considerations	Genet. Anal. Tech. Appl.	8	238-239	1991
K.Tanaka, E.Takeuchi, A.Kubo, T.Sakaki, K.Haraguchi, Y.Kawamura	Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves	Arch. Biochem. Biophys.	286	371-375	1991
A.Kubo, H.Saji, K.Tanaka, K.Tanaka, N.Kondo	Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from <i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant Mol. Biol.	18	691-701	1992
近藤矩朗, 佐治 光	植物の大気汚染耐性	大気汚染学会誌	27	273-288	1992
M.Aono, A.Kubo, H.Saji, K.Tanaka, N.Kondo	Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> with high chloroplastic glutathione reductase activity	Plant & Cell Physiol.	34	129-135	1993
大政謙次, 近藤矩朗	成層圏のオゾン層破壊とその影響	照明学会誌	87	146-149	1993
A.Kubo, H.Saji, K.Tanaka, N.Kondo	Genomic DNA structure of a gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase from <i>Arabidopsis thaliana</i>	FEBS Lett.	315	313-317	1993
A.Kubo, T.Sano, H.Saji, K.Tanaka, N.Kondo, K.Tanaka	Primary structure and properties of glutathione reductase from <i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant & Cell Physiol.	34	1259-1266	1993
佐治 光, 青野光子, 海老沼宏安, 松永悦子	大気汚染耐性植物の開発	植物細胞工学	5	291-297	1993

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
T.Nakamura, H.Saji, N.Kondo, T.Ikawa	Preparation of monoclonal antibodies against NADH: nitrate reductase from the red alga <i>Porphyra yezoensis</i>	Plant & Cell Physiol.	35	1185-1198	1994
田中 浄, 青野光子, 久保明弘	地球環境変化と活性酸素	細胞	26	420-424	1994
M.Aono, H.Saji, K.Fujiyama, M.Sugita, N.Kondo, K.Tanaka	Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic <i>Nicotiana tabacum</i>	Plant Physiol.	107	645-648	1995
M.Aono, H.Saji, A.Sakamoto, K.Tanaka, N.Kondo, K.Tanaka	Paraquat tolerance of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase	Plant Cell Physiol.	36	1687-1691	1995
A.Kubo, H.Saji, K.Tanaka, N.Kondo	Expression of Arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide	Plant Mol.Biol.	29	479-489	1995
T.Kuwabara, M.Takeuchi, S.Honda, N.Nakajima, A.Watanabe, N.Kondo	Expression in <i>Escherichia coli</i> of the extrinsic 18-kDa protein of photosystem of spinach	Plant & Cell Physiol	36	435-439	1995
N.Nakajima, H.Saji, M.Aono, N.Kondo	Isolation of cDNA for a plasma membrane H ⁺ -ATPase from guard cells of <i>Vicia faba</i> L.	Plant & Cell Physiol.	36	919-924	1995
裴 公英, 近藤矩朗, 中島信美, 石塚皓造	SO ₂ による植物のエチレン生成と障害との関係	大気環境学会誌	30	367-373	1995
G.Y.Bae, N.Nakajima, K.Ishizuka, N.Kondo	The role in ozone phytotoxicity of the evolution of ethylene upon induction of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by ozone fumigation in tomato plants	Plant & Cell Physiol.	37	129-134	1996
Y.Takeuchi, M.Murakami, N.Nakajima, N.Kondo, O.Nikaido	Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B	Plant & Cell Physiol.	37	181-187	1996
C.J.Jiang, N.Nakajima, N.Kondo	Disruption of microtubules by abscisic acid in guard cells of <i>Vicia faba</i> L.	Plant & Cell Physiol.	37	697-701	1996

