

細菌のクリソタイルアスベストを介した
プラスミド取込み機構とその応用

15580307

平成15～17年度科学研究費補助金

(基盤研究C) 研究報告書

平成18年4月28日

代表研究者 吉田 直人

宮崎大学農学部助教授

<はしがき> 本報告書は平成15年度から18年度にかけて科学研究費補助金（基盤研究C）の交付を受け、「細菌のクリソタイルアスベストを介したプラスミド取込み機構とその応用」という課題で行われた研究成果をまとめたものである。

研究組織

代表研究者：吉田 直人（宮崎大学農学部助教授）

交付決定学

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	700,000	0	700,000
平成16年度	2,000,000	0	2,000,000
平成17年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

Yoshida, N., Saeki, Y., Chrysotile fibers penetrate *Escherichia coli* cell membrane and cause cell bursting by sliding friction force on agar plates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 162-168 (2004).

Yoshida, N., Saeki, Y., Chestnut bur-shaped aggregates of chrysotile particles enable inoculation of *Escherichia coli* cells with plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 566-575 (2004).

Yoshida, N., Nakajima-Kambe, T., Matsuki, K., Shigeno, T., Novel transformation method of *Escherichia coli* by plasmid mediated by sliding friction, chrysotile and elastic body exposure. Submitted (2006)

(参考)

Yoshida, N., Naka, T., Ohta, K., Mutagenesis of bacteria by fibrous or clay minerals. *Journal of Biological Biosciences*, 4, 532-536 (2004).

(2) 口頭発表

Naoto Yoshida, Yuichi Saeki

Escherichia coli cells were penetrated with chrysotile fibers and transformed to antibiotics resistance by incorporation of exogenous plasmid DNA.

16th International symposium on environmental biogeochemistry

Oirase in Towada Hachimantai National Park Aomori Prefecture, Japan

September 1-6, 2003

吉田直人、佐伯雄一

クリソタイトのいがぐり状化凝集を利用した遺伝子の接種

2004年度日本農芸化学会大会、広島大学、2004年3月29日

吉田直人、小玉和俊、太田一良

コンピテントな状態を経ない細菌のプラスミドによる形質転換

2004年度日本生物工学会大会、名古屋 名城大学、2004年9月21日

Naoto Yoshida

Chestnut bur-shaped aggregates of chrysotile whiskers enable inoculation of *Escherichia coli* cells with plasmid DNA

Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies
2005

Sanfrancisco, California, USA, Moscone Convention Center

July 23-28,2005

瀬戸口希, 松木佳中里, 茂野俊也, 吉田直人, 中島敏明

弾性体—針状鉱物結晶による形質転換装置の開発と利用

平成17年度日本生物工学会大会、つくば国際会議場、2005年11月17日

研究結果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称：微細針状物質を用いた核酸物質導入装置

発明者名：茂野俊也、吉田直人

権利者名：茂野俊也、吉田直人

出願番号：特願2005-254231号

出願日：平成17年9月2日

結 言

アスベストはケイ酸塩水和物を主成分とした繊維状の天然粘土鉱物鉱の一種であり、拡張性、絶縁性、耐熱性に優れた物性を有している。家屋の断熱材や耐火服をはじめ、約 3000 種の工業製品に使用されているように、需要もたいへん高い。

アスベストはそれを構成している鉱物のケイ酸塩骨格構造の違いによって大きくフィロケイ酸塩鉱物である蛇紋石族とイノケイ酸塩鉱物である角閃石族に区別される。蛇紋石族に属するアスベストはクリソタイルである。SiO₄の4面体シートとMgO₆の8面体シートが組み合ったものが単位となり、これが幾重にも積み重なって結晶構造を形成している。4面体シートより8面体シートの方が広がりがあるため、8面体シートを外側にしらせん状あるいは同心円状に巻かれ中空の管状結晶をとるのが特徴である。角閃石族に属するアスベストは分子構造に多様性があり、クロシドライト、アンソフィライト、アモサイト、トレモライト、アクチノライト等が知られている。これらの鉱物はSiO₄の4面体シートが一次的につながることができる鎖が2本並んで二重鎖の構造をとる骨格構造（イノケイ酸塩）を持っており、一般的に断面は菱形となる。角閃石族アスベストは耐酸性にすぐれているが、繊維がややもろい欠点がある。蛇紋石族のアスベストであるクリソタイルは繊維が柔軟で、綿糸と同様に織物を作ることもできるので、世界のアスベスト利用の90%以上を占めている。しかしながらこれらアスベストの発ガン性が懸念され、人のみならず環境中の動物や植物にも悪影響を及ぼすことがわかってきた。人体においては耐久性のある細い繊維はすべて発ガン性という、物理的刺激による発ガン性が有力であるが、繊維の結晶性や化学性も重要な因子とする考えもある。その変異メカニズムとしては、アスベストがヒドロキシルアニオンやスーパーオキシドアニオンといった活性酸素種の生成を触媒し（Fenton reaction）、DNA鎖中のグアニンが酸化され、遺伝子の変異が生じるという説がある。しかしこれのみではアスベストの変異メカニズムは説明つかず、未だ謎が山積している。

アスベストが培養細胞のトランスフォーメーションを引き起こすことを最初に報告したのはSinocockらで1977年である。しかし培養細胞の形態に腫瘍性のトランスフォーメーションをおこすと述べているので、細胞の形態変化が認められたわけであり、外来の遺伝物質を取り込んで形質転換したのではない。また1985年Paterourらはラット肋膜中皮細胞を用い、アスベストに長期暴露した場合、トランスフォームしたコロニーが増加するとしている。しかし、いずれの報告においてもトランスフォーメーションのレベルは弱いものであり、トランスフォームした細胞は動物に注入され催腫瘍性が確かめられないので、なお細胞のトランスフォーメーションには疑義をもつ意見もある。我々はアスベストの中でも採掘量、利用頻度の最も多いクリソタイルアスベスト（以後クリソタイルと呼ぶ）の変異機構を細菌を用いて調べてきた。ク

クリソタイルに暴露させた *Agrobacterium radiobacter* の変異を RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 法にて調べたところ、クリソタイル暴露細胞では、アスベスト非暴露細胞では増幅されない約 1.4kbp の遺伝子 (ASDA) が増幅された。PCR 後の産物中に見られる ASDA とゲノム DNA 内に存在する ASDA をクローニングし、塩基配列を決定して、比較したところ、プライマーがアニールする領域のみ変異が起きていることが示された。このことからクリソタイルによる *A. radiobacter* における変異の一例として、3 箇所の点突然変異または 14bp の欠失が生じることを示した [Yoshida, N. *et al.* Toxicity and mutagenesis of chrysotile asbestos to *Agrobacterium radiobacter*. *Current Microbiology*, 42, 398-402 (2001)]。これらの研究から我々は粘土鉱物の中には、バクテリアの遺伝子に働きかけ、その制御をかき乱し、進化の原動力になりうる鉱物があるということを提唱した。

1988 年 Appel らはアスベストが細胞の形質転換を仲介することを初めて報告した。彼等はその論文の中で、プラスミドがアスベスト繊維に吸着することを示し、サルスの培養細胞 COS-7 にプラスミドとアスベスト繊維を接触させると、プラスミドは細胞内に導入され、染色体 DNA 中にインテグレートされて、プラスミドにコードされた形質が安定に発現したと述べており、アスベストの新規変異メカニズムを提唱した。

我々は細菌進化の真理を追求する過程で、遺伝子の水平伝播と Appel らの論文に着目し、はたして細菌においてもこのような現象が起きるのかどうか調べるに至った。そこで大腸菌を研究材料に用い、様々な条件を検討したところ、特殊な限られた物理変化を起こすことにより、1 μ g の pUC18 当たり 10^6 個のオーダーで形質転換体を得られ、クリソタイルアスベストが外来プラスミドによる大腸菌の形質転換を仲介する現象を報告した [Yoshida, N. *et al.* Chrysotile asbestos fibers mediate transformation of *Escherichia coli* by exogenous plasmid DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 133-137 (2001)]。本研究ではどのような段階を経てプラスミドが細胞内に送り込まれるのかを明らかにし、クリソタイルの仲介による大腸菌の形質転換機構の詳細を明らかにすることが目的である。さらには得られた原理の応用をめざす。

弾性体上におけるクリソタイルの大腸菌穿刺の可能性

弾性体曝露における物理変化

50 μ l のクリソタイル細胞けん濁液は寒天上に滴下され、図1に示す曝露装置（トリボスプロバイダー）を用いて弾性体曝露に供された。寒天には一定の垂直抗力でストリークバーが押し当てられ回転運動が加えられることにより、表面にはすべり摩擦力（sliding friction force）が発生する（図2）。水分が寒天上に存在していると、水分が潤滑剤となるので、滑り摩擦力は非常に低い値となる。ターンテーブルが回転し始めて約7-15秒後に水分は寒天中にしみ込む。水がしみ込んだと同時に寒天は粘弾性体となり、滑り摩擦力は最も大きくなる。垂直抗力は40gと一定であるのでクリソタイル曝露は滑り摩擦係数が変化する処理といえる。摩擦力はアモントクーロンの式 $F = \mu N$ （ F は滑り摩擦力、 μ は摩擦係数、 N は垂直抗力）によって表わされる。図のグラフに示すように、滑り摩擦係数は曝露時間に伴って上昇する。またすべり摩擦力 F も同様に曝露時間にともなって上昇し、水分が寒天にしみ込んだ時点で最大となり、そして一定の値を示すと考えられる。

弾性体曝露時間の形質転換に及ぼす影響

形質転換体は曝露時間が30秒で1000個弱得られ、曝露時間が60秒以上では4000個前後得られた。特徴的な現象として、曝露時間が1秒であると、培地表面の状態は湿っているが、曝露時間が15秒あたりでミクスチャーが寒天に浸透し、培地の表面は乾燥しはじめて、元の寒天水分量になる。形質転換効率は曝露時間に影響され、60秒曝露で形質転換効率はほぼ飽和状態に達すると考えられる。この実験は確かな再現性があり、このような物理的的刺激はクリソタイルアスベストを介した形質転換に深く関与しているように思える（図3）。

弾性体（寒天）濃度

図4は曝露時間を60秒に固定して、培地中の寒天の濃度の形質転換効率に及ぼす影響を調べた結果である。図3に示した実験は寒天濃度1.5%である。寒天濃度が1.5%の時、両者の実験はともに 10^3 個のオーダーの形質転換体を得られている。ところが、寒天濃度を2%にすると、形質転換効率は上昇し、1 μ g のpUC18あたり 10^4 のオーダーで形質転換体を得られるようになった。反対に寒天濃度を0.5または1%にすると、極端に形質転換効率は下がり、得られた形質転換体はpUC181 μ gあたりわずかに100個以下であった。寒天濃度が3、4%になると効率はやや下がっている。この実験結果からもクリソタイルを介した形質転換には培地の水分含量や物理的な摩擦が重要なパラメーターであることを示唆している。3、4%寒天における曝露において形質転換効率が下がるのは物理的な摩擦による細胞障害が大きくなることに因果関係があ

り、死滅する細胞が増すためではないだろうか。

培地中の水分が形質転換を阻害するかどうか明らかにするために次に示す実験が行われた。図5のAでは、LBプレートに細胞-プラスミド-クリソタイル懸濁液を $50\mu\text{l}$ 加えた時点を0時間とし60秒間の弾性体曝露を行った。約15秒後に培地表面が乾燥し元の状態に戻ったことを表現している。この操作の結果として、形質転換は成功である。Bでは、LBプレートに細胞-プラスミド-クリソタイル懸濁液を $50\mu\text{l}$ 加えたことは同じであるが、弾性体曝露は行っていない。この場合、培地表面は徐々にゆっくりと乾燥し、約2分後に元の状態に戻る。この実験結果は形質転換不成功である。Aと同様の操作の後、Cでは滅菌蒸留水を $50\mu\text{l}$ 加えた。Dでは1UのDNaseを含む滅菌蒸留水 $50\mu\text{l}$ を加えた。いずれの場合も約2分後には元の状態に戻っている。これらの結果は形質転換成功である。この実験はクリソタイルを介した大腸菌の遺伝子の取り込みは弾性体曝露中の60秒以内に起っていることを示している。EではpUC18を除いた細胞-クリソタイル懸濁液 $50\mu\text{l}$ を加えた時点を0Tとし、約15秒後に培地表面が乾燥し、元の状態に戻ったことを表現している。この操作の後pUC18 50 ngを含む滅菌蒸留水を $50\mu\text{l}$ 加えたところ形質転換は成功しなかった。大腸菌は60秒の弾性体曝露のみコンピテントな状態になると予測される。大腸菌の遺伝子を取り込む能力は弾性体曝露後ただち消失する。Fでは細胞を除いた細胞-プラスミド-クリソタイル懸濁液 $50\mu\text{l}$ を加えた時点を0Tとし、約15秒後に培地表面が乾燥し、元の状態に戻ったことを表現している。この操作ののち細胞懸濁液 $50\mu\text{l}$ を加えたところ形質転換は成功しなかった。この結果から、プラスミドとクリソタイルの弾性体曝露は必要ではなく、大腸菌の細胞とクリソタイルが混合された状態での弾性体曝露が形質転換には必要であることが分かる。これらのことより、大腸菌はクリソタイルとの物理的摩擦の瞬間に外来からプラスミドDNAを細胞内に取り込むといえるのだ。これらの実験結果は形質転換が起きるか起きないかのどちらかで、とてもはっきりしている。

形質転換における陽イオンの効果

細胞-プラスミド-クリソタイル懸濁液に2価のイオン（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム）を0から400mMの濃度で加えた状態での形質転換効率に及ぼす影響が調べられた（図6）。弾性体曝露条件としては培地の寒天濃度は2%、曝露時間は60秒とした。2価のイオンを含まない条件では形質転換効率はいずれも $1\mu\text{g}$ DNAあたり 10^4 個弱である。いずれのイオンでも100mM以上添加しておく、イオンを加えていない時に比べると、形質転換効率は10倍以上上昇し、 10^5 のオーダーで得られるようになった。最も高い効率で形質転換体得られる濃度は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム濃度がそれぞれ200、100、300、100mMの時それぞれ 2.2 、 2.1 、 2.0 、 1.6×10^5 個の形質転換体得られた。

