

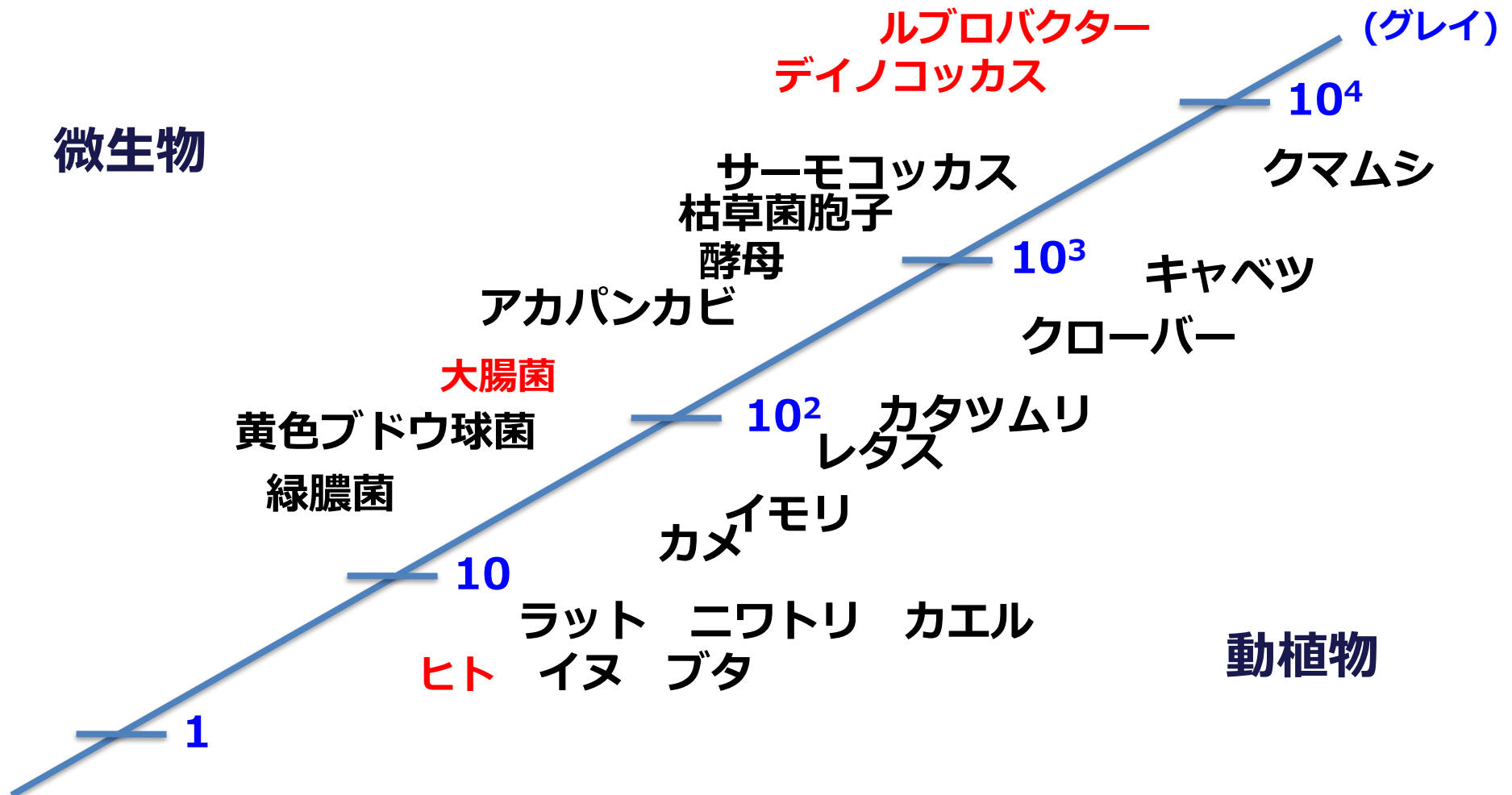
極限環境微生物を用いた 有用物質生産と環境浄化

東洋大学 生命科学部 生命科学科
教授 鳴海 一成

2023年8月29日

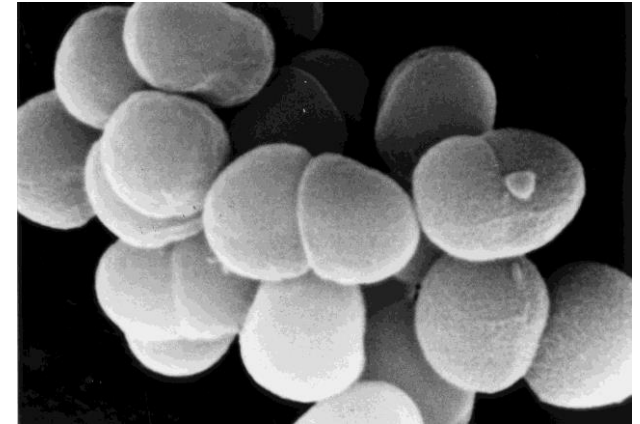
生物の放射線耐性の違い

半数が生き残る放射線の強さ



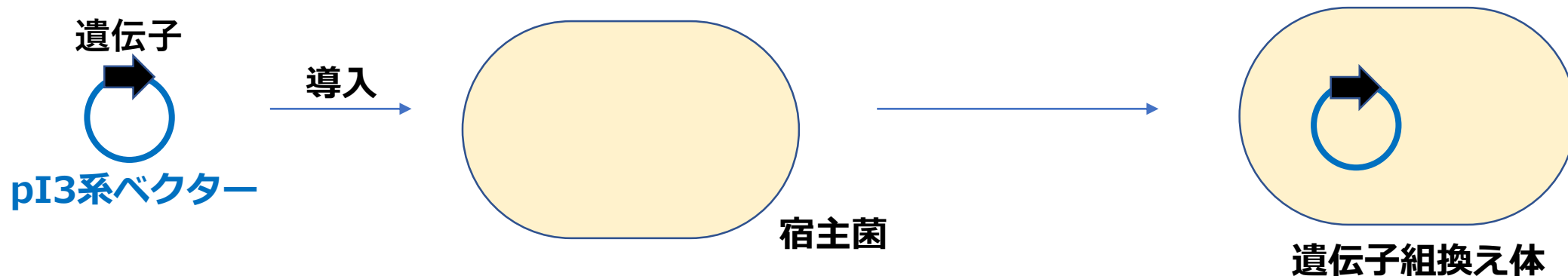
Deinococcus radiodurans

- 1956年にアメリカで分離された*Deinococcus*属細菌
オレゴン州農業試験場
牛肉の缶詰から分離 (1956年)
標準株はR1株 (ATCC 13939)
- 四連球菌
- 生育至適温度が30℃の中温菌
