

遺伝子水平伝播による原核生物の形質転換に関わる 因子の解析と考察

Analysis of Natural Factors in Transformation Mechanism of
Prokaryotic Cells by the Horizontal Gene Transfer

江 藤 夕 貴 前 田 紗 綾 香 西 野 秀 昭

Yuki ETOH

Sayaka MAEDA

Hideaki NISHINO

福岡教育大学・理科教育講座 (生物)

(平成21年9月30日受理)

Abstract

For the purpose of basic research for examination of the mechanism of biological evolution through the horizontal gene transfer, it was experimented whether *Escherichia coli*, one of prokaryotes in this era, could be transformed by the foreign DNA under the natural condition rather than the experimental condition used for efficient transformation techniques or not. As the results, the following conclusions were obtained for the horizontal gene transfer in prokaryotes: the transformation could happen by foreign DNA even without heat shock condition (transformation efficiency, 0.05 %); the concentration of calcium ion needed for the natural transformation was very comparable (10 mM) to the content in earth surface soil.

要 約

遺伝子の水平伝播による生物進化の機構を探求するための基礎研究を目的として、原核生物である大腸菌を用いて、実験研究で行われている人工的な条件による効率的な形質転換ではなく、より自然環境に近い条件下で形質転換が起こりうるかを検討した。その結果、それまで知られていた実験条件で必須とされているヒートショックが無くても（形質転換効率0.05%）形質転換は起こった。最低限、形質転換に必要なカルシウムイオン濃度は10 mM（形質転換効率0.002%；通常の100 mMで0.1%ほど）で、地球表層の土壌中に含まれる平均的な濃度とほぼ同様かそれ以下であり、外来DNAによる原核生物の形質転換は自然な環境条件で十分に起こりうることであることが明らかになった。

1. はじめに

1. 1 形質転換について

1. 1. 1 形質転換の歴史

形質転換とは、細胞が外部からDNAを導入することで、その遺伝的性質を変えることである。

形質転換の現象は、1928年にフレドック・グリフィスによって肺炎双球菌に対する実験によって発見された⁽¹⁾。グリフィスはマウスに病原性のあるタイプIII-S (smooth) と病原性を持たないタイプII-R (rough) の二種類の肺炎双球菌株を用いた⁽²⁾。タイプIII-S株の細胞は多糖類でできた皮

膜で覆われており、宿主の免疫系から自分自身を守っているため、宿主体内で繁殖でき、病気を起こさせることができる。これに対して II-R 株は多糖類の皮膜を持っておらず、宿主の免疫系に晒されてしまうために病原性を発揮できない。つまり、III-S 株を接種されたネズミは肺炎で死亡するが、II-R 株を接種されたネズミは生存できる。この実験では、III-S 株の細菌を加熱して死滅させたものと、II-R 株の細菌をそれに加えたものを対照実験として用いてみた。ところが、これら二つの菌は、各々単独の接種ではマウスは生存できることが確認されていたにもかかわらず、この二つを混ぜ合わせたものを接種した場合、マウスは発病して死亡してしまった。このことから、III-S 株の加熱物に皮膜が含まれており、これを II-R 株が利用することで宿主内での生存が可能になったとも考えられたが、加えられた細菌のうちで生き残ったのは II-R 株のみであることから、III-S 株の死んだものに含まれるなんらかの「転換要素」が原因となって、II-R 株が致死性の III-S 株に転換した可能性が考えられた。のちに、オズワルド・アベリーがこの現象を「形質転換」と名づけ、また形質転換を起こす物質（グリフィスの実験における「転換要素」）が DNA であることを明らかにした⁽³⁾。

1. 1. 2 形質転換実験法の発展

形質転換は、いわゆる遺伝子操作の基本的な技法として現在も多く利用されている⁽⁴⁾。例えば、農業の分野では、農作物に霜や病害虫、干ばつに耐えるための遺伝子を導入している。また環境分野では、流出した原油を分解できる酵素タンパク質の遺伝子を微生物などに導入しており、医療の分野では、欠陥遺伝子が引き起こす病気の治療をするために、患者の細胞に健康な人の遺伝子を取り込ませる、遺伝子治療なども行われている。