弾性体曝露に伴う生細胞の減少

図7は大腸菌-クリソタイル懸濁液を弾性体曝露させた後の寒天培地上に形成されたコロニーの写真である。弾性体曝露時間0は培地の表面に滑り摩擦力をまったく与えないもので多くのコロニー形成が見られる。曝露時間を長くするとコロニーの数が減少していることがわかる。10⁴倍希釈した菌濃度の場合にはコロニー数の減少は顕著に確認できる。曝露時間0の場合は約1000個、曝露時間60秒で8個、120秒で1-2個に減少している。100倍希釈の菌濃度でも同様にコロニー数は減少している。明らかに曝露時間に伴って大腸菌は死滅していくことを示している。弾性体曝露時間にもなうコロニー数の減少を計測し、グラフで表したものが図8である。曝露前はプレート上に2x10⁷個の生存菌が存在するが、15秒の弾性体曝露で生存菌数は約半分に減少する。60秒間の曝露では10⁵個、120秒間の曝露では10⁴に減少した。曝露時間60秒付近から生存細胞の減少は緩やかになる傾向がある。このように曝露時間が長くなると生存菌数は減少してくる。大腸菌-クリソタイル懸濁液と同条件で、大腸菌とクロシドライトまたはアモサイトを懸濁し、生存菌数の減少が調べられた。図8に示すように、いずれのアスベストと懸濁させても、曝露時間にもなう生存菌数は減少した。クロシドライト、アモサイトと比較すると、クリソタイル懸濁細胞の生存菌数はもっとも激しく減少する傾向が見られた。120秒曝露においては細胞-クリソタイル懸濁液中の生菌数は細胞-クロシドライトおよび細胞-アモサイト懸濁液中の生菌数の1/10以下となった。同じ繊維状鉱物でも大腸菌への損傷程度は種類によって大きな違いがある。大腸菌への損傷強度はクリソタイル>アモサイト>クロシドライトであるといえる。

アンピシリン耐性遺伝子をコードしたプラスミド pUC18 を保持する大腸菌をアンピシリンを含む培地上で弾性体させた場合、生存菌数の減少挙動は抗生物質を含まない培地上にて曝露させた大腸菌の生存菌数の減少挙動とほぼ同様である。しかしながらカナマイシン耐性遺伝子をコードしたプラスミド pHSG298 を保持した大腸菌をカナマイシンを含む培地で曝露させた場合、生存菌数は著しく減少した。すなわち抗生物質を含まないあるいはアンピシリンを含む培地での生存菌数は60秒の曝露により、2x10⁵に減少するが、カナマイシンを含む培地での生存菌数は2x10⁴であった(図9)。アンピシリンの作用機作は細胞壁のペプチドグルカン生合成阻害であり、カナマイシンのそれはリボゾームにおけるタンパク合成阻害のみならず細胞壁に損傷を与えることにある。大腸菌はカナマイシン耐性遺伝子を保持しているのでカナマイシンには耐性であるが、カナマイシンを含む培地にて弾性体曝露に供されると、感受性が高くなり、細胞損傷の度合いは甚大となることが予想される。

弾性体（寒天）濃度と生細胞数

大腸菌-クリソタイル混合液の弾性体曝露において、寒天濃度が生菌数の変遷にどのような影響があるのか調べられた。図 10 に示すように、0.5%濃度寒天培地上にて弾性体曝露に供した場合、いずれの曝露時間においても細胞の死滅はほとんど観察されなかった。しかし寒天濃度を2%にすると、対照的に曝露時間の長さに伴って生存菌数の減少が見られた。2%寒天では大腸菌-クリソタイル混合液は15秒以内に寒天中にしみ込み、滑り摩擦力の増大が生じる。一方0.5%寒天は水分を多く包括しているため、低い摩擦係数を保ち続け、滑り摩擦力の増大は見られない。寒天培地中の水分が多いと物理的刺激が相殺されると考えられる。この結果は弾性体曝露による細胞損傷は物理的な力（滑り摩擦力）に大きく起因していることを示している。

クリソタイル濃度と生細胞数

図 11 に示された濃度のクリソタイル溶液を調製し、常法どおり大腸菌細胞と混合し、弾性体曝露させた。図 11 に示すように100 $\mu\text{g/ml}$ までクリソタイル濃度が高くなる程生菌数は減少する。200 $\mu\text{g/ml}$ 以降は生存菌数は 10^3 オーダーまで減少し、低い生存菌数のまま推移している。細胞とクリソタイルが接触する機会が多くなる程細胞は死滅することを示している。

Bacillus subtilis ISW1214 の弾性体曝露後の生細胞数

大腸菌の代わりに *Bacillus subtilis* を常法にしたがって弾性体曝露に供した。寒天培地上に 10^7 個の細胞が存在する。曝露時間120秒において生菌数 10^7 個を保っていた。大腸菌のように曝露時間が長くなると、生菌数が減少するという事は *Bacillus subtilis* においては確認されなかった。弾性体曝露による細胞損傷は、対象とする細菌の種類が異なれば、与える影響も異なるのである（図 12）。

細胞の破裂に伴う β -ガラクトシダーゼの漏出

弾性体曝露によって細胞が破裂するかどうかを調べるために、pUC18を保持する大腸菌をクリソタイルとともに15-120秒間弾性体曝露させた。この大腸菌は細胞内に β -ガラクトシダーゼを発現しているため、もし細胞が破裂したなら寒天培地上に酵素活性を確認することができる。図 13 は曝露時間とともに培地表面に出現する酵素活性を示している。 β -ガラクトシダーゼを細胞内に発現している細胞を弾性体曝露させると、曝露時間の経過に伴って培地表面の酵素活性は増大した。曝露時間15秒の間に酵素活性は急激に増大した。この時間は水分が寒天培地に浸透し、急激に滑り摩擦力が増大する時間と一致している。その後、酵素活性は30秒から120秒の間にゆるやかに上昇した。弾性体非曝露細胞では酵素活性の上昇は痕跡程度であった。またプラスミドを保持しない大腸菌を弾性体曝露に供した場合は酵素活性はまったく検出されなかった。

弾性体曝露後の大腸菌の透過型及び走査型電子顕微鏡観察

比較のために実験で用いた大腸菌とクリソタイルの操作型電子顕微鏡写真を図 14 に掲載しておく。写真の中の大腸菌は長さ 1.6-2.7 μm 、直径 0.65 μm で、クリソタイルは長さ 0.34-2.3 μm 、直径が 0.05-0.12 μm であり、クリソタイル繊維は大腸菌の細胞に比較してかなり細いことが強調される。図 15A はクリソタイルとともに 1 分間弾性体曝露した大腸菌を集め、透過型電子顕微鏡にて観察したものである。細胞上部から棒状のクリソタイルが貫入している様子が見られる。クリソタイルの直径は約 50nm、長さは 0.95 μm であった。図 15B はクリソタイルとともに弾性体曝露された大腸菌の走査型電子顕微鏡写真である。大腸菌の大きさは短径 0.5 μm 、長径 1.65 μm である。写真中央付近にクリソタイル凝集体が見られ、そのうちの 1 本が大腸菌細胞を穿刺している様子が観察された。大腸菌に穿刺しているクリソタイルの直径は 60nm、長さは約 0.83 μm であった。図 15C には細胞に穴のあいた変形細胞を示している。おそらくクリソタイルによる穿刺の後の穿刺痕であると思われる。

環境中にあるプラスミド等の DNA によって形質転換されうる状態にある細胞をコンピテントであるという。かなり多種類の細菌はある種の環境条件により決定されて、コンピテントな状態となる。このような細菌は自然形質転換能力をもつものといわれる。よく研究されている 2 種の原核生物 *Streptococcus pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* の自然形質転換を比べてみると形質転換過程に多くのバリエーションがあることがわかる。一方大腸菌を含む多くの細菌は自然形質転換系を持っていないし、通常の培養条件下ではコンピテントにならないが、細胞を 2 価陽イオンにさらすなどの極めて人為的な様々な処理によってコンピテントにすることができる。

弾性体曝露法ではあえて大腸菌を化学処理しコンピテントな状態にしているわけではないので、物理的自然形質転換といえる。形質転換に考慮すべきは培地の寒天濃度である。寒天濃度が 0.5% のように低いと、形質転換効率は極端に減少する。最も形質転換効率が高いのは寒天濃度 2% の時であった。2 つめは弾性体曝露時間である。曝露時間が 1 秒であると、大腸菌はプラスミドを取り込まない。しかし 60 秒であると取り込み、形質転換が成立する。曝露時間が 60 秒であると培地表面はすでに乾燥しているが、1 秒ではそうならない。2 つのパラメータに共通していえることは、寒天濃度が低い時、曝露時間が短い時、寒天の表面の水分量が高いと、大腸菌はプラスミドを取り込まない。したがって大腸菌の細胞をクリソタイルの接触と同時に寒天培地の湿潤から乾燥へという 30 秒以内の物理的な刺激が、大腸菌の自然形質転換を引き起こすのである。大腸菌のプラスミドによる形質転換によく使用されるハナハン法では、ヒートショックという熱化学的刺激が必要であるのと同様に、クリソタイルの仲介による形質転換も摩

擦ショックという物理化学的刺激が必要である。また、ハナハン法に代表されるような従来の方法では、対数増殖期細胞でなければ大腸菌にコンピテント能力を付与されることはできなかったが、クリソタイルの仲介による形質転換は定常期の細胞を用いるものであり、コンピテント細胞を調製する必要が無いので、大腸菌における物理的形質転換であることを提唱する。

我々はクリソタイルに吸着したプラスミドが細胞内に取り込まれるのか、クリソタイルに吸着していない遊離のプラスミド分子を取り込むのか調べるため、遊離のプラスミドを注意深く取り除き、プラスミドが吸着していると思われるクリソタイルのみを調製し、大腸菌を弾性体曝露させた。その結果、興味深いことに形質転換はアスベストに吸着したプラスミドのみによって引き起こされることがわかった。

図 15 に示すように、弾性体曝露により、クリソタイル繊維がバクテリアの細胞に突き刺さることが示唆された。プラスミドを吸着したクリソタイル繊維は細胞に突き刺さることによってプラスミドを細胞内に運搬すると考えられる。図 13 に示すように、一部の細胞はクリソタイルが突き刺さることによって破裂し、死滅するが、低確立ながら生き残る細胞も存在する。細胞の生存はおそらく細胞当たりクリソタイルが突き刺さる頻度によると考えられる。2 価のイオンの添加で形質転換効率が増すのは 2 価のイオンが浸透圧を調節し、細胞を安定化させ、弾性体曝露からの障害を少なくさせると解釈することができる。そして生き残った細胞の内プラスミドを細胞内に取り込んだ細胞が、選択培地上にてコロニーを形成するのである。細胞分裂クリソタイルがささった状態で起こり、プラスミドの娘細胞への分配も正確に起こると予想される。

アスベストの仲介による形質転換方法は *E. coli* JM109 以外にも DH5 α や C600 株など他の大腸菌においても有効であることを確かめている。*Klebsiella*, 酢酸菌においても成功している。これらの細菌はグラム陰性である。しかしグラム陽性菌ではクリソタイル繊維を仲介とするプラスミドによる形質転換は起きなかった。この最大の理由は細胞壁の厚さにあるにちがいない。グラム陽性菌の細胞壁は陰性菌に比べると分厚いので、クリソタイル繊維が突き刺さらないと考えられる。基本的にはクリソタイルは細胞に突き刺さり、プラスミドを導入させるのであるから、グラム陰性菌であるならば、プラスミドによる形質転換は可能である。従って効率の問題も含んではいるが、複雑な操作を必要としないので、大腸菌やグラム陰性菌の簡便な形質転換技術として注目されることを期待する。

大腸菌とクリソタイル、クロシドライト、アモサイトを混合し、弾性体曝露をおこなって滑り摩擦力を与えるという実験をおこなったところ、クリソタイルはクロシドライトやアモサイトと比較すると激しい攻撃を大腸菌に与えるという結果が新たに導かれた。同じ繊維状の鉱物であっても、大腸菌に与える細胞損傷には違いが見られる。

質量 W の物体を固体表面上で滑らせたとき、その摩擦力 F はアモントン-クーロンの法則に従って $F = \mu N$ と表される。 μ は摩擦係数であり、接触面積や滑り速度などの条件によらず各固体固有の値を示し、一般的に 0.2~1.0 である。固体の摩擦力は垂直抗力に比例するが、接触面積や滑り速度には依存しないので、一見、摩擦現象がとても単純なものに見える。摩擦係数がなぜ摩擦速度に関与しないのかいまだによくわかっていない。ところでゲルの表面、界面特性の摩擦に関する研究はほとんどなされていない。ゲルのすべり摩擦はいろいろな意味で個体とは基本的に異なることがわかってきている。ゲルの研究は始まったばかりであり、特に表面、界面特性や摩擦の問題に関する研究はこれまでほとんど手付かずの状態にある。第一の特徴は、ゲルの摩擦力は摩擦係数が固体と比較して圧倒的に小さく、しかも垂直抗力に単純に比例しないということである。第二の特徴はゲルの表面摩擦が接触面積に依存するという点である。第三の特徴は固体とは異なり、摩擦力が摩擦速度の増大とともに増大するという点である。これは水中摩擦と似た現象であり、その程度はゲルの種類、含水量に強く依存する。大腸菌が弾性体曝露に供される時、寒天培地表面ではいったい何が起きているのだろうか？細胞とクリソタイルの物理的な相互作用、すなわち寒天の界面で生じる単純な現象はとても重要である。溶液中に細胞とクリソタイルを浮遊させ、寒天培地上に滴下する。そして、ストリークすれば、水分は寒天中にしみ込み、寒天との界面に一時的に水分の少ない環境がうまれる。そこでは細胞は浮遊しているのではなく、寒天繊維に吸着しさらに回転という力が加わると細胞とクリソタイルの相互作用が生まれる。一部の細胞はクリソタイルの細い鋭い針の攻撃を受け、クリソタイルが細胞に突き刺さることによって細胞破壊が引き起こされてしまうのである。垂直抗力が大きくなる程死滅菌数は増大した (Data not shown)。本実験の場合には滑り摩擦力は垂直抗力に比例しているのかも知れない。細胞とクリソタイルをただ溶液中で混合したのみでは、ある程度の接触は考えられるが、クリソタイルが細胞に物理的に突き刺さるという頻度は無視できるものである (Data not shown)。本論文は細胞壁を備えた細胞にもクリソタイルは突き刺さりうるということを証明したわけであるから、細胞壁をそなえない、裸の状態である人間や動物の気管枝細胞、肺の細胞に突き刺さらないという否定は難しい。