- ゲノム配列解読済み (1999年 TIGR : 3.3 Mbp)
- ポリプロイド(細胞あたり4~10 コピーのゲノム)
- 自然形質転換能を持つ
- 遺伝子操作系が確立済み



遺伝子組換えダイノコッカス・ラジオデュランズを用いた高放射線環境下でのバイオレメディエーション

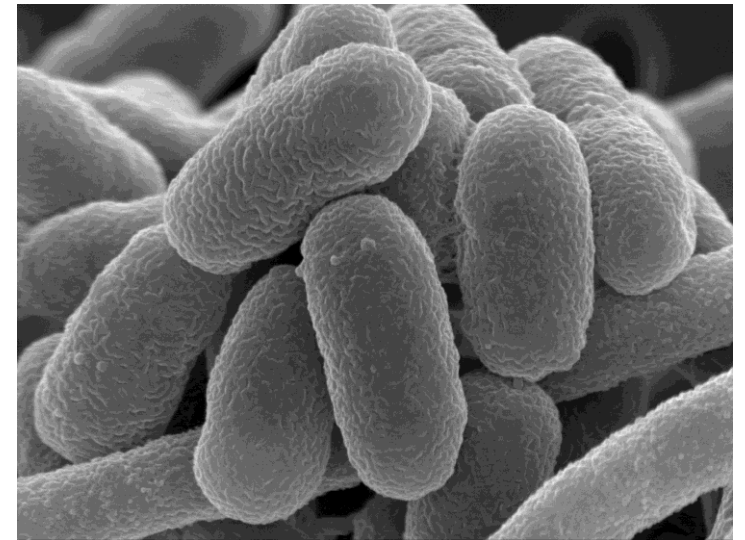
トルエンジオキシゲナーゼ遺伝子 → 難分解性の有機溶剤トルエンを分解
2価水銀イオン還元遺伝子 → 毒性の少ない揮発性金属水銀に還元
フォスファターゼ遺伝子 → 硝酸ウラニル溶液からウランを沈殿
エンドグルカナーゼ遺伝子 → セルロース系廃棄物を分解
メタロチオネイン遺伝子 → カドミウム蓄積能を向上
ニッケル/コバルトトランスポーター遺伝子 → 放射性コバルトを除去