細胞より抽出・精製した DNA や mRNA から作成した相補的 DNA (cDNA) は、使い切ってしまうと何も残らない。そこで、DNA を常に必要な量を確保するために、DNA を増幅する技術が必要となる。これを可能にする技術が、*Escherichia coli* (大腸菌) への遺伝子導入である。大腸菌に外来の遺伝子 (プラスミドなど) を導入するのである。DNA など核酸の構成成分は、ヒトでも大腸菌でも共通である。したがって、大腸菌内に導入された DNA は、共通の複製開始点を持っている限り、大腸菌自身の DNA と同様に複製され、細胞分裂により娘細胞に伝えられる。

大腸菌の形質転換法としては、電気パルスにより瞬間的に細胞に穴を開けるエレクトロポレーション法やカルシウム法によって外来 DNA を取り込む能力を持たせた competent cell (コンピテントセル) とした菌を用いる方法がある⁽⁴⁾。通常はファージ、プラスミドなどのベクターを用いて外来遺伝子を導入する。動物細胞に対してはエレクトロポレーション法、酵母菌などに対しては酢酸リチウムを併用するプロトプラスト-PEG 法やエレクトロポレーション法、植物細胞に対してはアグロバクテリアを使用する方法などがよく使用される。また、この他にも Biolistic 法やパーティクル・ガン法などもある。

大腸菌への DNA 導入が可能であることを初めて示したのは、Mandel と Higa である⁽⁵⁾。この時報告された形質転換方法によって、大腸菌への DNA の導入にはカルシウムイオン (Ca^{2+}) が有効であることが示された。これを塩化カルシウム (CaCl_2) 法という。この形質転換法は、1980 年代始めまでの遺伝子工学の進歩に大きく貢献する技術となった。しかし、染色体ライブラリーや cDNA ライブラリーの作製が盛んになるにつれ、 CaCl_2 法の形質転換の効率の低さが問題になってきた。 CaCl_2 法による形質転換効率は、 $10^6 \sim 10^7$ コロニー/ μg pBR322 プラスミドほどである。cDNA ライブラリーを作製する時には、より少ない量の核酸サンプルからより多いクローンを得ることが重要である。1983 年に、Hanahan によって高効率の形質転換法が開発された⁽⁶⁾。この方法をヒートショック法と呼ぶ。この方法は、 10^8 コロニー/ μg pBR322 という高い効率を示し、以後多くの研究室で使用されるようになった。本研究においては、これらの代表的な方法を用いて実験を行った。

1. 2 遺伝子水平伝播について

遺伝子 DNA における変異は、複製の際の誤りやその修復の不完全さによって生じ、それが子孫に伝えられる。これを「DNA の垂直伝播」呼ぶ。DNA の変異が淘汰されることなく世代を経て残されると、種の多様性を生み出す原動力となる。一方で、種ごとの DNA が世代間を垂直に伝えられるのに対し、異なる種の DNA が侵入してゲノムに付加されたり、その一部が置き換わったりすることがある。これを「DNA の水平伝播」と呼ぶ⁽⁶⁾。DNA の水平伝播は、新たな遺伝物質を、自分とは関係のない種の細胞やゲノムに、生殖以外のプロセスで持ち込むことを指し、真核生物に

おけるウイルス感染もその例の一つである。

1. 3 遺伝子水平伝播は実際に起こりうるのか

現在、バイオテクノロジーは、いくつかの生物の遺伝子操作を可能にしている。その手法の基盤として、生物の正確な遺伝情報とその制御が可能な大腸菌や枯草菌などの原核単細胞生物、また酵母やカビなどの比較的単純な真核生物での遺伝子発現によるタンパク質の構造・機能相関解析が必要であり、それを可能にする形質転換法を確立する事は重要な前提条件となる。現在、酵母への遺伝子導入法として、プロトプラスト法、金属処理法、エレクトロポレーション法が知られているが、低い形質転換頻度や操作性、装置の問題など解決すべき問題点を有している⁽⁷⁾。一方、ある種の細菌は、化学的・物理的処理をすることなく、DNAを細胞内に取り込む能力を有することが知られている。この現象を自然形質転換という⁽⁶⁾。自然形質転換は、DNAの水平伝播、即ち異なる生物種間での遺伝子の移動を許容し、微生物進化の原動力になってきたものと考えられている。実際、土壤中などには生物の死骸などに由来する相当量の裸のDNAが存在しており、それらが自然形質転換に利用されている可能性がある。