弾性体曝露によっては大腸菌には損傷を与えるが、バチルスにはまったく損傷をあたえなかった。この最大の理由は細胞壁の厚さにあるにちがいない。グラム陽性菌の細胞壁は陰性菌に比べると分厚いので、クリソタイル繊維が突き刺さらないと考えられる。Chamberlain ら (Mutat Res. 43, 159-164, 1977) は UICC クリソタイル B、アモサイト、アンソフィライト、クロシドライト、SFA クリソタイル、ガラス繊維等について、サルモネラ菌 (TA1535, TA1538) および大腸菌 (WP2, WP2uvrA 等数種) を用いて変異原性テストを行った。両細菌系試験において、すべての試験物質 (最高濃度 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$) は、ラット肝による代謝活性化を行った場合にも、行わない場合にも陰性結果を示している。また Light ら (The in vitro effects of mineral dusts,

eds. London 1980) も UICC のクリソタイル B とクロシドライトについて、サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA83) を用い、最高濃度 500 μ l/plate においていずれの試験物質も陰性結果を得ている。これらの結果から、微生物を用いた変異原性試験では石綿繊維は陰性結果を示すものと考えられる。

本実験において自然界においてはクリソタイルは細菌に対しては、変異原となるよりはむしろクリソタイルがミサイルのように突き刺さるというような物理的で性急な反応をもたらすものと結論づけられる。

クリソタイルはいがぐり状化凝集し、大腸菌にプラスミドを接種する

フローサイトメータによるクリソタイル溶液の粒子解析

クリソタイル溶液はフローサイトメーター (CyFlow, Partec, Germany) にて測定可能な粒子数、蛍光強度になるように希釈され解析された。解析に用いたクリソタイルの濃度は $2.5\mu\text{g/ml}$ であった。FITC がコンジュゲートした 26mer の 1 本鎖 DNA を吸着させた。直径 $2.7\mu\text{m}$ の球形ビーズをフローサイトメーターにとおし、前方散乱光シングルプロットしたところ、110 に出現するすどいピークが $2.7\mu\text{m}$ の大きさを反映した。クリソタイル粒子は連続した大きさを、対称の山形になって分布している。もっとも多く存在する粒子は前方散乱光 7 付近で $100\mu\text{l}$ 中約 655 個カウントされた。前方散乱光シングルプロットは、クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子の 95% 以上が 2.7 マイクロメートルよりは小さいことを示している。この結果は電子顕微鏡による観察結果 (lengths of $0.34\text{--}2.30\mu\text{m}$) と一致している (図 16A)。

直径 $2.7\mu\text{m}$ の球形ビーズを側方散乱光シングルプロットしたところ、前方散乱光シングルプロットと同様に 110 に出現するすどいピークが $2.7\mu\text{m}$ の大きさを反映した。クリソタイル粒子の大きさは連続しているが、非対称の山形になって分布している。粒子分布が非対称なのは球形のビーズとは異なりクリソタイル粒子は針状であることに由来すると考えられる。もっとも多く存在する粒子は側方散乱光 1.5 付近で $200\mu\text{l}$ 中約 1600 個カウントされた。側方散乱光シングルプロットも、クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子の 95% 以上が 2.7 マイクロメートルよりは小さいことを示している (図 16B)。

前方散乱光、側方散乱光ダブルプロットも同様にクリソタイル溶液中には $2.7\mu\text{m}$ よりも小さい粒子が多く存在していることを示している。 2.7 マイクロメートル以上のドットもみられるが、痕跡程度存在することがわかる。ドットの密度が濃いのは前方 7 付近、側方 1.5 付近である。ドットの密度がグラフ中のドットの分布が非対称なのはクリソタイル粒子が球形ではないことを示している (図 16C)。

FITC の蛍光強度でプロットすると図 16D に示すように、前方散乱光プロットと同様に連続した山形対称型となった。蛍光強度 10 付近の粒子がもっとも多く約 1450 個存在した。RN1 の範囲で蛍光粒子をカウントするとクリソタイル溶液中には 1 ml あたり 7.4×10^6 個の粒子が存在する。前方散乱光-FITC 蛍光強度ダブルプロットを図 16E に示す。前方散乱光 7、蛍光強度 10 の位置にドットの密度が高いことは、グラフ図 16A と図 16D の結果と一致している。側方散乱光-FITC 蛍光強度ダブルプロットにおいても最も粒子数が多かったのは側方散乱光 1.5、蛍光強度 10 のであった (図 16F)。これらの結果は FITC オリゴ DNA はクリソタイルに吸着することを示しており、またグラフ図 16D における粒子のカウントはクリソタイル粒子数を正確に反映している。

大腸菌形質転換の仲介に貢献するクリソタイル粒子凝集体の大きさ

クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子は図 16 のフローサイトメトリーによる解析結果からさまざまな大きさの粒子から構成されている。どの大きさのクリソタイル粒子が大腸菌の形質転換の仲介に貢献しているのか調べるために、クリソタイル溶液をさまざまな大きさのメッシュで濾過し、その濾過物を用いて大腸菌-クリソタイルけん濁液を調製し、弾性体曝露させて、形質転換頻度を調べた。表 1 に示すように、濾過なしクリソタイル溶液を用いた場合、形質転換頻度は $2.0 \times 10^7/\mu\text{g pUC18}$ であった。0.2-0.8 μm のメッシュで濾過したろ液を用いた場合、いずれの場合も形質転換は起こらないので、形質転換には 0.8 μm より大きいクリソタイル粒子が関与することを示している。フローサイトメトリー解析によれば、クリソタイル溶液中のほとんどのクリソタイル粒子は 2.76 μm 以下である。したがって 3.0 μm のメッシュで濾過しても、ほとんどの粒子はメッシュを通り抜け、形質転換頻度には影響を及ぼさないはずである。しかしながら形質転換は起こらないという結果であった。フローサイトメトリー解析結果では、2.7 μm より大きい粒子は痕跡程度しか存在しないはずであったにもかかわらず、形質転換に関与するクリソタイル粒子の大きさは 3 μm 以上であることを示唆している。5 μm メッシュ濾過クリソタイル溶液からは形質転換を導けず、10 μm メッシュ濾過クリソタイル溶液からは形質転換を導けたので、大腸菌のプラスミドによる形質転換には 6 μm 以上 10 μm 未満のクリソタイル凝集体が不可欠であるといえる。

クリソタイル凝集体の成長

クリソタイル粒子は水と屈折率が近いので、光学顕微鏡では識別が極めて困難である。クリソタイルの挙動を観察するために、クリソタイルの DNA を安定に吸着させる性質を利用して、FITC-DNA オリゴマーを吸着させたクリソタイル粒子を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

図 17 に示すように光学顕微鏡では巨大な凝集体以外のクリソタイルの識別は難しいが、蛍光顕微鏡では緑色の蛍光として粒子の識別が可能である。クリソタイルは単独の繊維としてクリソタイル溶液中に存在しているのではなく、複数個集まって凝集体を形成していることがほのめかされる。クリソタイル濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ では大きな凝集体は観察されない。クリソタイル凝集体の最大の大きさとして、クリソタイル濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ では約 7-8 μm 、250 $\mu\text{g/ml}$ では約 10 μm 、500 $\mu\text{g/ml}$ では約 40 μm 、1000 $\mu\text{g/ml}$ では約 70 μm の凝集体が観察された。クリソタイル濃度が高くなるに伴ってクリソタイル粒子間に分子間力が生じるのであろう。粒子は会合して凝集体を形成し、除々に大きく成長している。会合は物質間の距離に比例するので、濃度が高くなると、クリソタイルは互いに接触する確立が増し、会合する。反対に濃度が低くなると、粒子は分散傾向を示すと考えられる。フローサイトメトリー解析に用いたのは濃度が 2.5 $\mu\text{g/ml}$ となるよ

う希釈されたクリソタイル溶液である。それゆえ、クリソタイルの凝集はほどけていたと考えられる。その結果ほとんどの粒子は $2.7\mu\text{m}$ 以下となって現われたと考えられる。

フローサイトメーターによるクリソタイル凝集体の解析

フローサイトメータクウォンタを用いた解析によって、蛍光強度と粒子の大きさの関係が明確にされた。クリソタイル溶液を高性能フローサイトメーターにインジェクションし、粒子体積と蛍光を同時に測定した。図 18 のグラフは横軸をクリソタイルに吸着した DAPI の蛍光強度、縦軸を球換算したクリソタイル粒子直径として、粒子をドットプロットしたものである。蛍光強度 10 以下をバックグラウンドとした。蛍光強度 10 以上の粒子を DAPI ポジティブとし、これらは DAPI が吸着したクリソタイル凝集体群であると予想される。ポジティブの集団ではクリソタイル濃度が高い程大きな粒子の割合が増し (図 18A)、希釈する程サイズが小さくなる傾向が見られた。(図 18F)。DAPI ポジティブの集団を便宜的に 2 つの領域(グラフ上 R1, R2,)に分けた。2.6 μ メートル以上の粒子は R1, R2 の領域でカウントされている。表 2 は、R1 と R2 領域に入る 2.6 マイクロメートル以上の凝集体の割合を示している。2.6 マイクロメートル以上の凝集体はクリソタイル濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 4.55%、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 16.06%を占め、クリソタイル濃度が上がる程、2.6 μm 以上の凝集体の数が増えることを示している。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクリソタイル溶液中の粒子サイズについて 3 μm 以上は多く見積もっても 4.55%しか存在しない。しかしこの少ない大きな粒子はクリソタイルを仲介とした細菌の形質転換には重要で、弾性体の過程では 3 μm 以上の凝集体を一次粒子 (核) にして直径 50 μm に大きく成長していくと解釈できる。

弾性体曝露時のクリソタイル凝集体と大腸菌の相互作用

ゲル状の寒天は、糸状の分子がからみ合って網目状構造を作り、その間に多量の水分を包み込んでいる。したがってゲルの中に他の溶質を拡散させるときに、無機イオンや小さい分子は編み目をくぐって自由に拡散することができる。ナトリウムイオンのゲル中の拡散速度は水中での拡散速度とほとんど同一であることがわかっている。しかし比較的大型の分子または粒子のゲル中の拡散速度は遅いか、あるいは網目の大きさより大きな粒子であれば、粒子はまったく透過できない。弾性体曝露による大腸菌の形質転換は、寒天上の細胞-クリソタイル懸濁液の水分が寒天中にしみ込んでいく現象なくしてはけっして起きない。弾性体曝露の過程では細胞-クリソタイル懸濁液の水分のみ寒天中に拡散し、クリソタイル粒子は寒天の編み目を透過できない。したがって寒天表面ではクリソタイル粒子が補足され、濃度が高くなる環境が生みだされると予想される。図 19 に示すようにクリソタイルは濃度が高まると 6 μm 以上の凝集体 (核) を中心に凝集し、大きく成長しはじめる。クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子は図

19A に示すように大きな凝集体は見られない。弾性体曝露後の寒天表面には図 19C に示すように、FITC 由来の緑色の蛍光を放つ $50\mu\text{m}$ 以上の凝集体（2次粒子）が寒天表面に出現する。これらの結果は仮説を指示している。クリソタイル凝集体を拡大すると図 19E のように見えるはずである。クリソタイルはするどい針状構造をしているので、クリソタイル凝集体はとげの集まりであるといえる。この形状は栗のいがに似ている。大腸菌は青色蛍光タンパク質を発現しているので、細胞は励起波長として 365nm の波長を吸収し、青色の蛍光を放つ。弾性体曝露前は青い蛍光を放つ細胞は均一に分散している（図 19B）。曝露後はクリソタイルは寒天上で約 $50\mu\text{m}$ の凝集体を形成する。図 19D に示すようにクリソタイル凝集体は青色の蛍光を放っている。このことは大腸菌はクリソタイル凝集体に吸着していることを示している。クリソタイル凝集体は大腸菌由来の青色の蛍光を放っているのだ。

図 20 はクリソタイルはどのように大腸菌の細胞に突き刺さるのか説明している。X 軸は曝露時間を Y 軸は寒天表面の水分量を示している。細胞-クリソタイル懸濁液を $50\mu\text{l}$ を寒天表面上に滴下した直後は細胞もクリソタイルも分散している。この状態では非常に少ない数の $3\mu\text{m}$ 以上の粒子が存在しているはずである（図 20A）。弾性体曝露の操作は細胞-クリソタイル懸濁液に滑り摩擦力を与えることを含んでいる。細胞-クリソタイル懸濁液の水分は弾性体曝露によって寒天中にしみ込むので、発生する滑り摩擦力はしだいに大きくなる（図 20B）。水分量はしだいに減少しているように表現されている。その結果として寒天界面ではクリソタイル濃度が高くなる環境が生まれる（図 20C）。クリソタイルは濃度上昇にともなって、 $6\mu\text{m}$ 以上の凝集体を核にしていがぐりような凝集体へと成長していく。いがぐり状凝集体には大腸菌が容易に吸着することが確認された（図 19D）。最終的には $50\mu\text{m}$ 以上のいがぐり凝集体が生まれる（図 20E）。ストリークバーと寒天の界面に発生する滑り摩擦力が原動力となり、いがぐり凝集体を構成するクリソタイルは細胞に突き刺さり、細胞を破壊する。突き刺さった細胞の一部は破壊をまねがれクリソタイルに吸着したプラスミドを取込み抗生物質耐性に形質転換する。クリソタイルによる大腸菌の形質転換過程は遺伝子を植え付けるといいうイメージが相応しい。クリソタイルの細胞に対する毒性や変異原の考察の中には、クリソタイルの長さにもふれているものがあつたが、これまでクリソタイルの物性変化を考慮に入れた例はなかつた。クリソタイルのいがぐり凝集が及ぼす細胞への影響は大いに考慮すべきだろう。