発表者	題目	掲載誌	巻(号)	ページ	刊年
H.Saji, M.Aono, A.Kubo, K.Tanaka, N.Kondo	Paraquat sensitivity of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> plants that overproduce a cytosolic ascorbate peroxidase	Environ. Sci.	9	241-148	1996
K.Tanaka, M.Aono, H.Saji, A.Kubo	Stress tolerance of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase	Biochemical Society Transactions	24	200S	1996
佐治 光, 中嶋信美, 久保明弘, 青野光子	環境ストレスに対する植物の反応	日本農薬学会誌	21	347-351	1996
G.Y.Bae, K.Ishizuka, N.Nakajima, N.Kondo	Isolation of cDNAs encoding ACC oxidase expressed in the ozone-fumigated tomato leaves	Environ. Sci. (in press)			
T.Nakajima, H.Uchiyama, O.Yagi, T.Nakahara	Novel metabolite of trichloroethylene in a methanotrophic bacterium, <i>Methylocystis</i> sp. M, and hypothetical degradation pathway.	Biosci. Biotech. Biochem.	56(3)	486-489	1992
T.Nakajima, H.Uchiyama, O.Yagi, T.Nakahara	Purification and properties of a soluble methane monooxygenase from <i>Methylocystis</i> sp. M.	Biosci. Biotech. Biochem.	56(5)	736-470	1992
矢木修身, 岩崎一弘, 内山裕夫	組換え微生物の水および土壌マイクロコスムにおける挙動	微生物の生態 (学会出版セ, 151p.)	18	79-95	1992
矢木修身	地下水汚染の浄化に微生物を活用する	グローバルネット	(25)	30-31	1992
矢木修身, 内山裕夫, 岩崎一弘	マーカー遺伝子を有する細菌の環境中での挙動と生態系への影響評価	文部省「人間環境系」重点領域研究報告集	G072-N10	207-208	1993
矢木修身	環境浄化へ微生物を利用する—有害物質分解・除去への応用—	SUT Bull.	10(1)	21-25	1993
矢木修身	先端技術産業と環境汚染—特にバイオテクノロジー産業について—	公衆衛生研究	41(3)	335-340	1993
K.Iwasaki, H.Uchiyama, O.Yagi	Survival and impact of genetically engineered <i>Pseudomonas putida</i> harboring mercury resistance gene in aquatic microcosms.	Biosci. Biotech. Biochem.	57	1264-1269	1993
K.Iwasaki, H.Uchiyama, O.Yagi	Survival and impact of genetically engineered <i>Pseudomonas putida</i> harboring mercury resistance gene in soil microcosms.	Biosci. Biotech. Biochem.	58(1)	156-159	1994

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
K.Iwasaki, H.Uchiyama O.Yagi, T.Kurabayashi, K.Ishizuka, Y.Takamura	Transformation of <i>Pseudomonas putida</i> by electroporation.	Biosci. Biotech. Biochem.	58	851-854	1994
矢木修身	組換え微生物等の活用と法制度	水処理バイオ入門 (産業用水調査会, 227p.)		199-203	1994
矢木修身	組換え微生物等の野外利用と評価のあり方	水処理バイオ入門 (産業用水調査会, 227p.)		203-212	1994
矢木修身	組換え微生物等の土壌マイクロコズムを用いた環境影響	水処理バイオ入門 (産業用水調査会, 227p.)		213-217	1994
Y.Inamori, K.Murakami, R.Sudo, Y.Kurihara, N.Tanaka	Environmental assessment method for field release of genetically engineered microorganisms using microcosm systems	Water Sci. & Technol.	26	2161-2164	1992
K.Murakami, Y.Inamori, R.Sudo, Y.Kurihara	Effect of temperature on prosperity and decay of genetically engineered microorganisms in a microcosm system	Water Sci. & Technol.	26	2165-2168	1992
村上和仁, 稲森悠平, 林 紀男, 須藤隆一	微小動物の増殖に及ぼす微生物農薬の影響	日本水処理生物学会誌	29(1)	31-38	1993
稲森悠平, 村上和仁, 角田美奈子, 佐藤瑠佳, 栗原 康	遺伝子組換え細菌と親株細菌の相互作用に関する研究	日本水処理生物学会誌	29(1)	39-49	
田中伸幸, 稲森悠平, 川端善一郎, 森 忠洋, 板山朋聡, 須藤隆一	マイクロコズムにおける代謝産物を考慮した微生物間相互作用のシミュレーション解析	水環境学会誌	18	109-120	1995
稲森悠平, 高松良江	マイクロコズムにおける物質循環とその毒性および生態系影響評価試験における有効性	水環境学会誌	18	612-617	1995
田中伸幸, 稲森悠平, 川端善一郎, 森 忠洋, 板山朋聡, 須藤隆一	マイクロコズムにおける組換え細菌の消長に関するシミュレーション解析	日本水処理生物学会誌	31(1)	31-41	1995