ベクタープラスミドは、ダイノコッカス・ラジオデュランズ-大腸菌シャトルベクターpI3およびその派生プラスミドに限定

Deinococcus grandis

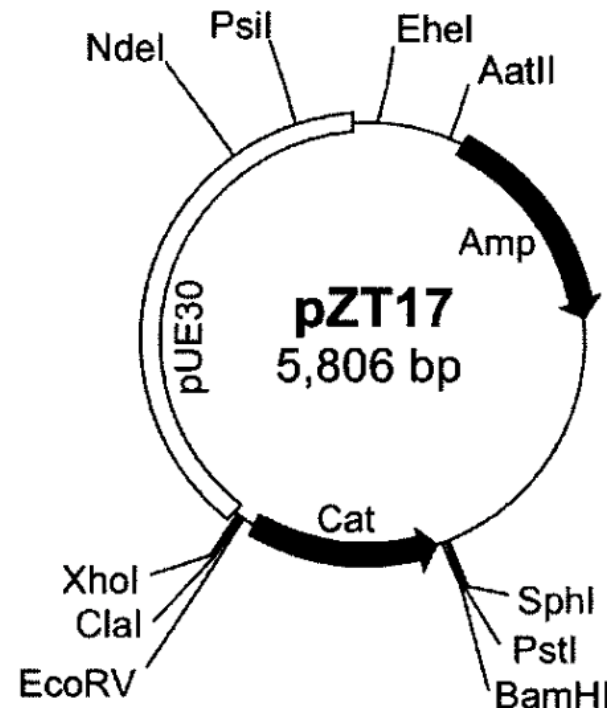
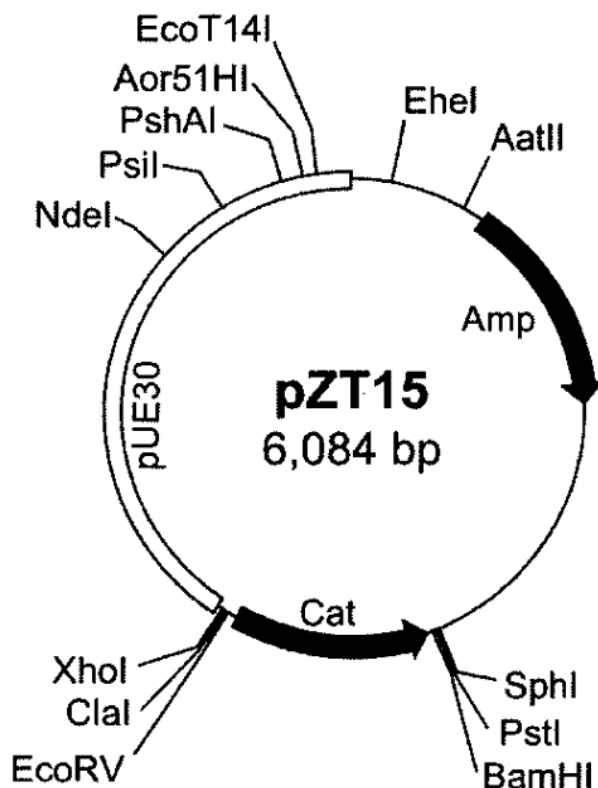
- 1977年に日本で分離された*Deinococcus*属細菌
東京都日野市の淡水魚研究所のコイの腸から分離
標準株はKS0485株 (ATCC 43672)
- 生育至適温度が34℃の中温菌
- 短桿菌
- 自然形質転換能を持つ
- 遺伝子操作系が確立済み (2009年)
- ゲノム配列解読済み (4.1 Mbp)
(2016年: QST、東京薬科大学、東洋大学)
(2019年: RIKEN、QST、東洋大学)



先行技術:

デインコッカス・グランディスの遺伝子操作系

特願2002-46377 特許第3845697号 放射線抵抗性細菌／大腸菌シャトルベクター
発明者: 鳴海一成、屠振力、佐藤勝也 (日本原子力研究所)



先行技術:



デिनコッカス・グランディスの遺伝子操作系

Plasmid 62 (2009) 1-9

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Plasmid

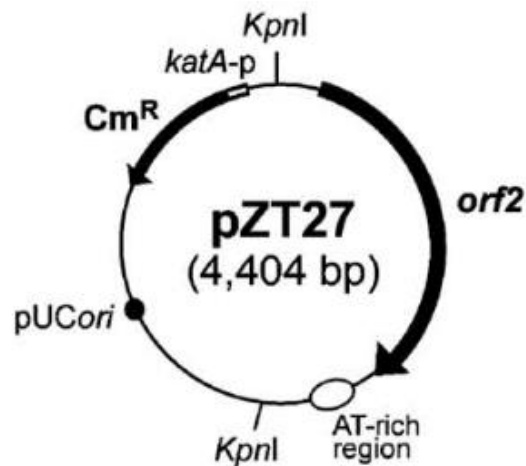
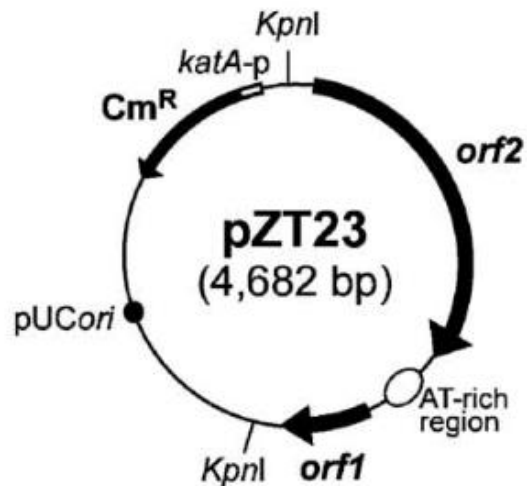
journal homepage: www.elsevier.com/locate/yplas