そこで、本研究では原核生物細胞に焦点を当て、外来DNAによる形質転換が起こりうる環境条件の可能性を検討し、遺伝子水平伝播が起こりうる可能性にアプローチした。

2. 材料と研究方法

2. 1 材料

本研究で用いたプラスミド pGLO (BIO-RAD 社) は、GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子である β -ラクタマーゼ遺伝子 (bla = β -lactamase) を含んでいる。GFP は生物蛍光を発するオワンクラゲ *Aequorea victoria* から単離されたタンパク質で、その特徴的な構造から、紫外線を照射するとエネルギーを吸収し、吸収されたエネルギーは緑色の光となって放出されることが知られている。 β -ラクタマーゼは、抗生物質であるアンピシリンを加水分解することで抗生剤耐性を細胞に与えるタンパク質である。 β -ラクタマーゼをコードする遺伝子を組み込んだプラスミド DNA をバクテリアに導入すると、そのプラスミドを持つバクテリアは β -ラクタマーゼを細胞内で生合成し、細胞

外へ分泌する。分泌された β -ラクタマーゼは寒天培地に含まれるアンピシリンを不活性化し、バクテリアが生育できるようにするのである。つまり、プラスミドを持ち、 β -ラクタマーゼを産出できるバクテリアだけがアンピシリン存在下においても生き残ることができる。形質転換されなかった細胞、すなわちプラスミドを持たない大腸菌はアンピシリンを含む培地上では生育できない。このようにアンピシリン耐性を獲得したかどうか、即ちアンピシリン存在下でも分裂増殖してコロニーを形成できる大腸菌細胞の頻度を比較することで自然形質転換が実際に起こりうるのか確認する。

2. 2 研究方法

2. 2. 1 Luria-Bertani 寒天培地 (LBプレート) の作製

- ①300 ml ビーカーに 150 ml の蒸留水をいれる。
- ②以下の試薬を攪拌しながら加えて溶かす。

NaCl	2 g
Bacto tryptone	2 g
Bacto yeast extract	1 g
- ③ 2 M NaOH を加え、pH 7.0 ~ 7.5 に pH を調整する。
- ④蒸留水を加えて 200 ml にし、よく混合する。
- ⑤200 ml を 100 ml ずつに分け、一方をメジウム瓶に移し、もう一方を三角フラスコに移す。三角フラスコに培地用寒天 1.5 g を加え、アルミ箔でフタをする。
- ⑥121 °C、15 分オートクレーブを行う。
- ⑦メジウム瓶は常温に戻ったあと、4 °C で保存する (液体培地)。三角フラスコの方は 70 ~ 80 °C のうちにアンピシリン (10 mg/ml) の終濃度が 0.1 mg/ml になるように加え、よく混合し、20 ml ずつプラスチックシャーレ (直径 90 mm) に広げ、固化後に培地表面を乾燥させた後、冷蔵庫にて保存する (LB-A プレート; LB プレートはアンピシリンを加えていないプレート)。

2. 2. 2 pGLO の調製 (増幅と精製)

- ①定法に従い、pGLO で形質転換した大腸菌 DH 5 α を LB-A プレートに準備する。
- ②LB-A プレート上のコロニーのうち 1 つをイノキュレーショングループ (黄色) で採取し、室温に温めた新しい LB-A プレートにストリークし、37 °C で一晩培養する。
- ③カルチャーチューブ (15 ml) を 2 本準備し、それぞれのチューブに LB 液体培地 5 ml とア

ンピシリン (10 mg/ml) 50 μ l を入れ、そこに一晚培養されて形成されたコロニーのうち一つをイノキュレーショングループ (青色) で採取し、接種する。