2 口頭発表

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	大腸菌グルタチオンレダクターゼを葉緑体中に持つトランスジェニックタバコの活性酸素ストレス耐性	日本植物学会第56回大会	八王子	3. 9
久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	シロイヌナズナ・アスコルビン酸ペルオキシダーゼ cDNA の塩基配列	日本植物学会第56回大会	八王子	3. 9
青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	植物の大気汚染ガス耐性におけるグルタチオンレダクターゼの役割—遺伝子工学的アプローチ—	第32回大気汚染学会	北九州	3.10
藤沼康実, 清水英幸, 近藤矩朗	遺伝子組換え植物を用いる野外の大気環境評価のための実験装置の開発	第32回大気汚染学会	北九州	3.11
M. Aono	Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic tobacco plant with high glutathione reductase activity	French Japanese Workshop on Plant Physiology and Molecular Biology	France	3.11
久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	シロイヌナズナ・サイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子のクローニングと構造解析	第15回日本分子生物学会年会	京 都	4.12
近藤矩朗, 清水英幸	紫外線増加による植物の成長阻害とその作用スペクトル	第33回大気汚染学会	大 阪	4.12
佐治 光, 久保明弘, 田中 浄, 近藤矩朗	オゾンによる植物のサイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの増加	第33回大気汚染学会	大 阪	4.12
佐治 光, 久保明弘, 田中 浄, 近藤矩朗	オゾンと接触したシロイヌナズナの葉におけるサイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの増加	日本植物生理学会1993年度年会	金 沢	5. 3
田中 浄, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 近藤矩朗	活性酸素解毒系酵素を強化した形質転換植物の開発	日本植物生理学会1993年度年会	金 沢	5. 3
A. Kubo, T. Sano, H. Saji, K. Tanaka, N. Kondo, K. Tanaka	Cloning and characterization of cDNA encoding glutathione reductase from <i>Arabidopsis thaliana</i>	15th Int. Bot. Congr.	Yokohama	5. 9
K. Tanaka, M. Aono, A. Kubo	Tolerance of glutathione reductase-enriched transgenic plants to photooxidative stress	15th Int. Bot. Congr.	Yokohama	5. 9