弾性体曝露法を用いた細菌の新規形質転換法の確率

クリソタイルコロイド溶液にプラスミドを加えてクリソタイルに吸着させ、塩濃度を調整し、続いてプラスミド受容菌である大腸菌を分散させた（クリソタイループラスミドー大腸菌混合液）。この混合液を寒天等の弾性体中に滴下し、ポリスチレン製ストリークバーとの間に生じる滑り摩擦を与えると（弾性体曝露）、大腸菌は簡単にプラスミドによる形質転換を起し、抗生物質に耐性となった大腸菌コロニーが得られた。プラスミド受容菌としての大腸菌は液体培地による培養より、固形培地による培養の方が形質転換効率は高かった。形質転換効率が高くなるよう、いくつかの物理条件を検討したところ、クリソタイループラスミドー大腸菌混合液の濁度はOD550の値として2かまたはそれ以上が最適であった。ストリークバーにかかる垂直抗力は40g以上、弾性体の回転スピードは34rpm以上で高い形質転換効率が得られた。これらのパラメーターを最適に調整することにより形質転換効率は10の7乗のオーダーに達した。弾性体曝露による細菌の形質転換の利点はコンピテントセルの調製を必要としないことや、形質転換と培地への塗布が同時にできることである。弾性体曝露による遺伝子導入技術は大腸菌のみならず他のグラム陰性細菌にも適用できる。

要 約

大腸菌とクリソタイルを蒸留水中で混合し、その $50\mu\text{l}$ を 2% アガーロース上に滴下し、ポリスチレン製のストリークバーを弾性体に押し当てた。ストリークバーに常に一定の垂直抗力を与える装置を開発し、ストリークバーには 20–100g の垂直抗力が与えられた。この状態でアガーロースには回転運動が与えられ、アガーロース表面はストリークバーでこすり続けられ、すべり摩擦力が与えられた。この操作を弾性体曝露と命名した。定常期の大腸菌細胞とプラスミド (pUC18) とクリソタイルを混合し BL 寒天培地上にて弾性体曝露させると、細胞はプラスミドを取り込んで抗生物質耐性に形質転換することを見出した。形質転換効率が最も高いのは曝露時間が 6 秒以上、寒天濃度が 2%、NaCl 濃度が 200mM の時であった。37°C で培養した細胞を用いるよりも、30°C で培養したそれを用いる方が効率は 10 倍高かった。様々な条件を検討した結果、最終的には $1\mu\text{g}$ の pUC18 あたり 10^6 個のオーダーで形質転換体が得られた。クリソタイルを介した大腸菌の形質転換は寒天培地表面にて 20 秒以下という短時間の乾燥という急激な物理的变化が必要である。

大腸菌 10^7 個オーダーをクリソタイルとともに 200mM NaCl 溶液に懸濁させ、2% 寒天培地上で弾性体曝露させ、その生存細胞をコロニーフォーミングユニットとして求めると、曝露時間が長くなるに従って生存菌数は漸次減少し、120 秒の曝露後、生存菌数は 10^4 個オーダーに減少した。曝露時間 120 秒と比較すると、クリソタイル懸濁細胞の方がクロシドライト懸濁細胞よりも生存細胞の減少は大きかった。寒天濃度が 0.5% の LB 培地上での 120 秒間の曝露においては生存細胞数の減少は起こらなかった。またクリソタイル濃度が高い程、弾性体曝露細胞の生存菌数は減少した。一方 *Bacillus subtilis* をクリソタイルとともに弾性体曝露させた場合、その生存菌数の減少は見られなかった。細胞内に β ガラクトシダーゼを発現した大腸菌をクリソタイルとともに弾性体曝露させ、細胞外に放出された酵素活性を測定した所、曝露時間が長くなるに従って、細胞外に放出される酵素量は増大した。クリソタイルとともに弾性体曝露させた大腸菌の走査型および透過型電子顕微鏡観察によるとクリソタイルがミサイルのように細胞膜に突き刺さっている様子を捕らえることができた。これらの実験結果からグラム陰性細菌をクリソタイルとともに弾性体曝露させると、クリソタイルが細菌細胞に突き刺さり、細胞が破裂することを意味している。生存菌数は曝露時間の増大に伴って減少し、水分含量の高い寒天における曝露では生菌数の減少は見られないことより、クリソタイルが細胞に突き刺さる推進力は摩擦力 (sliding friction force) (Tribos shock) であると言える。クリソタイルが大腸菌の形質転換を仲介するのは、pUC18 を吸着したクリソタイルが細胞を穿刺し、破裂にいたる中間体のうち破裂をまぬがれた細胞が分裂を繰り返し形質転換が成立したと解釈できる。

弾性体曝露における大腸菌とクリソタイルの相互作用を明らかにし、クリソタイルの仲介に

よる大腸菌の形質転換機構をさらに明確にした。クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子の分散はフローサイトメトリーにて調べた。また Blue fluorescence protein を発現する大腸菌をクリソタイルとともに弾性体曝露させた。クリソタイルには FITC がコンジュゲートした 26mer の DNA を吸着させ、弾性体曝露時の形態変化を蛍光顕微鏡で調べた。クリソタイルは濃度が高まると凝集体を形成し、大きく成長することがわかった。曝露時間の経過にともなって、大腸菌－クリソタイルけん濁液の水分は寒天中へ浸透していくのでクリソタイル濃度が寒天表面上で上昇する環境が生まれる。寒天上ではクリソタイル凝集体は直径 50 μ m 以上に成長し、あたかもいがぐりのような形態を示すようになる。同時にこのいがぐり凝集体は大腸菌を付着させ、水分の寒天中への浸透にともなって増大する寒天とストリークバーの界面に生じる滑り摩擦力によって、クリソタイルは細胞に突き刺さると考えられる。この時にプラスミドをクリソタイルの表面に付着させておくと、大腸菌はプラスミドを取込んで形質転換する。クリソタイルが大腸菌の形質転換を仲介する現象は、遺伝子を接種する（植え付ける）といったイメージがふさわしい。

表1 それぞれの大きさのメッシュにてろ過したクリソタイル溶液の大腸菌形質転換の仲介効果

Filteration treatment	Transfomation efficiency ²⁾ (cfu/ μ g pUC18)
Mesh size ¹⁾ (μ m)	
0.2	ND ³⁾
0.5	ND
0.8	ND
3.0	ND
5.0	ND
10	1.2×10^6
20	2.3×10^6
30	1.1×10^6
Non	2.0×10^6

1) Filters was made from various material described in Material and Method section.

2) Represented the mean of three independent experiments.

3)Not detected.

表2 それぞれのクリソチール濃度における、2.6 μm 以上の粒子の占める割合

Chrysothile conc. ($\mu\text{g/ml}$)	R1 ¹⁾ Proportion ²⁾ (%)
500	16.1
333	9.42
250	8.72
167	5.58
100	4.55
50	2.52

1) R1 represents an area shown in Fig.3.

2) The population of DAPI-positive (Fluorescence intensity >10) was totally shown as 100%.

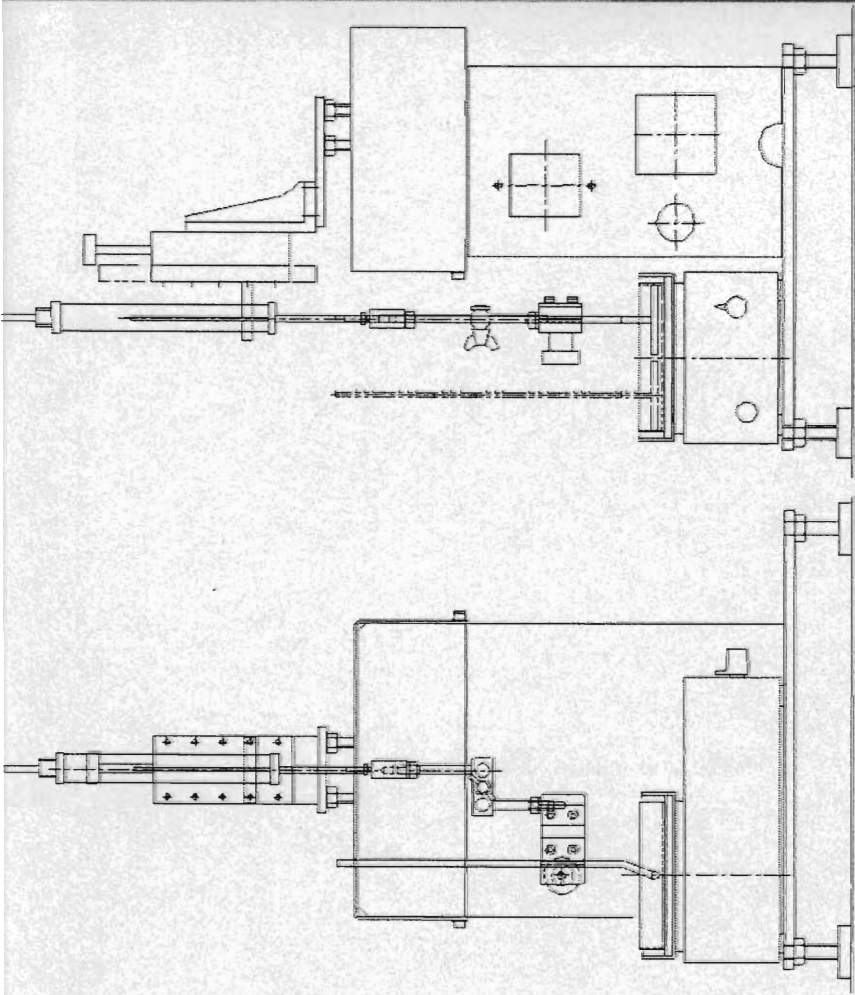
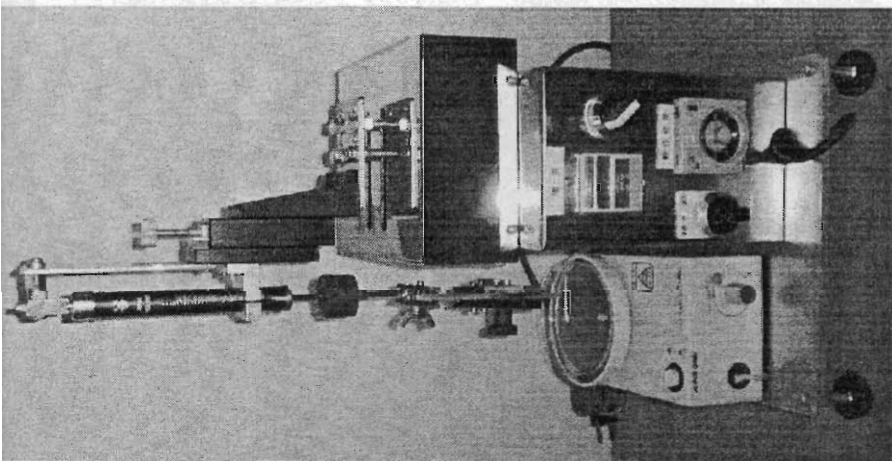


図1 寒天に常に一定の力が加わるよう開発した装置（トリボスプロバイダー）の設計図と概観。寒天培地はターンテーブルに置かれる。aは精密バネ計りであり、1目盛り10gで最大測定重量は500gである。バネばかりの先端には200gの錘が固定されている。bの部分にストリークバーcを取り付け寒天培地に押し付ける。バネばかり全体は上下に垂直移動が可能であり、その位地を変動させることによりストリークバーの寒天への垂直抗力を調節することができる。位置を下げる程寒天には大きな垂直抗力が加わることになる。ストリークバーの寒天への垂直抗力が一定の状態、ターンテーブルは等速回転する。ストリークバーは左右に運動し、二秒で1往復する。

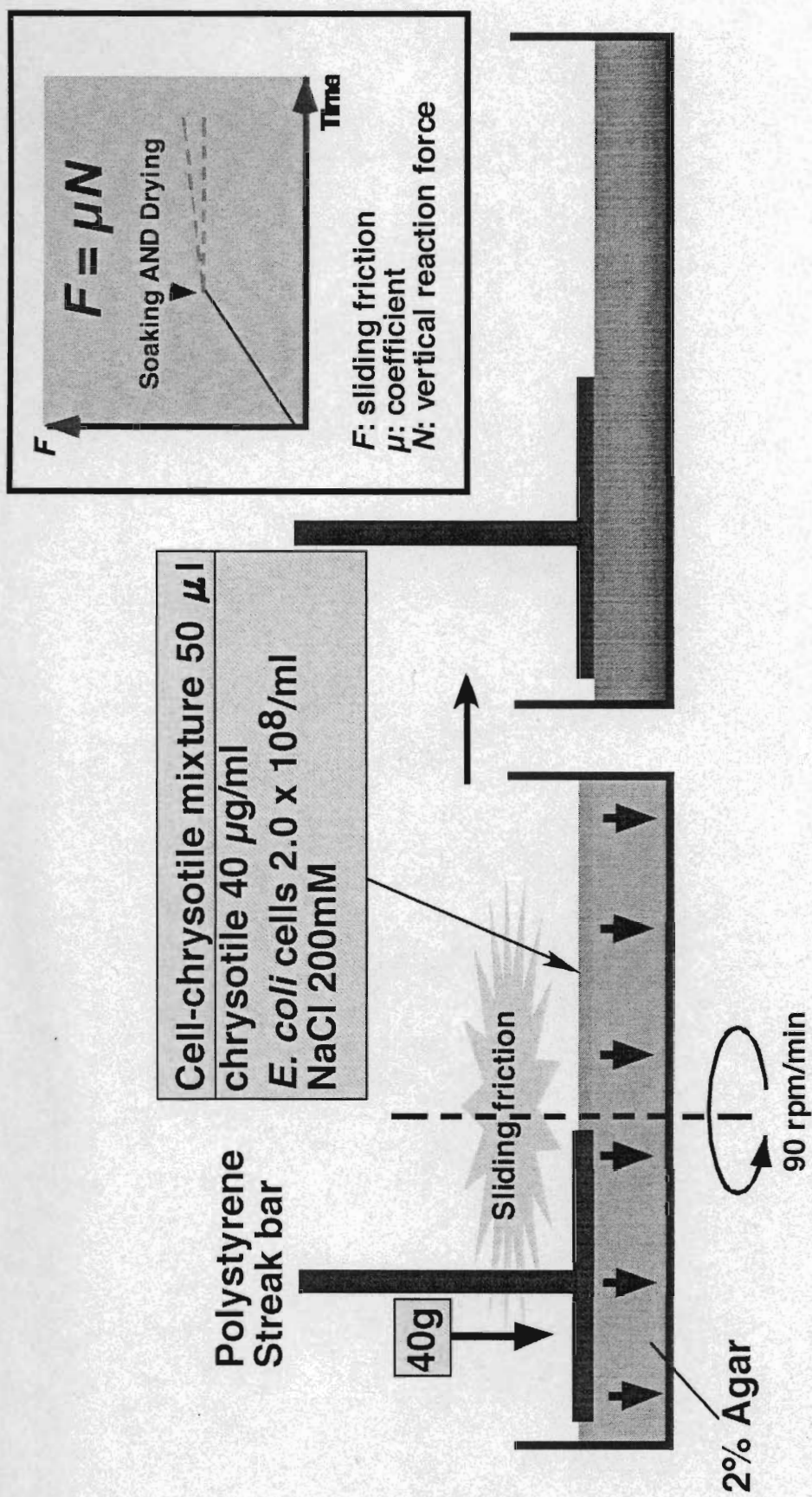


図2 寒天培地をトリボスプロバイダーのターンテーブルに置き、ストロークバーを垂直に寒天表面におしあて、垂直抗力を40gとして、90rpmの回転運動を与えた時の物理変化を示す。