Development of versatile shuttle vectors for *Deinococcus grandis*

Katsuya Satoh, Zhenli Tu¹, Hirofumi Ohba, Issay Narumi*

Gene Resource Research Group and DNA Repair Protein Group, Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki, Takasaki 370-1292, Japan



ベクタープラスミドは、デिनコッカス・グランディス-大腸菌シャトルベクターpZT15およびその派生プラスミドに限定

先行技術:

デイノコッカス・グランディスのゲノム配列解読

2016年



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

genomeAnnouncements



CrossMark
click for updates

Draft Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus grandis*, Isolated from Freshwater Fish in Japan

Katsuya Satoh,^a Takefumi Onodera,^b Kota Omoso,^c Kiyoko Takeda-Yano,^d Takeshi Katayama,^e Yutaka Oono,^a Issay Narumi^{c,f}

2021年



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY



Microbiology
Resource Announcements

GENOME SEQUENCES



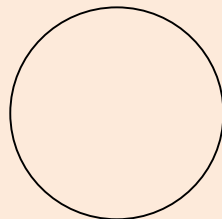
Complete Genome Sequence of a Radioresistant Bacterial Strain, *Deinococcus grandis* ATCC 43672

Atsushi Shibai,^a Katsuya Satoh,^b Masako Kawada,^a Hazuki Kotani,^a Issay Narumi,^c Chikara Furusawa^{a,d}