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
H.Saji, M.Aono, A.Kubo, K.Tanaka, N.Kondo	Roles of enzymes that scavenge active oxygen species in stress resistance of plants	Int. Workshop between Japan and France on differentiation and development of higher plants	Tsukuba	5. 9
K.Tanaka, M.Aono, A.Kubo, T.Sakaki, K.Shimazaki	Effects of air pollution on photo and carbon-assimilatory systems	U.S. Jpn. Binational Semin.	Hawaii	6. 3
田中 浄,五十嵐隆夫, 李 増周, 別府敏夫, 青野光子, 久保明弘	活性酸素ストレスによるグルタチオン還元酵素の遺伝子発現	日本植物生理学会1994年度年会	つくば	6. 3
森本剛史, 奥村剛一, 坂本 敦, 増村威宏, 久保明弘, 田中 浄, 田中國介	活性酸素代謝系酵素を導入したストレス耐性タバコの作出	日本農芸化学会1994年度大会	東京	6. 4
青野光子, 佐治 光, 杉田 護, 近藤矩朗, 田中 浄	グルタチオンレダクターゼアンチセンスDNAのタバコへの導入	日本植物学会第58回大会	札幌	6. 9
久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	大気汚染ガス(O ₃ ,SO ₂)によるシロイヌナズナのサイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子の誘導	日本植物学会第58回大会	札幌	6. 9
佐治 光, 青野光子, 久保明弘, 杉田 護, 田中 浄, 近藤矩朗	シロイヌナズナ由来サイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子のタバコへの導入	日本植物学会第58回大会	札幌	6. 9
中嶋信美, 佐治 光, 近藤矩朗	ソラマメ孔辺細胞で発現している細胞膜局在性H ⁺ -ATPaseのクローニング	日本植物学会第58回大会	札幌	6. 9
中嶋信美, 清水英幸, 二階堂修, 近藤矩朗	UV-Bによるキュウリ緑葉の遺伝子損傷	日本植物学会第58回大会	札幌	6. 9
青野光子, 佐治 光, 近藤矩朗	グルタチオンレダクターゼ活性が低い遺伝子組換えタバコの環境ストレス耐性	第35回大気汚染学会	盛岡	6.11
佐治 光, 青野光子, 久保明弘, 近藤矩朗	サイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の高い遺伝子組換えタバコのオゾン耐性	第35回大気汚染学会	盛岡	6.11
中嶋信美, 近藤矩朗, 高橋真哉, 清水英幸	紫外線によって引き起こされる植物の遺伝子損傷のELISA法による検出	第35回大気汚染学会	盛岡	6.11
村瀬憲昭, 伊豆田猛, 戸塚 績, 清水英幸, 近藤矩朗	キュウリの第一葉に及ぼすUV-B照射の影響	第35回大気汚染学会	盛岡	6.11

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
青野光子, 佐治 光, 田中國介, 近藤矩朗, 田中 淨	2種類の活性酸素消去系酵素遺伝子を導入したタバコのバラコート耐性	日本植物生理学会1995年度年会	松 江	7. 3
佐治 光, 青野光子, 久保明弘, 田中 淨, 近藤矩朗	サイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼのアンチセンスDNAを導入したタバコのバラコート感受性	日本植物生理学会1995年度年会	松 江	7. 3
上中弘典, 森本剛史, 森田重人, 坂本 敦, 増村威宏, 久保明弘, 田中 淨, 田中國介	活性酸素消去系酵素を導入した形質転換植物の作出と解析	日本農芸化学会1995年度大会	札 幌	7. 8
浅井尚子, 姜 昌杰, 中山享子, 中嶋信美, 近藤矩朗	孔辺細胞の微小管分布の日周変化	日本植物学会第59回大会	金 沢	7. 9
中嶋信美, 佐治 光, 近藤矩朗	細胞膜局在性H ⁺ -ATPaseの孔辺細胞での発現	日本植物学会第59回大会	金 沢	7. 9
中山享子, 浅井尚子, 中嶋信美, 近藤矩朗	ソラマメの気孔開度に及ぼす炭酸イオンの影響について	日本植物学会第59回大会	金 沢	7. 9
増田哲也, 相澤幸子, 中嶋信美, 近藤矩朗, 桑原朋彦	チラコイド膜結合ジチオスレイトール感受性プロテアーゼとポリフェノールオキシダーゼの同一性	日本植物学会第59回大会	金 沢	7. 9
青野光子, 佐治 光, 近藤矩朗, 遠藤さおり, 松永悦子	グルタチオンレダクターゼ遺伝子を導入した樹木の環境ストレス耐性	第36回大気環境学会年会	東 京	7.11
安藤真理子, 青野光子, 中嶋信美, 佐治 光, 戸塚 績, 近藤矩朗	植物の環境ストレス耐性におけるグルタチオンレダクターゼの役割の検討	第36回大気環境学会年会	東 京	7.11
久保明弘, 佐治 光, 近藤矩朗	シロイヌナズナの活性酸素消去系酵素に対するO ₃ , SO ₂ , UV-Bの影響	第36回大気環境学会年会	東 京	7.11
高橋真哉, 中嶋信美, 近藤矩朗	紫外線増加が植物のDNAに及ぼす影響に関する研究	第36回大気環境学会年会	東 京	7.11
村瀬憲昭, 清水英幸, 近藤矩朗, 伊豆田猛, 青木正敏, 戸塚 績	キュウリの第一葉の生長と生理活性に及ぼすUV-B照射の影響-肥料添加の影響-	第36回大気環境学会年会	東 京	7.11
青野光子, 佐治 光, 近藤矩朗, 田中 淨	光酸素ストレス耐性機構におけるグルタチオンレダクターゼの役割	日本植物生理学会1996年度年会	鹿児島	8. 3
青野光子, 佐治 光, 名取俊樹, 田中國介, 田中 淨	活性酸素消去系酵素形質転換植物の光合成によるストレス耐性評価	日本植物生理学会1996年度年会	鹿児島	8. 3