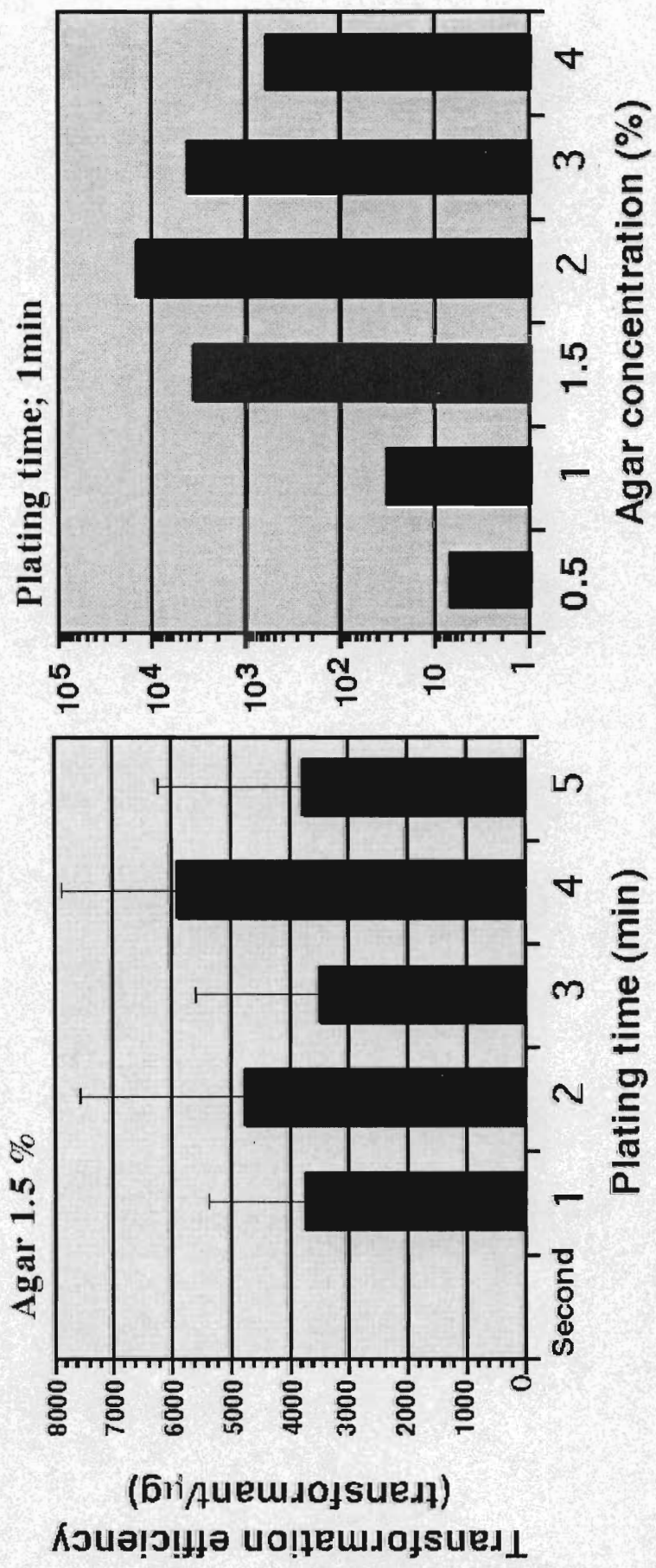


図3 (左) 弾性体曝露時間の形質転換効率に及ぼす影響。大腸菌はLB液体培地で18時間培養した細胞を用いた。寒天濃度は1.5%でx軸に示された時間で弾性体曝露を行った。グラフの値はそれぞれ独立した9回の実験の平均値を表している。

図4 (右) 弾性体曝露時の寒天濃度の形質転換効率に及ぼす影響。大腸菌はLB液体培地で18時間培養した細胞を用いた。x軸に示された値の寒天を含むLB培地表面で60秒間弾性体曝露を行った。それぞれの値は独立した6回の実験の平均値を表している。

Surface moisture on plate (μ)

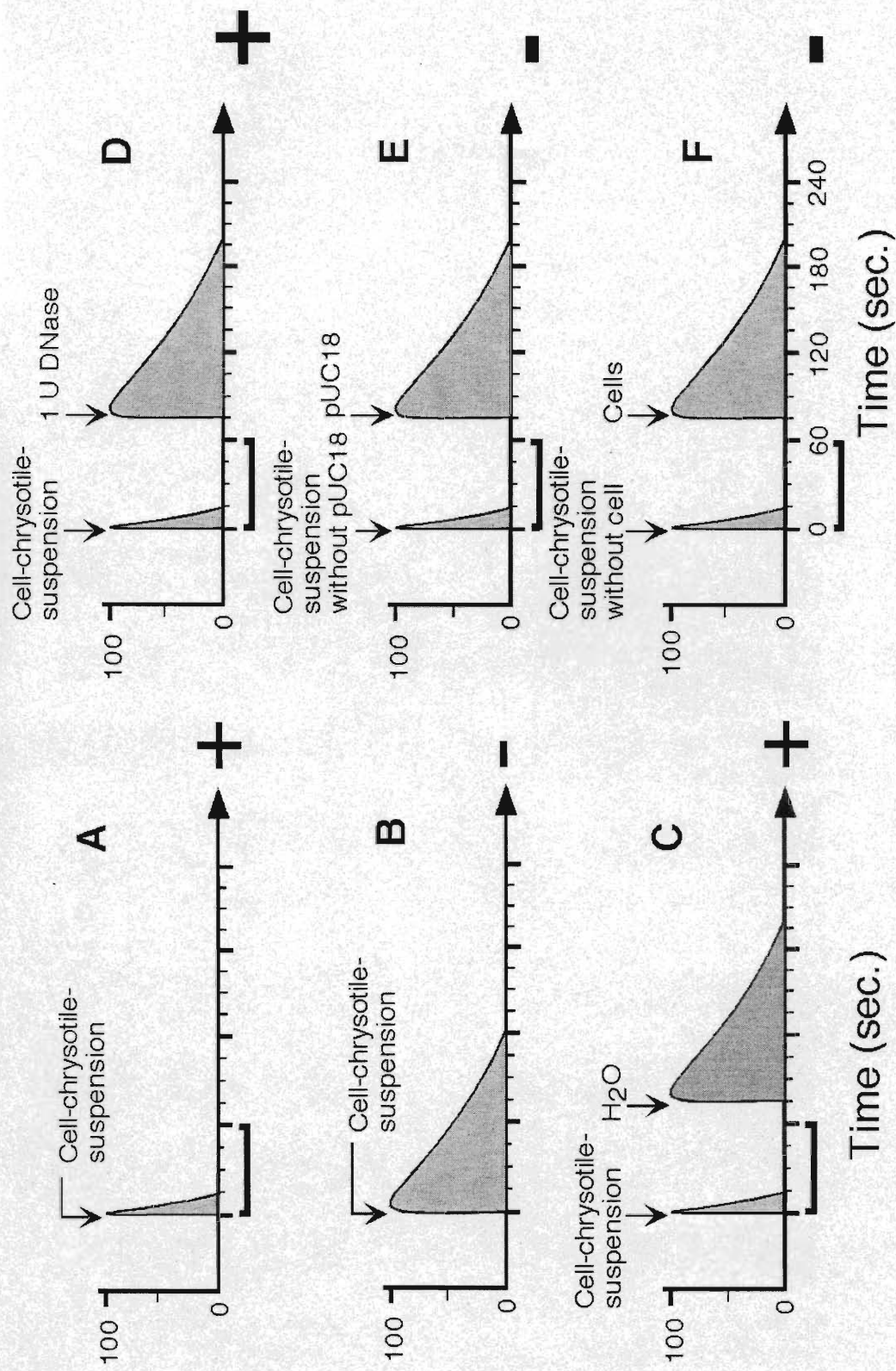


図5 大腸菌細胞、クリソチル、pUC18を含む混合液をプレートに50 μ l滴下したときの時間経過を横軸に、培地表面の水分含量を縦軸にとり、培地表面の物理変化を模式的に示した。大腸菌はLB液体培地で18時間培養した細胞を用いた。寒天濃度は1.5%である。弾性体曝露時間は60秒間である。弾性体曝露時間で示されている。+はそれぞれ形質転換の成功、不成功を示している。

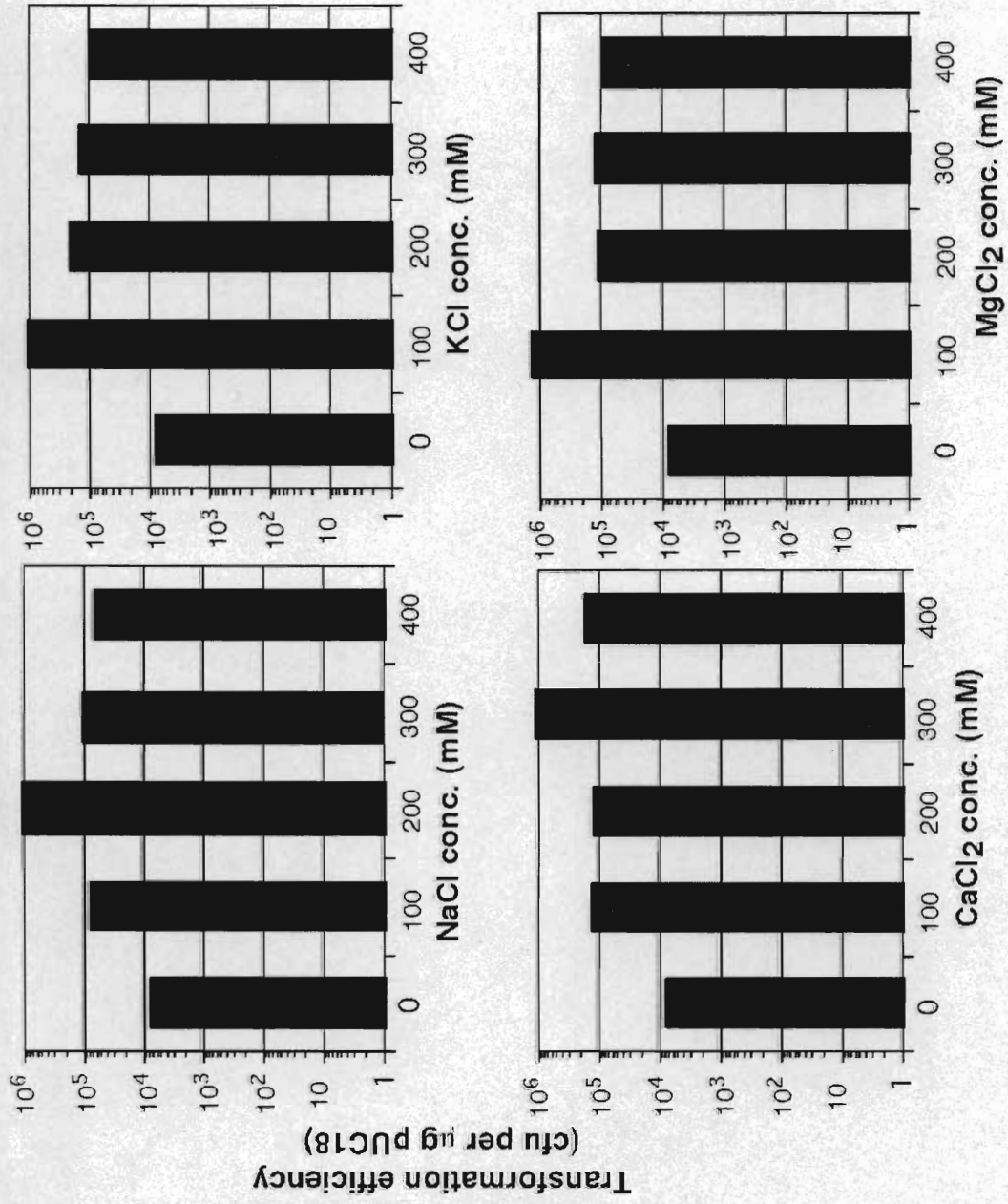
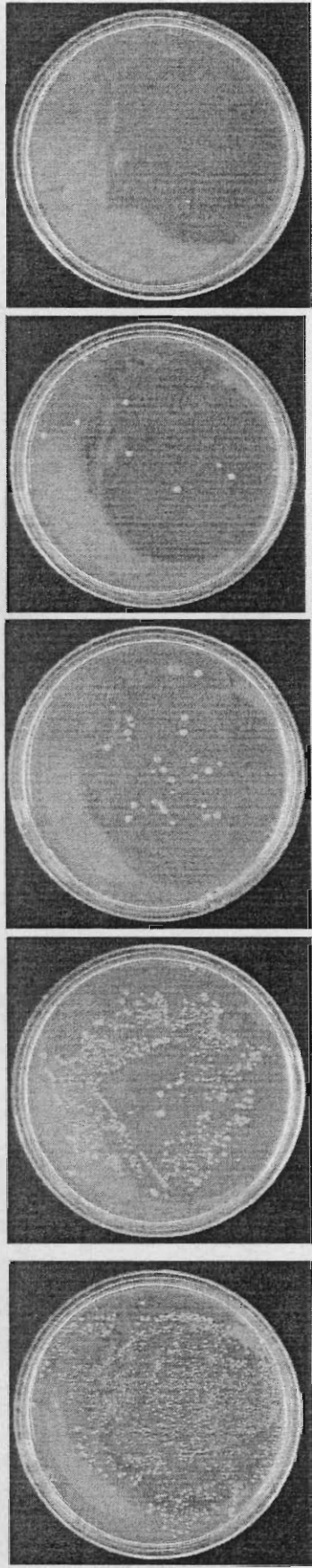