Chromosome

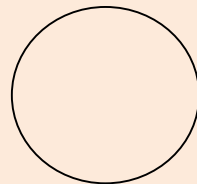
3,241,414 bp

pDEGR-1



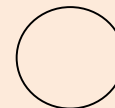
389,524 bp

pDEGR-2



373,907 bp

pDEGR-PL



91,291 bp

pDEGR-3



8,055 bp

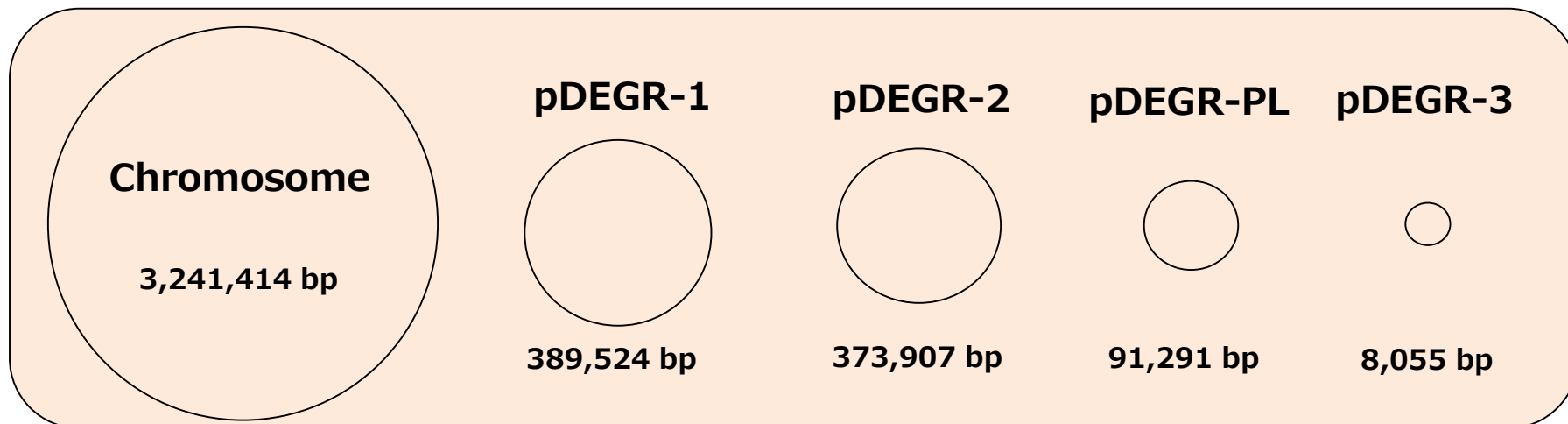
本発明のポイント

pDEGR-3
の自己複製
に必要な領域
を用いて
新規シャトル
ベクター
を構築する

Total genome size: 4,104,191 bp

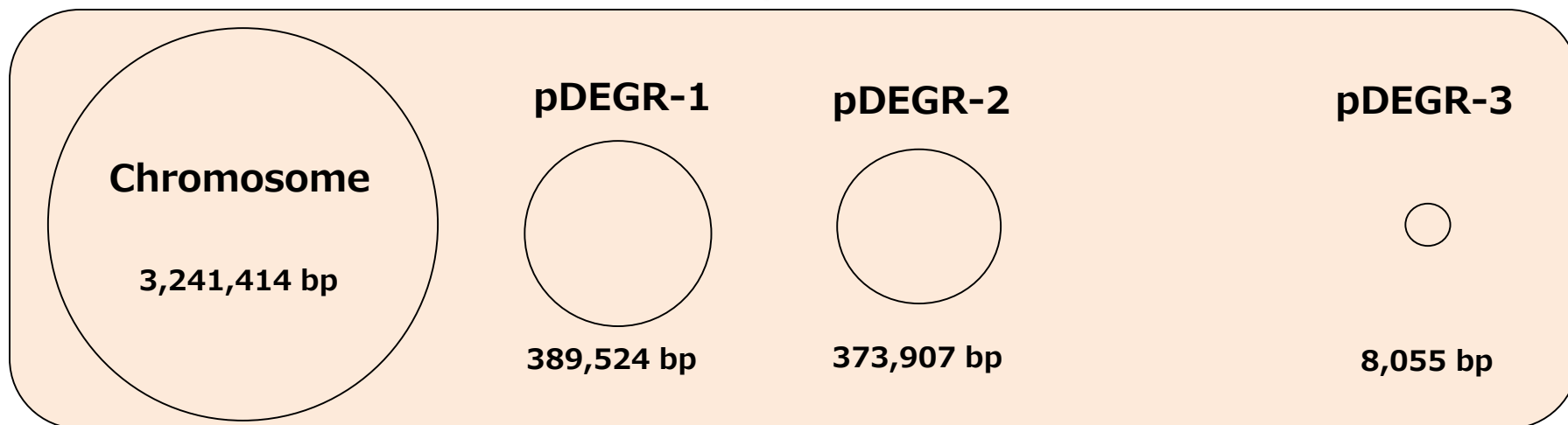
実施例1: プラスミド欠失株TY1の作製

ATCC43672
(野生株)



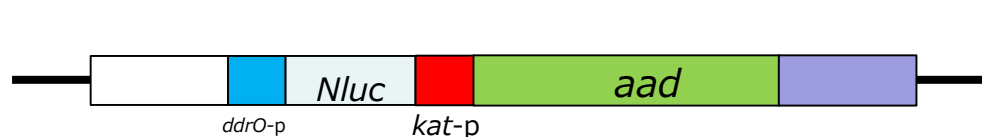
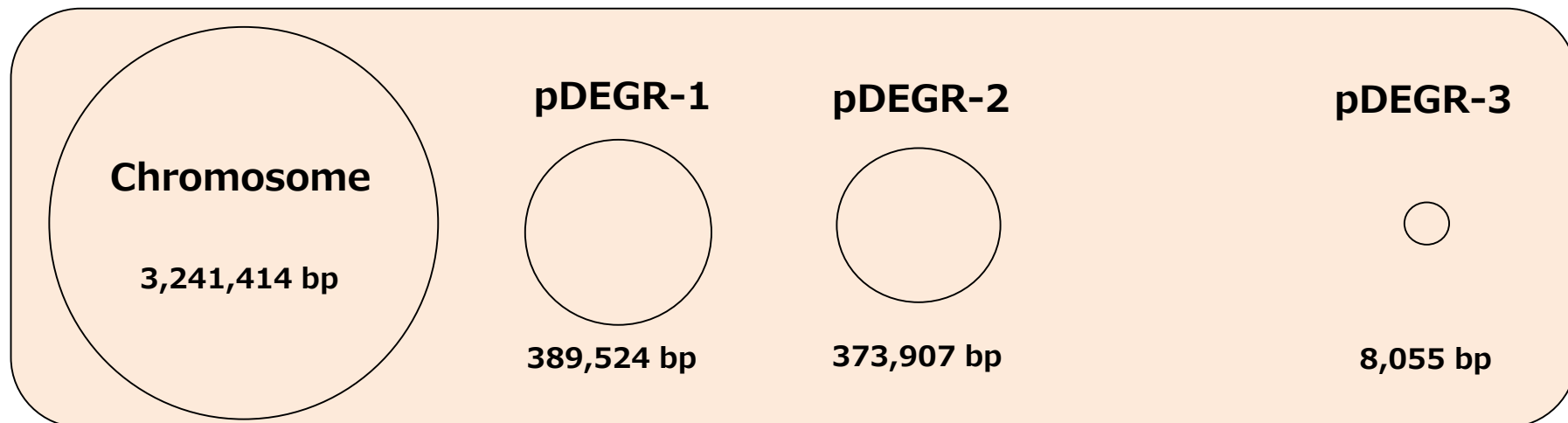
40℃で48時間振とう培養

TY1
(pDEGR-PL
除去株)