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
森田重人, 鈴木 徹, 上中弘典, 坂本 敦, 増村威宏, 久保明弘, 田中 浄, 田中國介	活性酸素消去系酵素を導入した形質転換植物の作出とその解析	日本植物生理学会1996年度年会	鹿児島	8. 3
和田野晃, 森田匡一 藤井泰志, 平知 明, 西浦芳史, 穂波信雄, 青野光子, 田中 浄	形質転換によるトマトの接ぎ木育苗法の改良	日本農芸化学会1996年度大会	京 都	8. 3
M. Aono, H. Saji, N. Kondo, K. Tanaka	Tolerance to photooxidative stress of transgenic tobacco plants with altered activity of glutathione reductase	3rd Workshop sulfur metabolism in higher plants	UK	8. 4
M. Aono, H. Saji, N. Kondo, K. Tanaka	Paraquat tolerance of transgenic tobacco plants with altered activity of glutathione reductase	2nd International Conference "Oxygen, free radicals and environmental stress in plants"	Vienna	8. 9
H. Saji, M. Aono, A. Kubo, K. Tanaka, N. Kondo	Paraquat sensitivity of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> plants that overproduce a cytosolic ascorbate peroxidase	2nd International Conference "Oxygen, free radicals and environmental stress in plants"	Vienna	8. 9
中嶋信美, 裴 公英, 佐治 光, 青野光子, 久保明弘, 近藤矩朗	エチレン生合成経路の酵素の大気汚染物質による誘導	日本植物学会第60回大会	福 岡	8.10
久保明弘, 青野光子, 中嶋信美, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	シロイヌナズナの活性酸素消去系酵素の環境ストレスによる誘導	日本植物学会第60回大会	福 岡	8.10
寺島一郎, 野口 航, 朴 龍睦, 久保明弘, 田中 浄	光・低温処理がキュウリの葉の活性酸素消去系におよぼす影響	日本植物学会第60回大会	福 岡	8.10
岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 佐藤文昭, 石橋良信	土壌ライシメータにおける組換え微生物の挙動	日本農芸化学会1991年度大会	京 都	3. 4
岩崎一弘, 富岡典子, 矢木修身, 内山裕夫, 向井 哲, 服部浩之, 佐藤文昭, 石橋良信	土壌生態系に及ぼす組換え微生物の影響	日本農芸化学会1991年度大会	京 都	3. 4
岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 倉林輝世, 高村義親	電気パルス法による各種 <i>Pseudomonas</i> 属への水銀耐性遺伝子の導入	日本農芸化学会1992年度大会	東 京	4. 4