図6 細胞-プラスミド-クリソタイル混合液に含まれる2価イオンの形質転換効率に及ぼす影響。大腸菌はLB液体培地で18時間培養した細胞を用いた。2価イオン最終濃度がグラフに示した値となるように混合液に加え、60秒間弾性体曝露を行った。培地の寒天濃度は2%である。それぞれの値は独立した3回の実験の平均値である。

Dilution to 10^4



Dilution to 10^2



図7 弾性体曝露後、培地に形成されるコロニーの減少現象。大腸菌とクリソタイルを混合し、その $50\mu\text{l}$ をLB寒天培地に滴下し、図に示した時間にわたって弾性体曝露に供した。初期菌濃度は $6 \times 10^2/\text{ml}$ 、Aは10000倍に希釈、Bは100倍に希釈した大腸菌培養液を使用した。

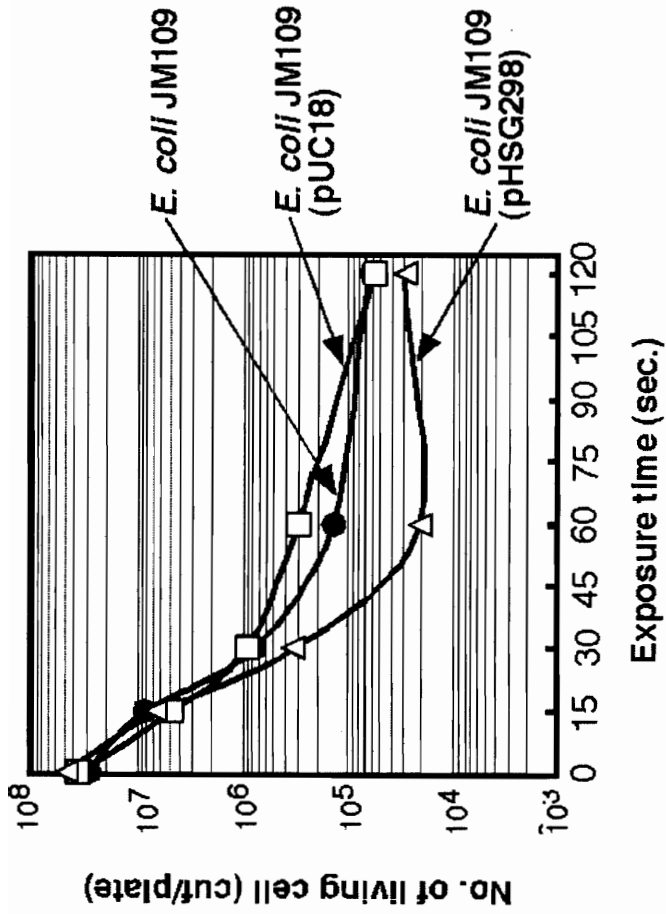
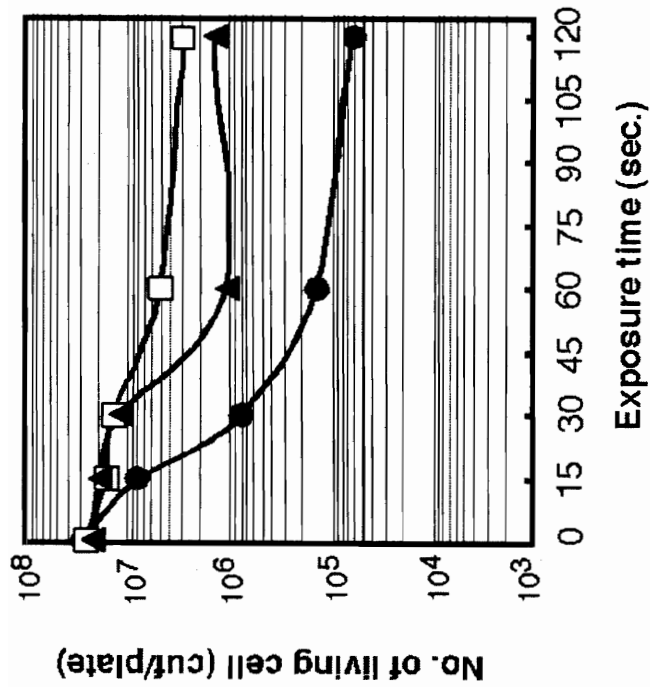


図8 (左) 大腸菌を弾性体曝露に供した際の生存菌数の減少
大腸菌はそれぞれクリソライト、クロシドライト、アモサイトとともに混合されコロイド溶液化された。コロニー数は3
回の独立した実験の平均値とした。

図9 大腸菌-クリソライトコロイド溶液を抗生物質を含む培地上にて、弾性体曝露に供した際の生存菌数の減少
(●) 大腸菌を寒天培地にて弾性体曝露させた。(□) 大腸菌 (pUC18) を 50 μg/ml のアンピシリンを含む寒天
培地上にて弾性体曝露させた。(△) 大腸菌 (pHSG298) を 50 μg/ml のカナマイシンを含む寒天培地上で弾性体曝露さ
せた。コロニー数は3回の独立した実験の平均値とした。

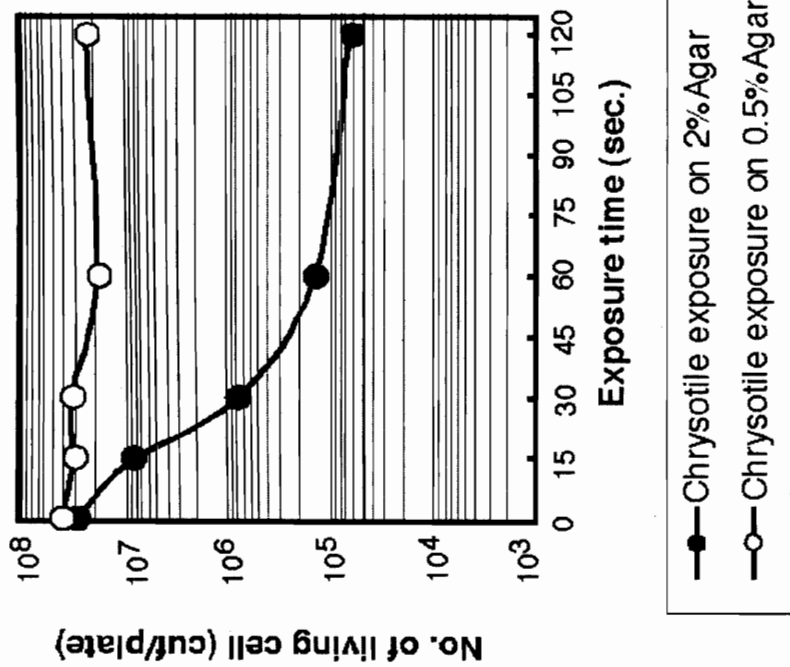
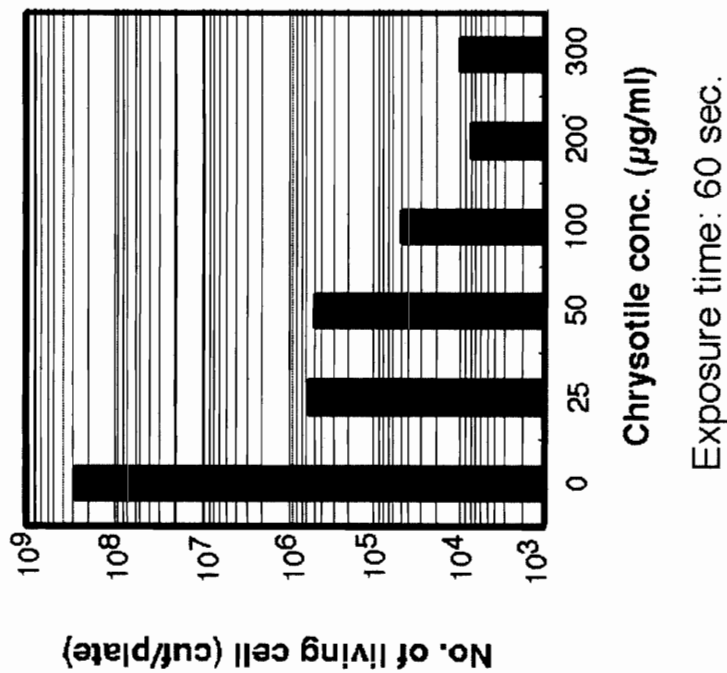


図10 寒天濃度の弾性体曝露後の大腸菌の生存に及ぼす影響
 (○) 寒天濃度0.5%、(●) 2.0%

図11 大腸菌-クリソチルコロイド溶液のクリソチル濃度が大腸菌の生存に及ぼす影響。曝露時間は60秒とした。コロニー数は3回の独立した実験の平均値とした。



Chrysothile conc. (μg/ml)
 Exposure time: 60 sec.

Bacillus subtilis

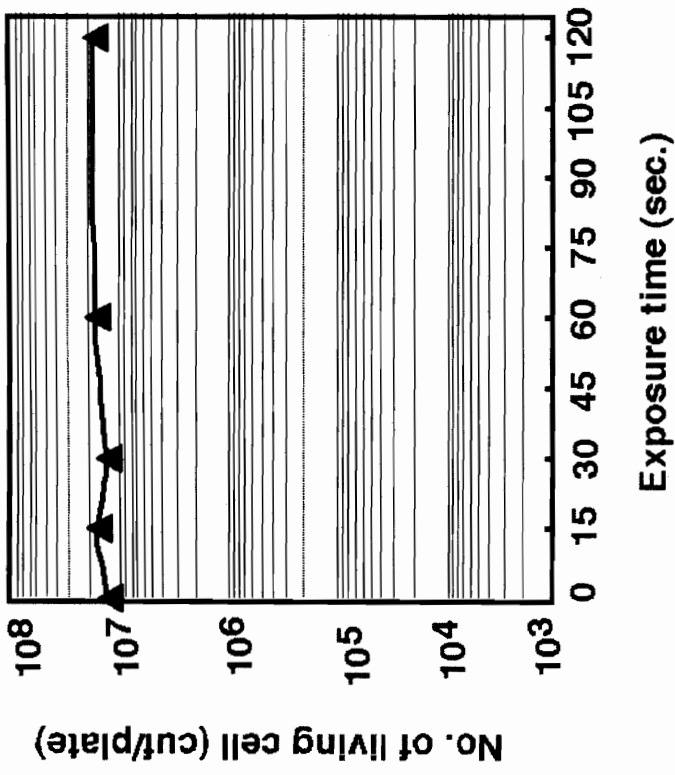
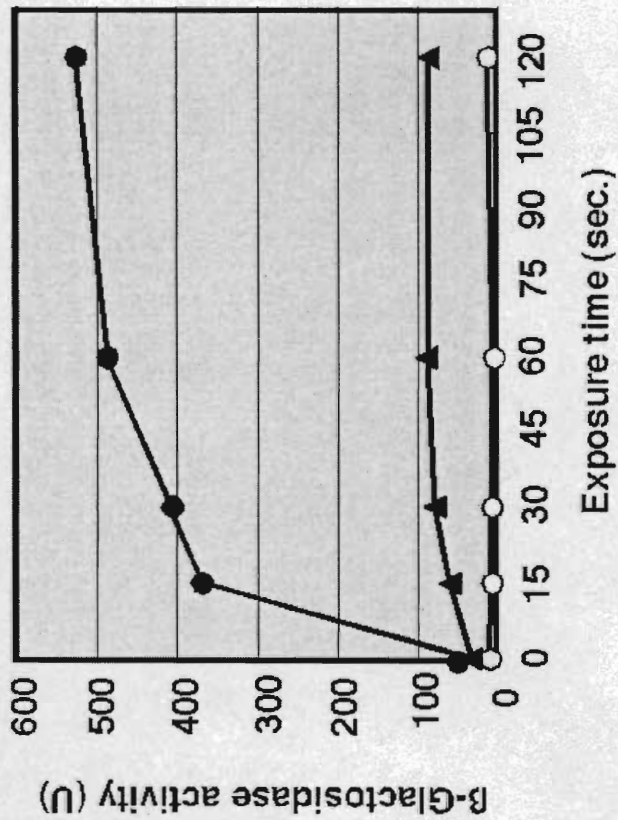


図12 大腸菌の弾性体曝露と同様の方法で、バチルスを弾性体曝露に供し、プレートに形成されるコロニーをカウントした。コロニー数は3回の独立した実験の平均値とした。



- *E. coli* JM109(pUC18) exposed to chrysole
- ▲ *E. coli* JM109(pUC18) exposed to Na-saline
- *E. coli* JM109(No plasmid) exposed to chrysole