実施例2: プラスミド欠失株TY3の作製

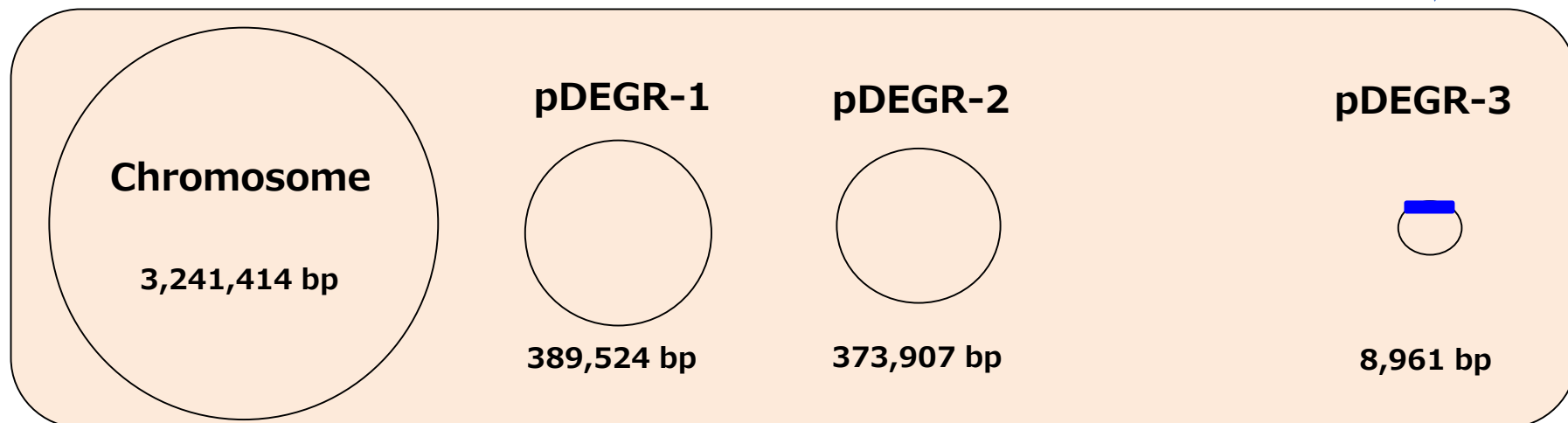
TY1
(pDEGR-PL
除去株)