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 関 憲彦, 石橋良信, 魚住武司	水銀耐性遺伝子を導入した各種組換え微生物の諸性質及び土壌中における挙動	日本農芸化学会1992年度 大会	東 京	4. 4
岩崎一弘, 内山裕夫, 矢木修身, 石橋良信	水銀耐性遺伝子を導入した組換え微生物の 土壌マイクロコズムにおける挙動	1992年環境科学シンポジ ウム	東 京	4.12
O.Yagi, K.Iwasaki, H.Uchiyama	Survival and impact of genetically engineered microorganisms transformed with mercury resistance gene in the water and soil environment.	The OECD Workshop Methods Monit. Org.in the Environ.	Otawa	4. 9
O.Yagi, K.Iwasaki, H.Uchiyama	Survival and impact of genetically engineered Pseudomonas putide har thods Monit. Org.in boring mercury resistance gene in aquatic microcosms.	The OECD Workshop Methods Monit. Org.in the Environ.	Otawa	4. 9
服部浩之, 向井 哲	添加微生物の土壌中での生残性にかかわる 要因	第 8 回日本微生物生態学 会	東 京	4.11
岩崎一弘, 庄司麻子, 矢木修身, 内山裕夫, 石塚皓造, 諏佐貴史	水銀耐性遺伝子を導入した組換え微生物の 水系マイクロコズムにおける挙動	日本農芸化学会1993年度 大会	仙 台	5. 4
岩崎一弘, 倉林輝世, 矢木修身, 内山裕夫, 石塚皓造	mer オペロンをタンデム化した水銀耐性菌 の解析	日本農芸化学会1993年度 大会	仙 台	5. 4
岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 向井 哲, 服部浩之, 庄司麻子, 石塚皓造, 魚住武司	水銀耐性遺伝子を導入した組換え微生物の 水田マイクロコズムにおける挙動	日本農芸化学会1993年度 大会	仙 台	5. 4
T.Uozumi, T.Shigematsu, A.Inoue, M.Hidaka, Y-M.Kim, H.Masaki, T.Beppu, K.Iwasaki, H.Uchiyama, S.Mukai, H.Hattori, O.Yagi	Analysis and improvement of nitrogen fixationgenes of Klebsiella and Azospirillum and safety assessment of recombinant strains in the rhizosphere of rice.	Indo-Ger. Conf. Impact Modern Agric. Environ.	Hissal	5.12
服部浩之, 向井 哲, 岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 魚住武司	組換え微生物の生残性にかかわる土壌の要 因	日本土壌肥料学会1993年 度会	那 覇	5. 4
服部浩之, 向井 哲, 岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 魚住武司	組換え微生物の生残性に及ぼす土壌水分の 影響	第 9 回日本微生物生態学 会	東広島	5.11