図13 弾性体曝露にともなう細胞破裂によって溶出されるβ-ガラクトシダーゼ
 (○) 大腸菌JM109、(●) 大腸菌JM109 (pUC18) 酵素誘導条件、(▲) 大腸菌JM109 (pUC18) 酵素非誘導条件

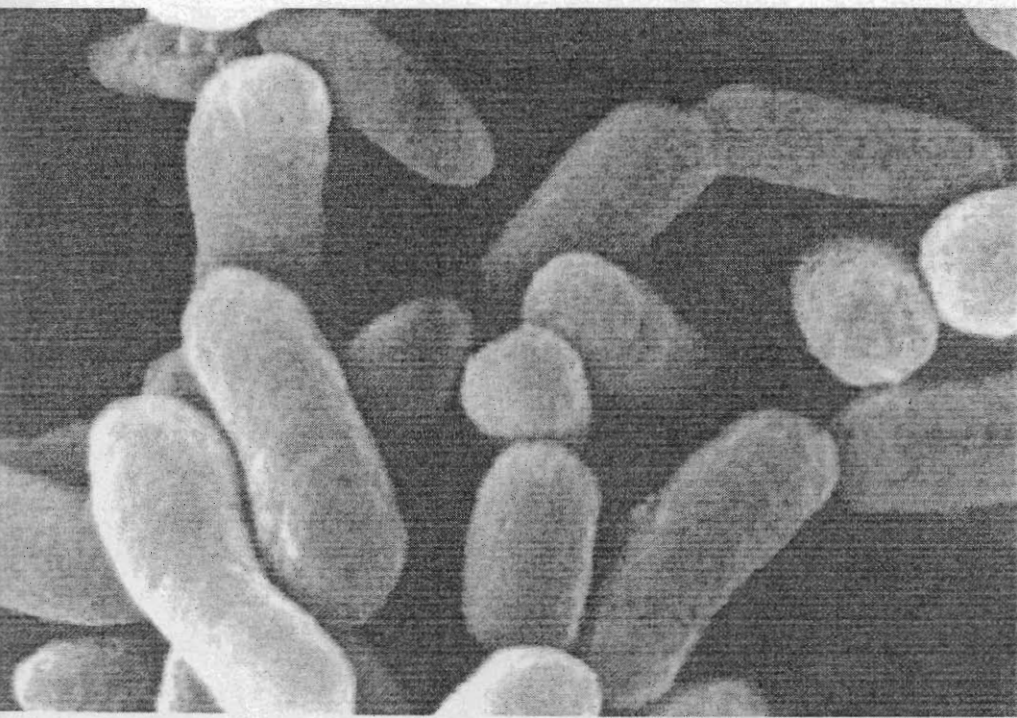
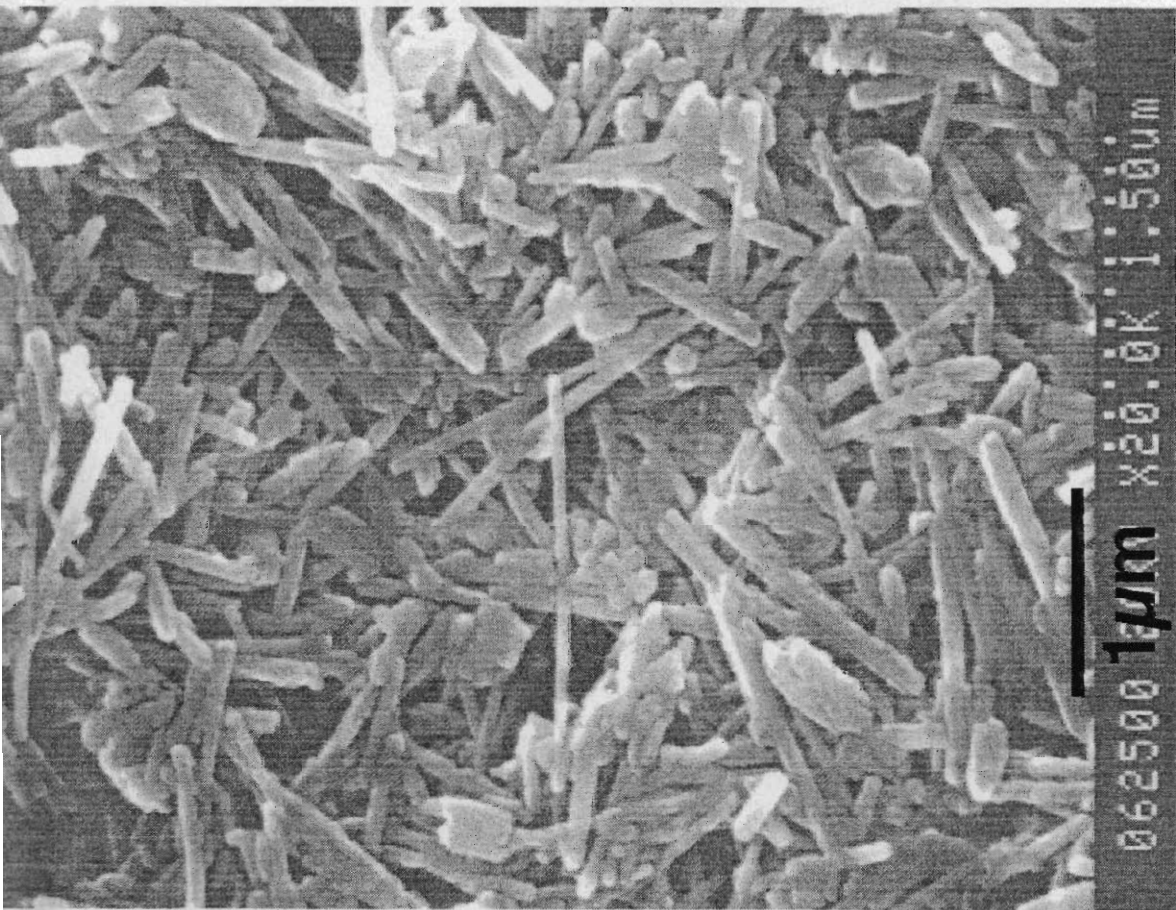


図14 大腸菌 (左) とクリソタイル (右) の操作型電子顕微鏡写真

クリソタイル溶液を10000g 30分間遠心し、沈殿物を集めて乾燥させた。大腸菌はLB液体培地にて、37℃で18時間培養した。大腸菌、クリソタイルともに白金-パラジウムにてスパッタリングされた。

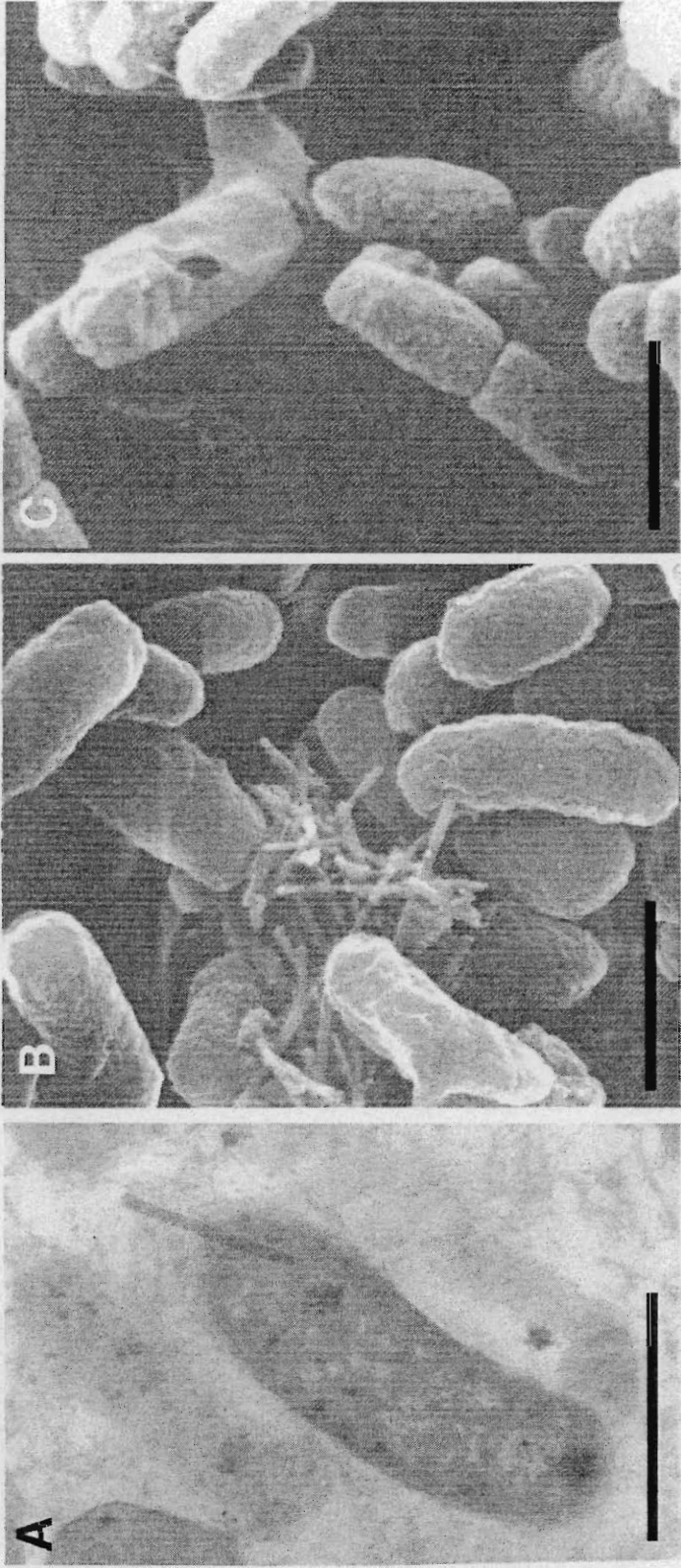


図15 クリソタイルとともに弾性体曝露させた大腸菌の透過型 (A) および走査型 (B) (C) 電子顕微鏡写真

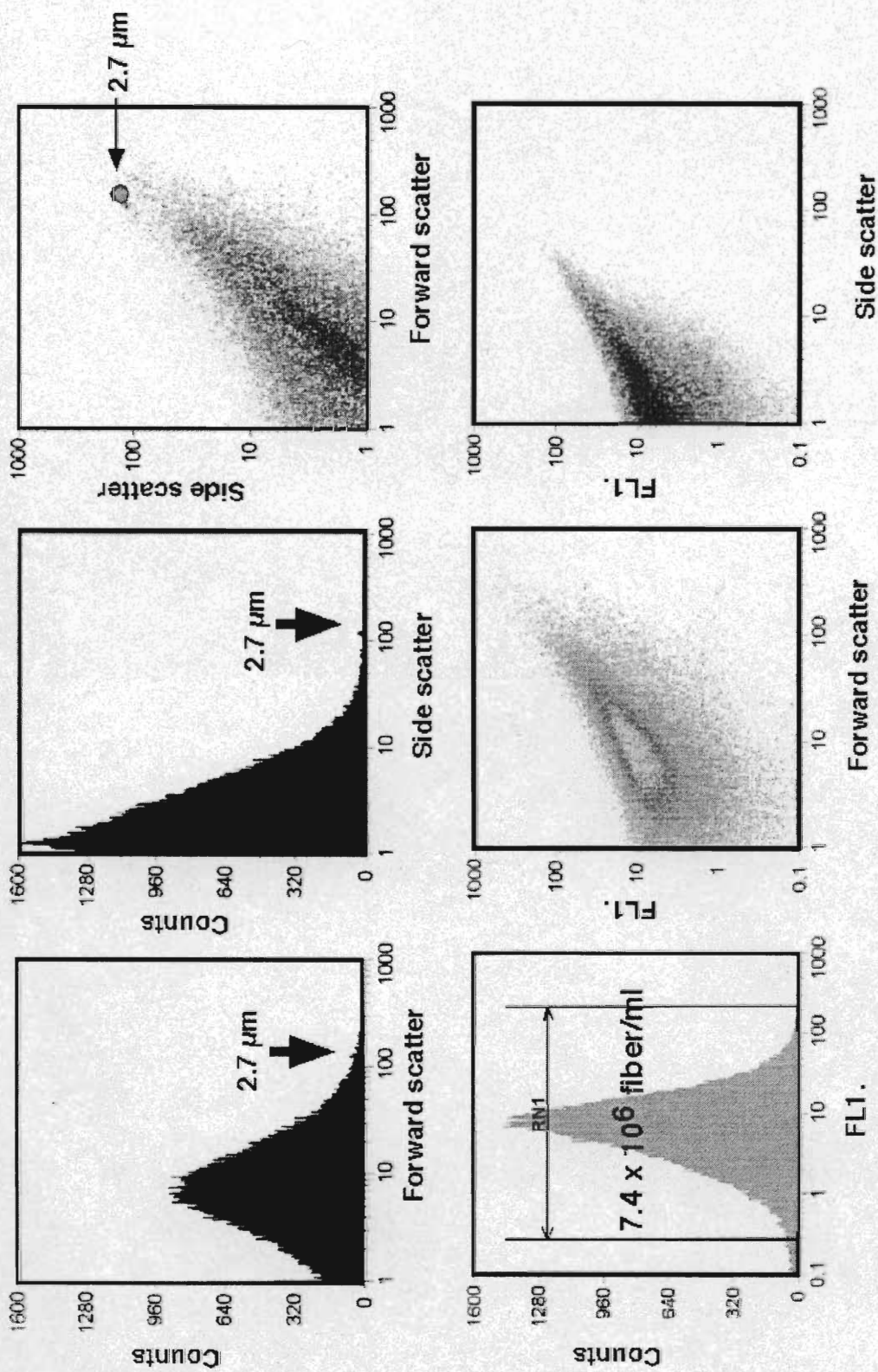


図16 クリソタイル溶液中のクリソタイル粒子のフローサイトメーターによる解析
矢印は $2.62 \mu\text{m}$ のピーズの大きさを反映する位置を示している。前方散乱光は物体の大きさ、側方散乱光は物体の形態
や内部構造を反映する。