- ④通気しながら 37 $^{\circ}$ C, 170 rpm で一晚巡回培養する。
- ⑤3,000 rpm で 10 分室温で遠心分離する。
- ⑥上澄み液を捨て、沈殿を 250 μ l の Buffer P1 (QIA prep Miniprep kit, 以下同様) で再懸濁し、1.5 ml ミクロフュージチューブに移す。
- ⑦Buffer P2 を 250 μ l 加え、4 ~ 6 回チューブを逆さにし、充分混ぜる。
- ⑧Buffer N3 を 350 μ l 加え、再び 4 ~ 6 回チューブを逆さにし、充分かつ速やかに混ぜる。
- ⑨13,000 rpm で 10 分遠心分離する。
- ⑩上澄みを QIAprep Spin column の中心に静かに注ぐ。
- ⑪30 ~ 60 秒遠心分離し、下にたまった液体を捨てる。
- ⑫0.5 ml の Buffer PB で洗浄し、30 ~ 60 秒遠心分離し、下にたまった液体を捨てる。
- ⑬さらに、0.75 ml の Buffer PE で洗浄し、30 ~ 60 秒遠心分離する。
- ⑭下にたまった液体を捨て、さらに 1 分間遠心分離する。
- ⑮DNA を抽出するため、清潔な 1.5 ml ミクロフュージチューブに移し、50 μ l の Elution Buffer を QIAprep Spin column の中心に静かに加え、1 分放置した後、1 分遠心分離する。
- ⑯溶出されたプラスミドを回収し、DNA の純度や濃度を測定する (200 ~ 250 ng/ μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) ほどになる)。

2. 2. 3 Competent DH5 α の作製

①試薬の調製

試薬 1 : TFB1 (100 ml)

[1] 以下の通りに分量を正確に測る。

RbCl	1.21 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.99 g
Potassium acetate	0.29 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15 g
Glycerol	15 ml

- [2] 1 M HCl で pH を 5.8 にする。
 [3] 蒸留水を加え、100 ml にする。
 [4] ろ過滅菌する。
 [5] 4 $^{\circ}$ C で保存する。

試薬 2 : TFB2 (100 ml)

[1] 以下の通りに分量を正確に測る。

MOPS	0.21 g
RbCl	0.12 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.10 g
Glycerol	15 ml

- [2] 2 M NaOH で pH を 8.0 にする。
 [3] 蒸留水を加え、100 ml にする。
 [4] 121 $^{\circ}$ C, 15 分オートクレーブを行う。
 [5] 4 $^{\circ}$ C で保存する。

- ② -75 $^{\circ}$ C で保存された competent DH5 α 100 μ l の入った 1.5 ml ミクロフュージチューブを取り出し、凍った状態の表面をイノキュレーショングループ (黄色) でこすりとり、LBプレートにストリークし、37 $^{\circ}$ C で一晚培養する。
- ③培養したコロニーのうち一つのコロニーをイノキュレーショングループ (青色) で採取し、LB液体培地で懸濁した後、37 $^{\circ}$ C, 170 rpm で一晚巡回培養する。
- ④そのうち 1 ml と LB 液体培地 100 ml を三角フラスコに入れ、37 $^{\circ}$ C, 170 rpm で OD595 の値が 0.5 になるまで巡回培養する (3 ~ 4 時間ほど)。
- ⑤溶液を二等分し、4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離する。
- ⑥上澄みをする。
- ⑦ 4 $^{\circ}$ C を保ちながら、沈殿に TFB1 を 15 ml ずつ加え、懸濁し氷上で 90 分放置する。
- ⑧再び、4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離する。
- ⑨ 4 $^{\circ}$ C を保ったまま、上澄みをする。
- ⑩沈殿に TFB2 を 2 ml ずつ加え、懸濁する。
- ⑪クリーンベンチ内で 100 μ l ずつ ミクロフュージチューブに移す。
- ⑫使用状況を確認するため、チューブに番号を記しておく。
- ⑬ -75 $^{\circ}$ C で保存する。

2. 2. 4 形質転換 (ヒートショック時間を操作)

- ① -75 $^{\circ}$ C で保存された competent DH5 α 100 μ l 入った ミクロフュージチューブを 4 本取り出し、アイスボックスに移す。
- ② 4 $^{\circ}$ C で保存された pGLO (248 ng/ μ l) を 1 μ l ずつ competent cell の DH5 α 100 μ l に加え、0 $^{\circ}$ C で 20 分放置する。
- ③ 20 分後、42 $^{\circ}$ C でヒートショックを与える。
 チューブ a …ヒートショックなし (0 $^{\circ}$ C に放置)
 チューブ b …ヒートショック 90 秒 (通常の条件)