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
岩崎一弘, 館野浩一, 庄司麻子, 矢木修身, 内山裕夫, 中嶋睦安, 石塚皓造	水環境中における組換え微生物の遺伝子の挙動	日本農芸化学会1994年度大会	東 京	6. 4
岩崎一弘, 村元正子, 矢木修身, 内山裕夫, 国府田悦男	土壌中からの微生物 DNA の回収率に及ぼす土壌の諸性質の影響	平成 6 年度日本生物工学会大会	神 戸	6.11
矢木修身, 内山裕夫, 岩崎一弘, 中村邦彦, 倉林輝世	微生物を活用する水銀汚染土壌の浄化技術の開発	環境科学会1994年会	つくば	6.11
岩崎一弘, 内山裕夫, 矢木修身	環境中からの微生物の検出およびその遺伝子の挙動	日本微生物生態学会第10回大会	大 阪	6. 4
矢木修身, 内山裕夫, 岩崎一弘, 中村邦彦, 倉林輝世	微生物を活用する水銀汚染土壌の浄化技術の開発	環境科学会1994年会	つくば	6.11
倉林輝世, 岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫, 宮本志佐, 中嶋睦安, 田中秀夫	水銀耐能に及ぼすmer オパロンの遺伝子増幅の影響	日本農芸化学会1995年度大会	札 幌	7. 8
岩崎一弘, 館野浩一, 矢木修身, 内山裕夫, 石塚皓造	水環境中における組換え微生物の遺伝子の挙動	日本農芸化学会1995年度大会	札 幌	7. 8
岩崎一弘, 高橋 研, 矢木修身, 内山裕夫, 田中秀夫	組換え微生物による水銀化合物の除去	日本農芸化学会1995年度大会	札 幌	7. 8
岩崎一弘, 高橋 研, 矢木修身, 内山裕夫, 田中秀夫	組換え微生物による水中からの塩化第二水銀の除去	平成 7 年度日本生物工学会大会	福 岡	7.10
矢木修身, 岩崎一弘, 内山裕夫, 富岡典子, 向井 哲, 服部浩之	土壌環境中における浄化微生物の挙動と影響	第11回日本微生物生態学会	福 岡	7.11
稲森悠平, 村上和仁, 赤松俊昌, 林 隆之, 須藤隆一, 栗原 康	マイクロコズムの安定性に及ぼす種構成と培養条件の影響	日本水処理生物学会第28回大会	神 戸	3.11
稲森悠平, 村上和仁, 林 隆之, 須藤隆一, 栗原 康	マイクロコズムの振とう・静置下での組換え細菌と構成生物の消長	日本水環境学会第26回大会	東 京	4. 3
田中伸幸, 森 忠洋, 稲森悠平, 須藤隆一	マイクロコズムを構成する微生物間相互作用に及ぼす代謝産物の影響	日本水環境学会第26回大会	東 京	4. 3

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
稲森悠平, 須藤隆一 村上和仁, 赤松俊昌	マイクロコズムにおける種構成と系の安定性	日本水環境学会第26回大会	東 京	4. 3
村上和仁, 岡田光正, 稲森悠平, 須藤隆一, 栗原 康	マイクロコズムにおける微生物農薬 BT 菌の生残と温度との関係	日本水処理生物学会第29回大会	仙 台	4.11
稲森悠平, 須藤隆一, 村上和仁, 角田美奈子, 佐藤瑠佳, 青山莞爾, 栗原 康	遺伝子組換え細菌と新株細菌の相互作用に及ぼす各種要因の影響	日本水処理生物学会第29回大会	仙 台	4.11
田中伸幸, 稲森悠平, 須藤隆一, 森 忠洋, 川端善一郎	マイクロコズムにおける添加組換え微生物の生残に及ぼす代謝産物の影響	日本水処理生物学会第29回大会	仙 台	4.11
田中伸幸, 森 忠洋, 稲森悠平, 須藤隆一, 川端善一郎	外来細菌の生残性および被食圧とマイクロコズム構成微生物の代謝産物との関係	日本水環境学会第27回年会	静 岡	5. 3
村上和仁, 須藤隆一, 稲森悠平, 栗原 康	自然環境水を用いた模擬環境マイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の挙動	日本水環境学会第27回年会	静 岡	5. 3
稲森悠平, 村上和仁, 角田美奈子, 佐藤瑠佳, 須藤隆一, 栗原 康	マイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌と親株細菌の動態解析	日本水環境学会第27回年会	静 岡	5. 3
村上和仁, 稲森悠平, 須藤隆一, 栗原 康	遺伝子組換え細菌の共存するマイクロコズムの継代培養における挙動解析	日本水処理生物学会第30回大会	高 岡	5.10
稲森悠平, 田中伸幸, 佐藤瑠佳, 村上和仁	遺伝子組換え細菌および親株細菌とマイクロコズム構成生物との相互作用	日本水処理生物学会第30回大会	高 岡	5.10
田中伸幸, 稲森悠平, 森 忠洋	マイクロコズムの単純化と三種系モデルシステムにおける外来細菌の消長	日本水処理生物学会第30回大会	高 岡	5.10
稲森悠平, 佐藤瑠佳, 村上和仁, 田中伸幸, 須藤隆一, 栗原 康	長期継代培養における遺伝子組換え細菌と親株細菌と微小動物間相互作用の挙動解析	第28回日本水環境学会年会	宇都宮	6. 3
田中伸幸, 森 忠洋, 稲森悠平, 川端善一郎	マイクロコズムにおける非土着細菌の動態に関する数理的解析	第28回日本水環境学会年会	宇都宮	6. 3
村上和仁, 岡田光正, 須藤隆一, 稲森悠平, 栗原 康	水圏微生物生態系モデルシステムにおける微生物農薬 BT 菌の挙動解析	第28回日本水環境学会年会	宇都宮	6. 3
K. Murakami, Y. Inamori, M. Okada, R. Sudo, Y. Kurihara	Prosperity and decay of microbial pesticide, <i>Bacillus thuringiensis</i> in aquatic model ecosystems for environmental assessment method	IAWQ, Water, Qual. Int. 1994	Budapest	6. 7