pDEGR-3に
ストレプトマイシン耐性遺伝子と
ルシフェラーゼ遺伝子を導入

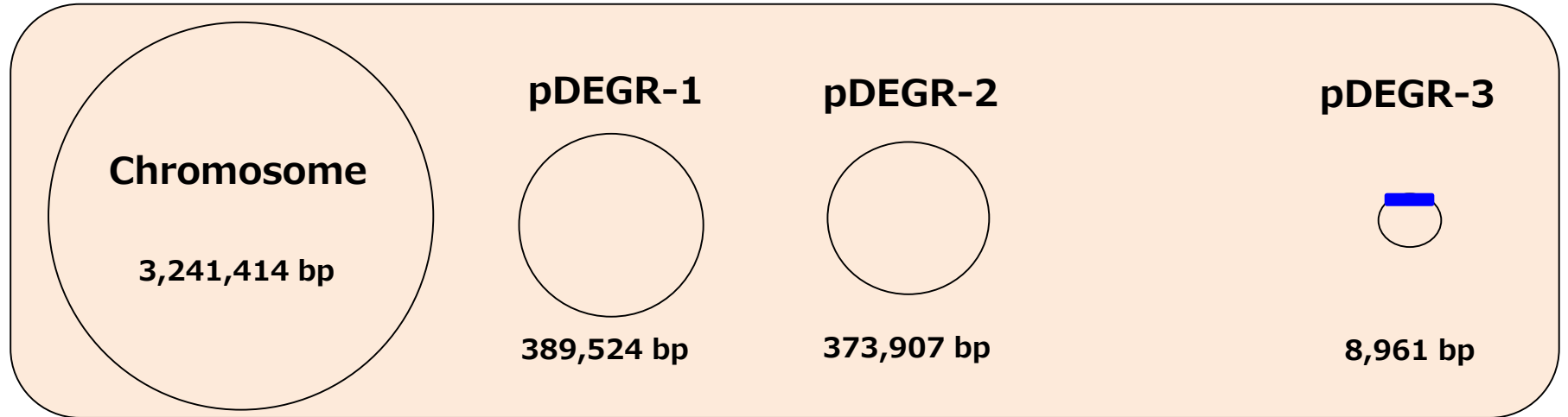


TY1Nluc株



実施例2: プラスミド欠失株TY3の作製

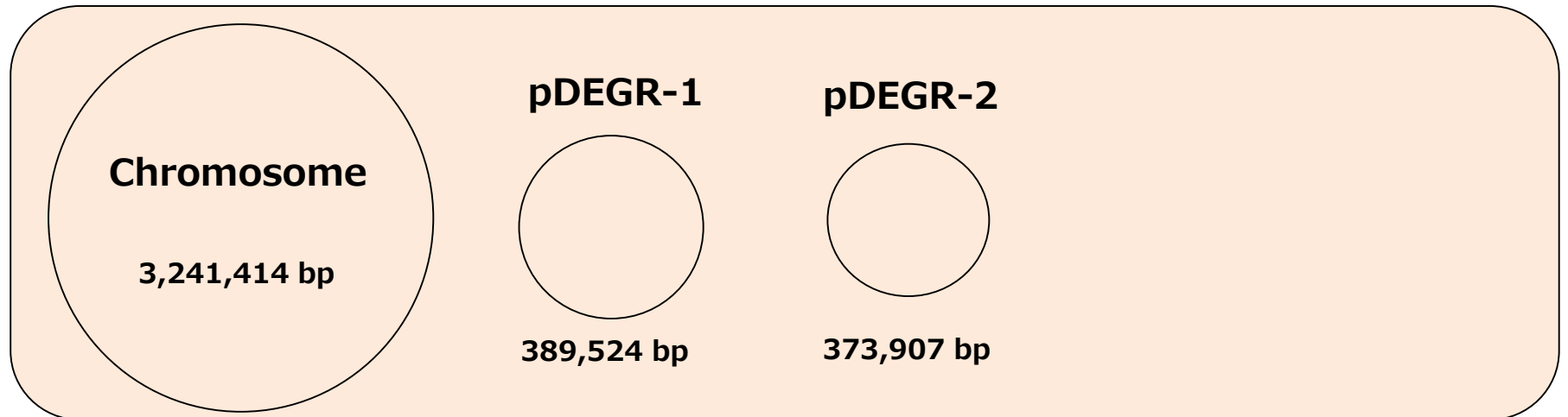
TY1Nluc株



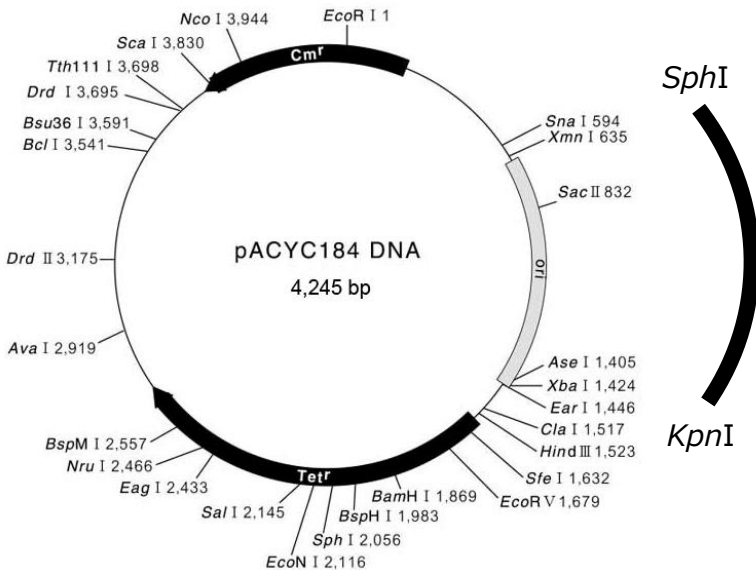
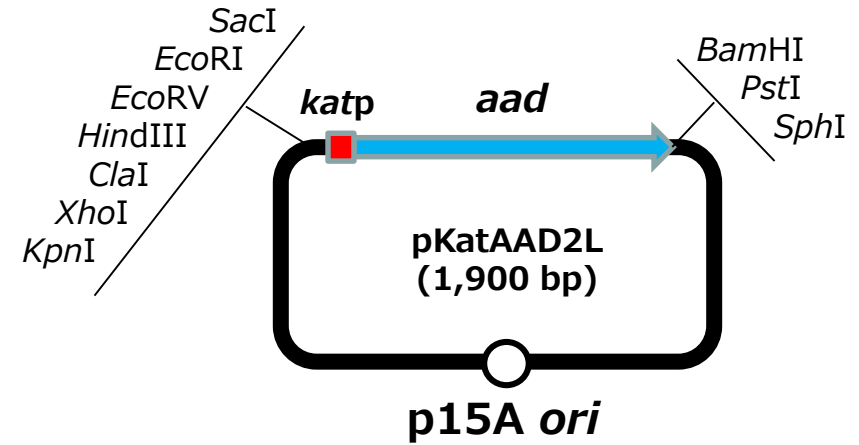
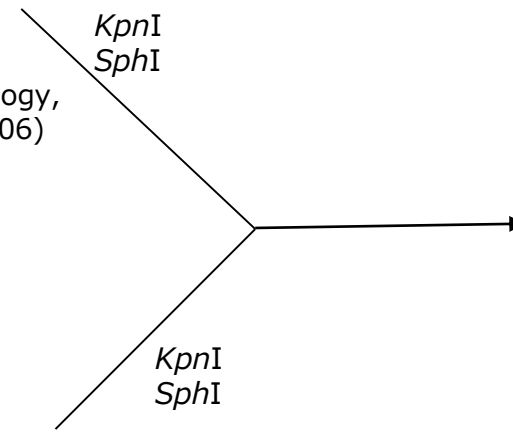
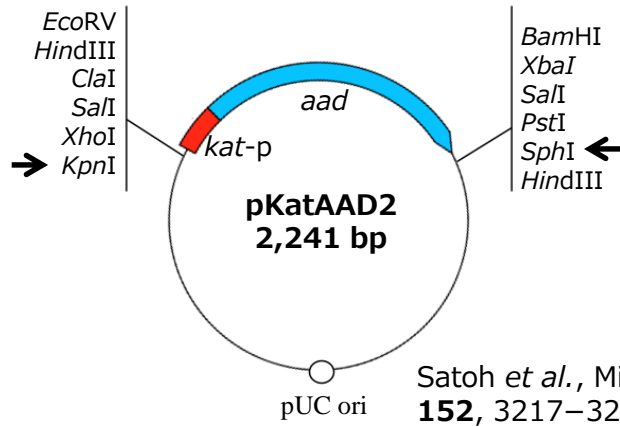
- ・ 培養培地にリファンピシンあるいはノボビオシンを添加
- ・ 40℃で24時間振とう培養