チューブ c …ヒートショック 60 秒 + 0 °C 30 秒

チューブ d …ヒートショック 30 秒 + 0 °C 60 秒

- ④再び 0 °C に戻し、2 分以上放置する。
- ⑤400 μ l の LB 培地 (室温) を加える。
- ⑥37 °C, 170 rpm で 1 時間巡回培養する。待ち時間にスプレッダーを作成する。
- ⑦チューブ a, b, c, d を LB 液体培地にて 10^2 倍 ~ 10^6 倍に希釈する。各希釈液を 100 μ l ずつ LB-A プレートと LB プレートにスプレッダーで均一に塗り広げる。37 °C で一晩培養する。

2. 2. 5 non-competent DH5 α 作製

- ①-75 °C で保存された competent DH5 α 100 μ l の入ったマイクロチューブを取り出し、凍った状態の表面をイノキュレーターでこすりとり、LB プレートにストリークし、37 °C で一晩培養する。
- ②培養したコロニーのうち一つのコロニーをイノキュレーティンググループで採取し、LB 液体培地で懸濁した後、37 °C, 170 rpm で一晩巡回培養する。
- ③そのうち 0.5 ml と LB 液体培地 50 ml を三角フラスコに入れ、37 °C, 170 rpm で OD595 の値が 0.5 になるまで巡回培養する。
- ④溶液を二等分し、4 °C, 3,000 rpm で 10 分遠心分離する。
- ⑤上澄みをすて、LB 溶液 10 ml で懸濁する。
- ⑥そのうちの 100 μ l を使って形質転換を行う。

2. 2. 6 形質転換 (CaCl₂ 法)⁽⁶⁾⁽⁷⁾

- ①試薬の調製
 - 試薬 1 : 100 mM CaCl₂ (500 ml)
 - [1] CaCl₂ · 2 H₂O 7.35 g を測り、蒸留水 500 ml に溶かす。
 - [2] 121 °C, 15 分間オートクレーブを行う。
 - [3] 室温で保存する。
 - 試薬 2 : 2 倍濃度 (2 \times) LB 液体培地
 - [1] 100 ml ビーカーに 25 ml ほどの蒸留水をいれる。
 - [2] 以下の試薬を攪拌しながら加える。

NaCl	1.0 g
Bacto tryptone	1.0 g
Bacto yeast extract	0.5 g
 - [3] pH 7.0 ~ 7.5 に調整する。
 - [4] 蒸留水を加えて 50 ml にする。
 - [5] 溶液をメジウム瓶に移す。

[6] 121 °C, 15 分間オートクレーブを行う。

[7] 室温に戻ったら 4 °C で保存する。

- ②-75 °C で保存された competent cell の DH5 α 100 μ l の入ったマイクロチューブを取り出し、凍った状態の表面をイノキュレーティンググループ (黄色) でこすりとり、LB プレートにストリークし、37 °C で一晩培養する。
- ③培養したコロニーのうち一つをイノキュレーティンググループ (青色) で採取し、5 ml の LB 液体培地に懸濁した後、37 °C, 170 rpm で一晩巡回培養する。
- ④そのうち 0.5 ml と LB 液体培地 50 ml を三角フラスコに入れ、37 °C, 170 rpm で OD595 の値が 0.3 ~ 0.4 になるまで巡回培養する。
- ⑤溶液を二等分し、4 °C, 3,000 rpm で 10 分遠心分離する。
- ⑥上澄みを捨て、100 mM CaCl₂ で懸濁する。
- ⑦再び、4 °C, 3,000 rpm で 10 分遠心分離する。
- ⑧上澄みをすて、100 mM CaCl₂ で懸濁する。
- ⑨⑦と⑧をもう一度行う。
- ⑩そのうちの 100 μ l をマイクロチューブに移し、そこに pGLO (248 ng/ μ l) 1 μ l を加え、0 °C で 30 分放置する。
- ⑪42 °C, 90 秒ヒートショックを与える。
- ⑫再び 0 °C に戻し、1 ~ 2 分間放置する。
- ⑬100 μ l の 2 \times LB 溶液を加え、37 °C, 45 分間、ウォーターバスに入れる。
- ⑭1.5 ml チューブを 6 本用意し、それぞれ LB 液体培地にて以下の希釈に薄める。1 倍, 10 倍, 10^2 倍, 10^4 倍, 10^5 倍, 10^6 倍。各希釈溶液を 100 μ l ずつ、LB-A プレート及び LB プレートにスプレッダーで均一に塗り広げる。
- ⑮37 °C で一晩培養する。
- ⑯100 mM の CaCl₂ 水溶液を希釈し、10 mM, 1.0 mM, 0.1 mM, 0.0 mM (蒸留水) の各濃度においても、同様の方法にて形質転換を行った。