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
Y. Inamori, N. Tanaka, K. Murakami, T. Akamatsu, Y. Kurihara	Effect of species composition on stability and reproductivity of small-scale microcosm system	IWAQ, Water, Qual. Int. 1994	Budapest	6. 7'
稲森悠平, 佐藤瑠佳, 村上和仁, 須藤隆一, 栗原 康	遺伝子組換え細菌と親株細菌の単独, 共存下における増殖能と微小動物による捕食特性	日本水処理生物学会第31回大会	横 浜	6.10
田中伸幸, 稲森悠平, 川端善一郎, 森 忠洋, 須藤隆一	マイクロコズムにおける土着及び非土着微生物の挙動に関する数理解析	日本水処理生物学会第31回大会	横 浜	6.10
稲森悠平, 佐藤瑠佳, 村上和仁, 須藤隆一, 栗原 康	マイクロコズムにおける遺伝子組換え細菌の消長と微小動物との相互作用	第29回日本水環境学会年会	広 島	7. 3
田中伸幸, 稲森悠平, 川端善一郎, 森 忠洋, 須藤隆一	マイクロコズムにおける各種組換え細菌の生残性に関する数理解析	第29回日本水環境学会年会	広 島	7. 3
田中伸幸, 稲森悠平, 川端善一郎, 須藤隆一	マイクロコズム構成微生物の安定性に関する数理解析	日本水処理生物学会第32回大会	大 阪	7.11
稲森悠平, 西前浩直, 戎野棟一, 高松良江, 須藤隆一	水圏微生物生態系モデルマイクロコズムシステムのスケールアップ下における安定性	日本水処理生物学会第32回大会	大 阪	7.11
稲森悠平, 村上和仁, 田中伸幸, 小室幸子, 須藤隆一	マイクロコズムにおける微生物農薬系状菌類の消長と微小動物との相互作用	日本水処理生物学会第32回大会	大 阪	7.11
稲森悠平, 西前浩直, 高松良江, 須藤隆一	水圏微生物モデルマイクロコズムシステムのスケールアップと安定性	第30回日本水環境学会年会	福 岡	8. 3
稲森悠平, 田中伸幸, 村上和仁, 須藤隆一	モデルエコシステムを用いた微生物農薬の挙動解析と生態系影響評価	第30回日本水環境学会年会	福 岡	8. 3
稲森悠平, 高松良江, 須藤隆一	生態系影響評価の方法	第30回日本水環境学会年会	福 岡	8. 3

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR-21-'97

平成9年3月31日発行

編集 国立環境研究所 編集委員会

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305 茨城県つくば市小野川16番2

電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

印刷 アサヒビジネス株式会社

〒305 茨城県つくば市竹園2-11-6

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan

March 1997

本報告書は再生紙を使用しています。