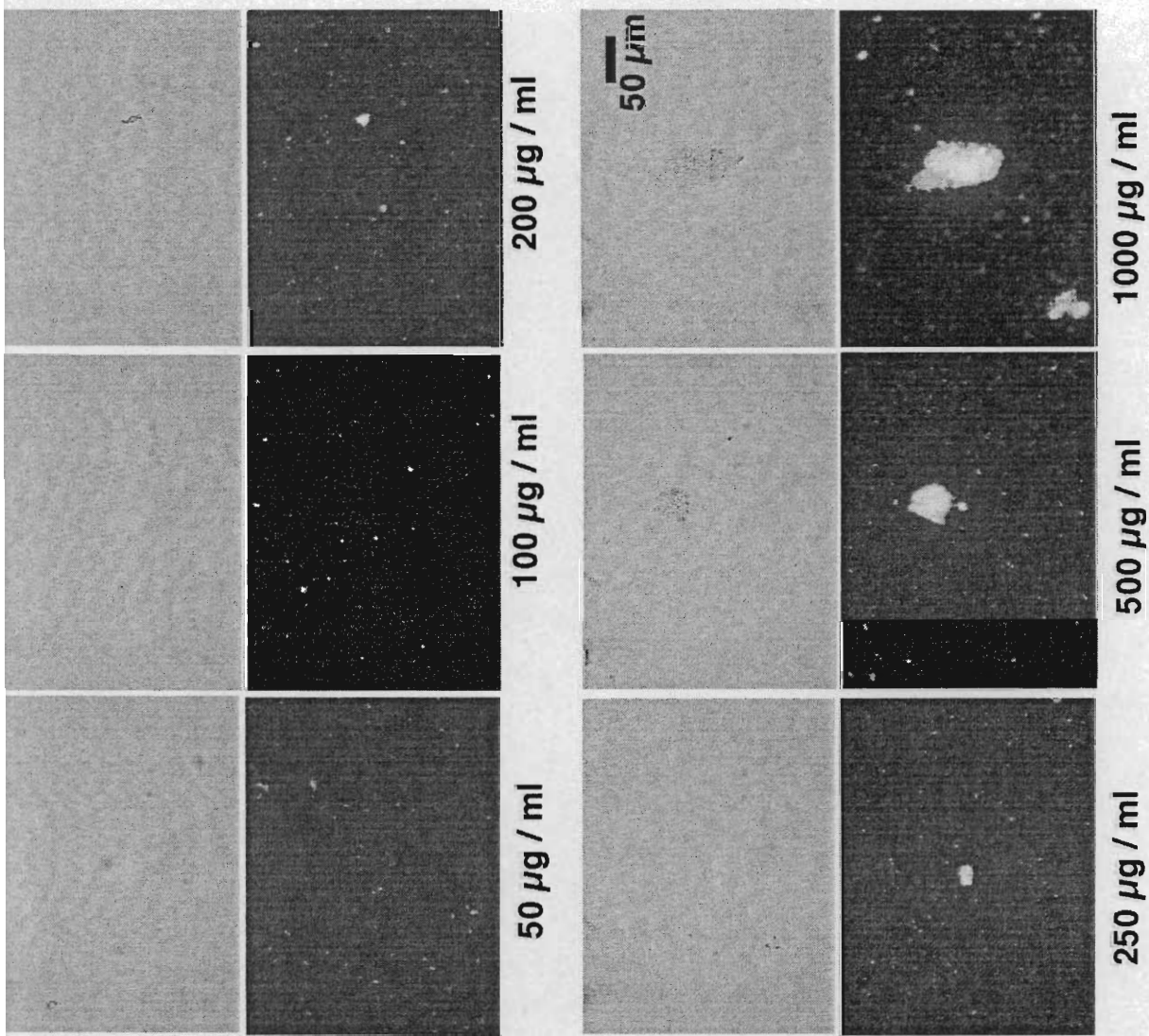


図17 クリソタイル濃度の上昇にもなつて成長するクリソタイル凝集体。数字は蒸留水中のクリソタイル濃度を示す。写真上部は可視光、下部はそれに対応する蛍光顕微鏡画像である。

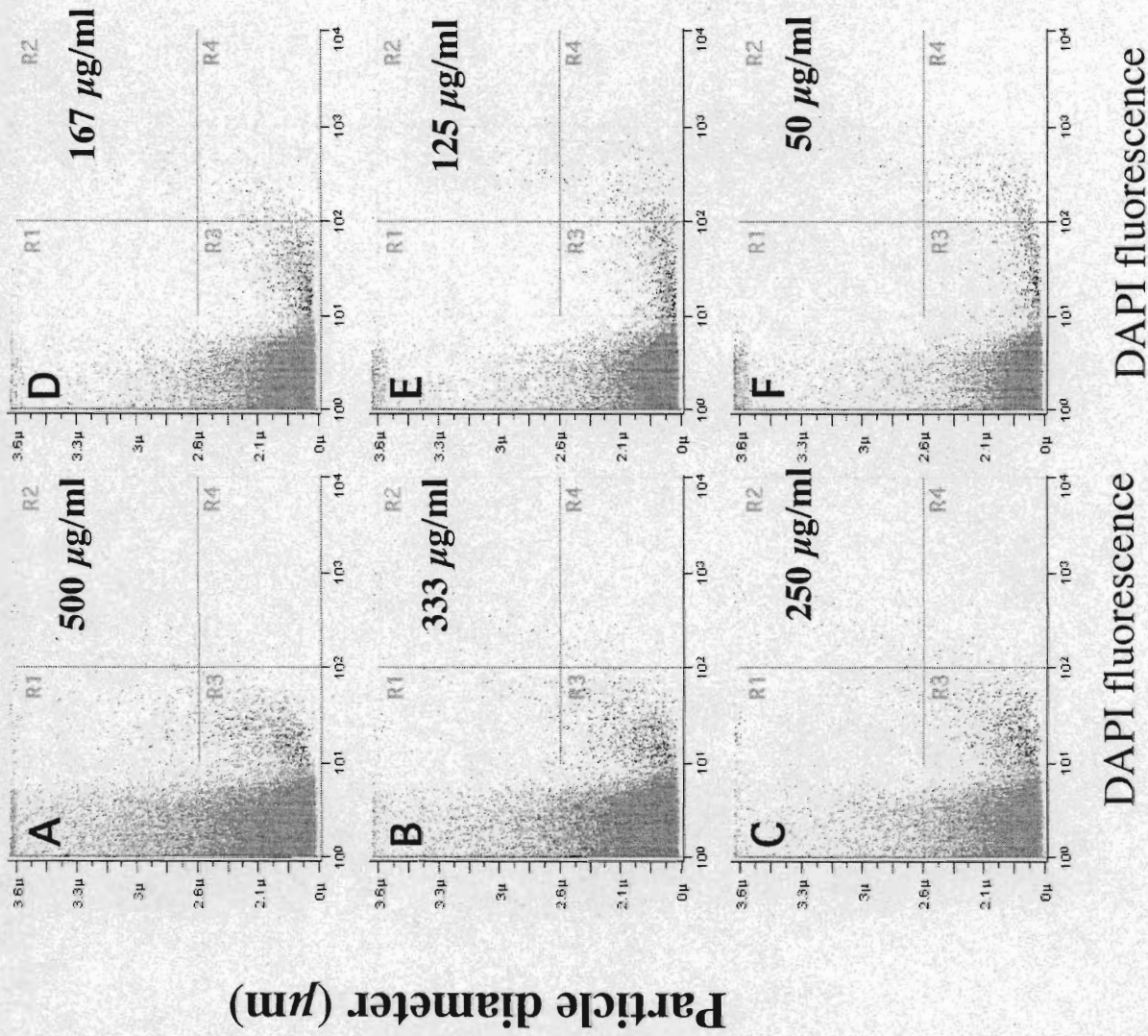
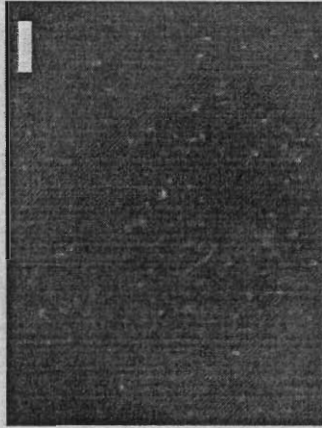
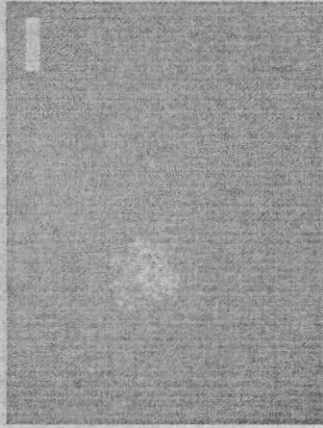


図18 フローサイトメータ (クウォンタ) を用いたクリソタイル凝集体の粒度サイズ解析。粒子直径対DAPI蛍光強度のサイトグラムを示す。クリソタイル溶液 (1 mg/ml) をオリジナルとし、シース液で2-20倍に希釈したものを用いた。クリソタイル濃度は; (A) 500 $\mu\text{g/ml}$; (B) 333 $\mu\text{g/ml}$; (C) 250 $\mu\text{g/ml}$; (D) 167 $\mu\text{g/ml}$; (E) 100 $\mu\text{g/ml}$; (F) 50 $\mu\text{g/ml}$.

Before



Chrysothile (25 μg) was mixed in distilled water with 500 pmol of FITC labeled 26 mer oligonucleotide



Chrysothile (25 μg) was mixed in water with 5.4×10^5 cells of *E. coli* (DE3) (pBQB167) expressing blue fluorescent protein, and then observed by microphotometer. Chrysothile concentration was 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Cell-
chrysothile
exposure



After



Chrysothile (25 μg) was mixed in distilled water with 5.4×10^6 cells of *E. coli* (DE3) (pBQB167) expressing blue fluorescent protein, and then observed by microphotometer

図19 弾性体曝露前後のクリソタイルと青色蛍光タンパク質を発現する大腸菌の相互作用
(A)クリソタイル溶液中のクリソタイル、(B)細胞-クリソタイル混合溶液中の大腸菌、(C)弾性体曝露後の寒天表面におけるクリソタイル、(D)弾性体曝露後において、クリソタイル凝集体に吸着している大腸菌、(E)クリソタイル溶液中のクリソタイルの走査型電子顕微鏡写真

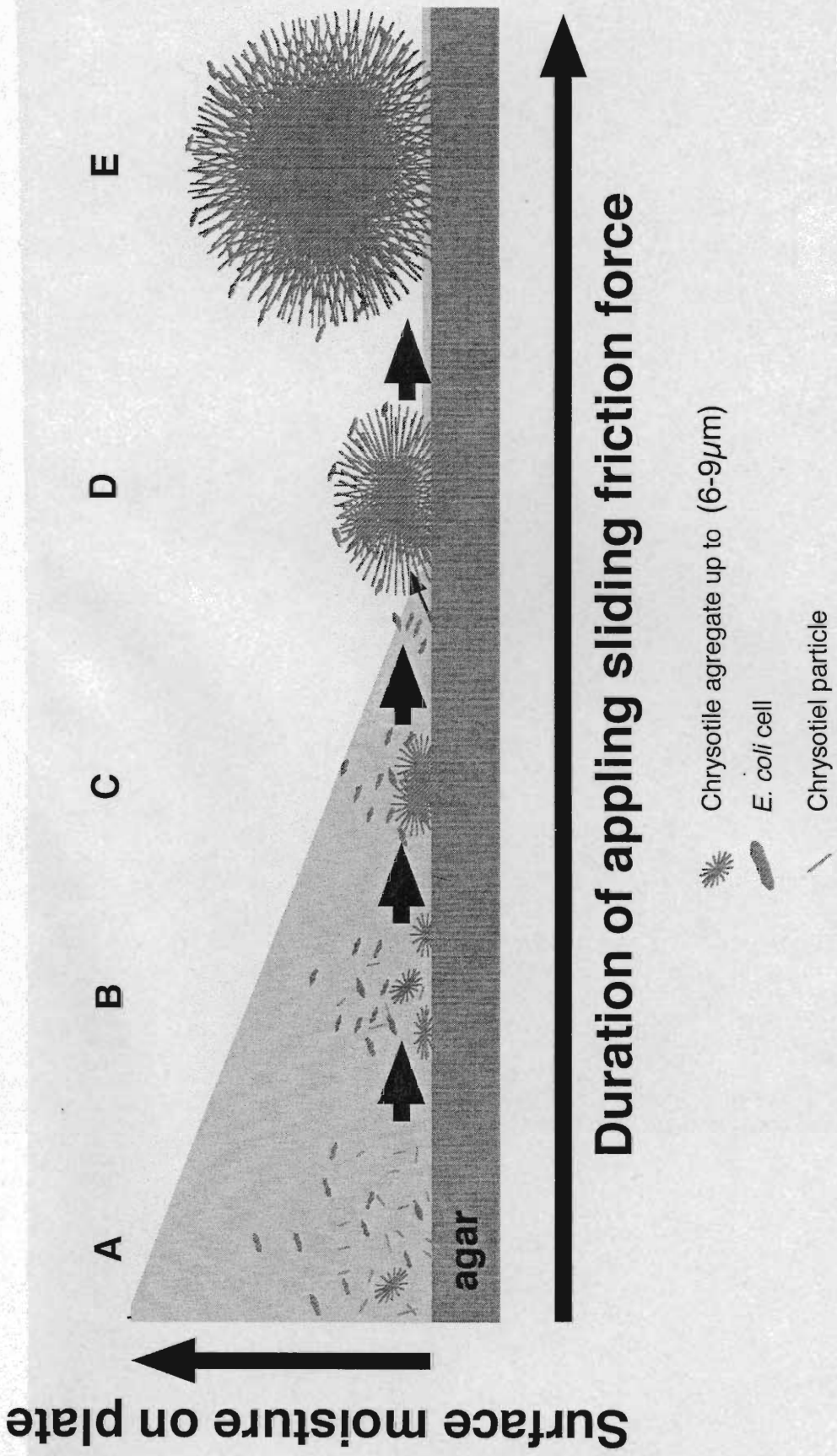


図20 弾性体曝露時のクリソチルの挙動と大腸菌との相互作用を示した予想図