3. 結果

3. 1 ヒートショックの温度と形質転換の関係

まず、通常 42 °C で行う形質転換におけるヒートショック温度を、0 °C や 30 °C でも行ってみた (表 1)。大腸菌 DH5 α は competent cell を用いている。その結果、42 °C よりも低い温度の 30 °C でもより効率よく形質転換が起こる傾向が観察された。また、氷に置いたままの 0 °C でも形質転換

は見られた。表 1 は代表的な結果を示している (以下同様)。

表 1 ヒートショックの温度と形質転換効率

温度 (°C)	0.0	30	42
形質転換効率 (%)	0.05	0.10	0.01

3. 2 ヒートショックの時間と形質転換の関係

通常 90 秒行うヒートショックの時間を変えて形質転換の効率を観察した。温度は 42 °C を用いている。その結果、30 秒が最も効率が良く、次いで 0 秒と 60 秒で、90 秒は最低の形質転換効率となる傾向が見られた。

表 2 ヒートショック時間と形質転換効率

時間 (sec)	0.0	30	60	90
形質転換効率 (%)	0.05	0.10	0.04	0.02

3. 3 CaCl₂ 濃度と形質転換効率の関係

通常、塩化カルシウム (CaCl₂) は 100 mM の濃度で competent cell を調製している。この濃度を下げた場合に形質転換が起こるか観察してみた。その結果、0.0 mM, 0.1 mM, 1.0 mM では形質転換は観察されなかったが、10 mM では効率は良くはないが、形質転換が確かに起こった。

表 3 CaCl₂ 濃度と形質転換効率

CaCl ₂ 濃度 (mM)	0.0	1.0	10	100
形質転換効率 (%)	ND	ND	0.002	0.1

ND : not detectable

4. 考 察

本研究では、非人工的な条件下、即ちより自然な環境下において原核生物の形質転換が起こりうるのかについて検討を行った。まず、一般的に最適な条件下で、形質転換の効率を重視した条件下で実験を予備的に行った。これまでは抗生物質であ

るアンピシリンは、既に作成している抗生物質なしの LB プレートにアンピシリン水溶液を吸収させていた。しかし培地プレートの端まで行き渡っていない可能性が考えられたため、培地全体にアンピシリンが行き渡るようにするため、LB プレートを作成する際に、まだ液状の段階で既定濃度のアンピシリン水溶液を混合することで抗生物質入りの寒天培地 LB-A プレートを作成した。

次に、DH5 α を操作し実験を行った。それまで使用していた大腸菌は competent DH5 α であったが、non-competent DH5 α を作製し、それを使用して形質転換を行ったところ、形質転換は全く観察できなかった (データ示さず)。このことから、塩化カルシウムなどで処理した competent DH5 α でなければ形質転換は起こらないことが明らかとなった。そこで、均質な DH5 α を大量に得るため、competent DH5 α の大量作製を行った。その後の実験はこの均質な competent DH5 α を使用し、チューブ内に存在する細胞数を一定と考え、形質転換の効率を計算した。

pGLO についても同じ濃度のものをそろえるため、DNA の抽出を行い、200 ~ 250 ng/ μ l 程度の濃度の pGLO を作製し、その後の実験はこの濃度のものを使用した。つまり、DH5 α と pGLO に関しては常に同じものを使用し、その他の条件を操作することで形質転換の条件を統制していくこととした。

