

5. シュードモナス属細菌内RSF1010系プラスミドの安定性

農業環境技術研究所 環境生物部 微生物管理科

要 約

将来の組換え微生物の利用のための基礎資料を得るために、*Pseudomonas syringae* を宿主としたRSF1010系プラスミドを用いて、培地上及び土壌中等各種条件下での安定性の程度を検討したところ、その安定性は培養条件や温度等で著しく異なることが明らかになった。

背景・目的

組換え微生物を利用するに当たり、事前にその安全性及び実用性を評価する必要がある。国内外でこれに関する研究が進んでいる。ここでは、組換え遺伝子がプラスミドに挿入されて利用される場合を想定し、安全性と実用性に深く係わる環境要因とプラスミド安定性との関係をシュードモナス属細菌を用いて明らかにする。

内容及び特徴

- (1) RSF1010をベクターにしてpCOR1の断片を挿入した複合プラスミドpNIA1, pNTA2を構築し、それを*Pseudomonas syringae* pv. *mori* Ni27株に導入し、以下の試験に供した
- (2) Ni27株におけるpNIA1プラスミドの安定性は、培養する培地の種類、培養方法（斜面、液体）、温度（5℃、25℃）に大きく左右された。たとえば、2種液体培地で10代以上連続継代しても全く脱落しなかったが、継代せず5℃で静置培養すると、次第に脱落株が蓄積して、約100日後に74%に達した。また、PPGA斜面培地では温度による影響が顕著で、66日間保存の5℃区で1.8%であるのに対し、室温区（20-25℃）では約50%であった。PPGA液体培地では、それが逆の傾向であった。
- (3) 試験管内殺菌土壌中においてNi27株内のpNIA1, pNIA2, RSF1010は25℃で一部、5℃ですべての区で脱落が認められた。たとえば、5℃、41日保存区でpNIA1は10.7%の頻度で脱落した。非殺菌土壌中では宿主細菌が比較的急速に死滅（25℃では10日前後、5℃では50日前後）する一方で、プラスミドの脱落はみられなかった。なお、Ni27株の野性株とpNIA1等を保有する株の間には、土壌中における生存率にはほとんど差異は認められなかった。

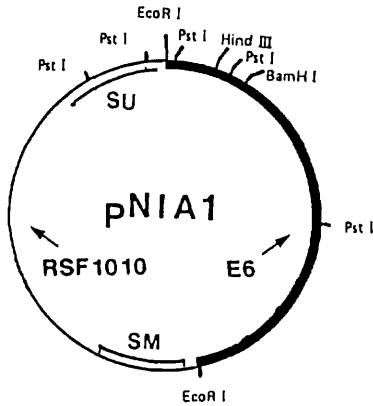
活用面と留意点

今回の成果は、宿主として*Pseudomonas syringae*、ベクターとしてRSF1010系プラスミドを用いた組換え微生物の利用に当たっての基礎資料として役立つものと思われるが、他の宿主・ベクター系の場合には、それぞれ同様の検討をする必要がある。

キーワード

Pseudomonas syringae、組換え微生物、プラスミドの安定性、RSF1010

(佐藤 守)



第1図 複合プラスミドpNIA1の物理的地図

太い線がpCOR1プラスミドのE6断片
 細い線がRSF1010プラスミド
 SM: ストレプトマイシン耐性遺伝子
 SU: スルホンアミド耐性遺伝子

第1表 培養条件によるpNIA1プラスミドの宿主内安定性の差異

培養法	培地	液体/斜面	温度 (°C)	脱落頻度
連続継代 (10代) 静置 (約30~60日)	KB	L(液)	25	-
	PPGA	S(斜面)	25	-
	KB	L	25	-
			5	+++
	KB	S	25	+
			5	+
	PPGA	L	25	+
			5	+++
PPGA	S	25	+++	
		5	+	

プラスミド脱落率 - : 0%, + : ~5%, ++ : ~15%, +++ : 16%~

第2表 殺菌土壌中における *P. syringae* 内の各種プラスミドの脱落

温度	プラスミド	0	4	10	22	41 (保存日数)
25°C	pNIA1	-	-	+	--	+
	RSF1010	-	-	-	-	-
	pNIA2	-	-	-	-	-
5°C	pNIA1	-	+	++	+	+++
	RSF1010	-	-	-	-	+
	pNIA2	-	-	-	-	+

脱落率 - : 0%, + : 2%, ++ : 2~10%, +++ : 10%以上