まず、ヒートショックの温度及び時間を操作した。通常の実験では、0 °C, 20 分 → 42 °C, 90 秒 → 0 °C, 2 分以上という条件で行う。そこで今回、42 °C 以外に 30 °C や 0.0 °C での形質転換効率や、42 °C での処理時間を 0 秒, 30 秒, 60 秒と条件を変えて実験を行った (表 1, 表 2)。その結果、ヒートショック温度は 30 °C, 時間は 0 秒の場合に最も高い形質転換効率を得られる傾向があった。また、一般的な 90 秒の場合に関しては最も低い効率であった。さらに注目すべき点は、0 °C の場合、つまりヒートショックがなくても形質転換が起こっているということである。ヒートショックは温度の急激な変化を与える操作であり、この操作によって細胞膜を乱し DNA を導入させるという仕組みであるが、これはあくまでも人工的な操作である。自然状態においてこのような急激な温度の変化が起こることはあまり考えられないとすると、より自然状態に近いのはヒートショックを与えなかった 0 °C の条件の場合ということになる。0 °C の場合は 30 °C の次に高い効率を示していることから、温度の条件に関しては、自然状態で

の形質転換は充分起こりうると考えられる。そこで、より自然状態に近づけるため、ヒートショックを与えないことに加え、室温（今回は24℃）での実験も行って見たところ、これも形質転換が起こった（データ示さず）。また、その効率も0.2%と0℃の場合より高い効率であり、非人工的な条件により近づく結果となった。

次に、competent DH5αに含まれる金属イオンに注目し、条件を変えて実験を行った。competent DH5αを作製する際に使用した試薬にはMn, Rb, Ca, Kなどが含まれているが、この中からCaのみを使用し実験を行った。これは、先にも述べているCaCl₂法と呼ばれる方法であり、以前はこの方法が一般的であった。しかし、このCaCl₂法は形質転換効率の低さから次第に使われなくなったが、今回の実験では自然状態に近づけることが目的であるため、その観点から考えてもMn, Rb, Ca, Kなど多くの金属は含まれている条件よりCaのみで実験を行う方がより非人工的であると考えられる。一般的なCaCl₂法は100 mMのCaCl₂を使用するため、まず100 mMのCaCl₂を作製し実験を行って形質転換が実際に起こることを確認した。そこで、CaCl₂の濃度を0.0 mM, 0.1 mM, 1.0 mM, 10 mMと変えて再び実験を行った（表3）。まず0.0 mM, 0.1 mM, 1.0 mMに関しては形質転換は観察されなかった。しかし、10 mMに関しては0.002%とその効率は低いが形質転換が確認された。10 mMという濃度は、1 l中に10 mmolのCaCl₂が存在するということであり、Caの分子量を40とすると10 mMとは、1 l中に0.4 gのCaイオンが存在しているということである。つまり、最低0.4 gのCaイオンがあれば形質転換は起こりうると考えられる。地殻の構成元素は、大陸地殻でCaは4.6%（重量%）である⁸⁾。例えば、100 gの土壤に1 lの雨が降ったとするとそこには4.6 gのCaが含まれていると考えられる。形質転換が起こるために必要な条件が1 l中に0.4 gであるならば、4.6 gは十分な量だといえる。100 mMとして考えてもその条件は満たしている。つまり、金属イオンに関してもより自然状態での形質転換は可能であるものと考えられる。

本研究では、ヒートショックと金属イオン二つの条件を統制し実験を行ったが、結果、より非人工的、即ち自然な環境下の地球上で原核生物の形質転換が起こることが明かとなった。本研究を深めるため、今後は、非人工的な状態で起こる形質転換の結果、その子孫が淘汰圧に耐えて生存が可

能か、様々な条件下での実験やシミュレーションを行うことなどが必要であろう。

5. 参考文献

- (1) Elke Nevoigt, Anne Fassbender & Ulf Stahl, Cells of yeast *Saccharomyces cerevisiae* are transformable by DNA under non-artificial conditions. *Yeast*, 16, 1107-1110, 2000
- (2) Griffith, F., The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.*, 27, 113-159, 1928
- (3) David A. Micklos & Greg A. Freyer, DNA Science A First Course in Recombinant DNA Technology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19-21, 1990
- (4) 小野寺一清 組換えDNA実験ノート〈基本操作編〉, 現代工学社, 1992
- (5) 小野寺一清 監修, 組換えDNA実験ノート〈応用操作編〉, 現代工学社, 1996
- (6) Bruce Alberts, et al., Molecular Biology of The Cell, fourth ed., 21-23, Garland Science, 2002
- (7) 大矢禎一 監訳, 酵母遺伝子実験マニュアル, 丸善, 2002
- (8) 西村祐二郎, 基礎地球科学, 朝倉書店, 2002