TY3
(pDEGR-PL
および
pDEGR-3
除去株)

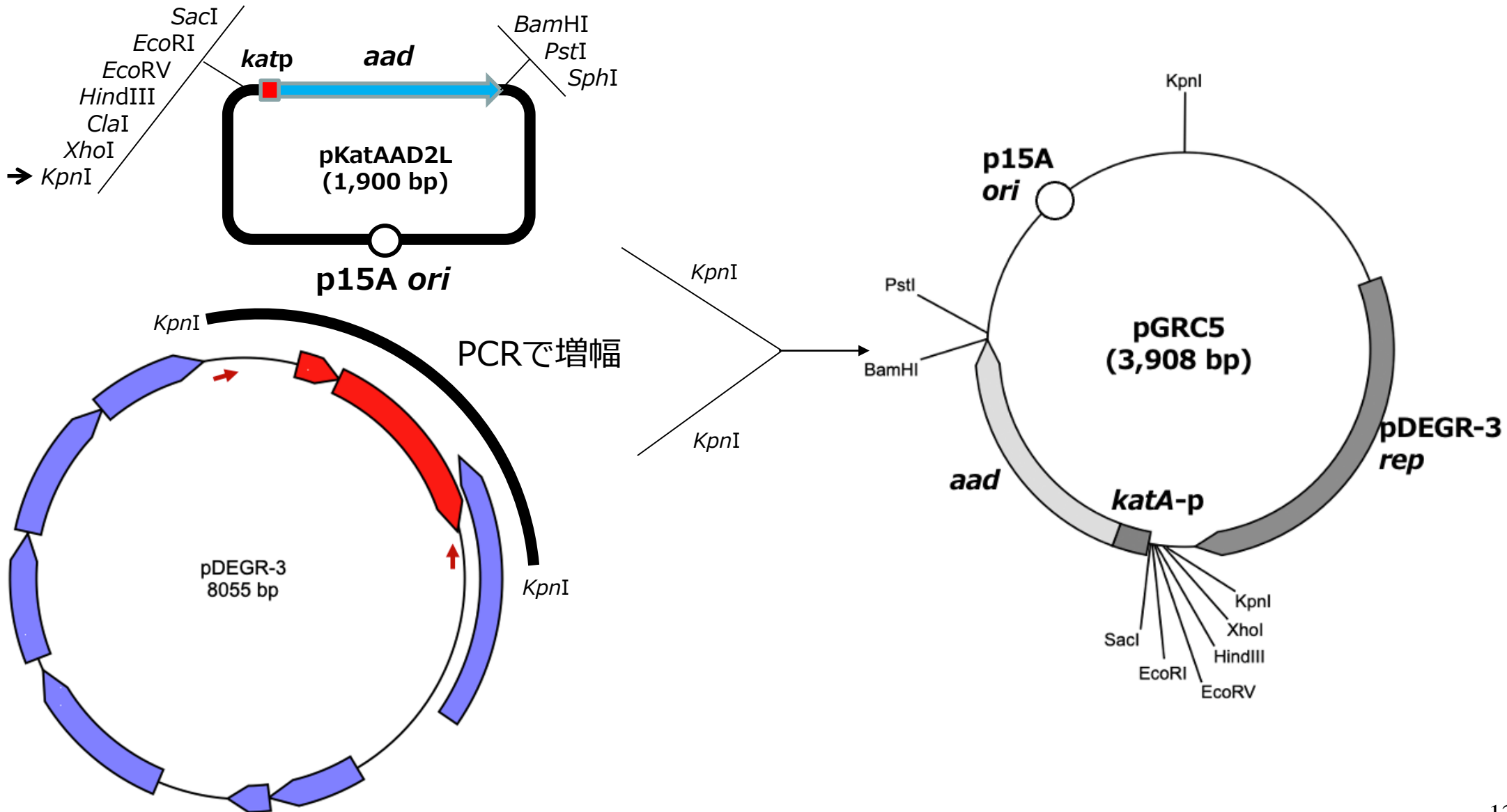


実施例3: シャトルベクターpGRC5の構築

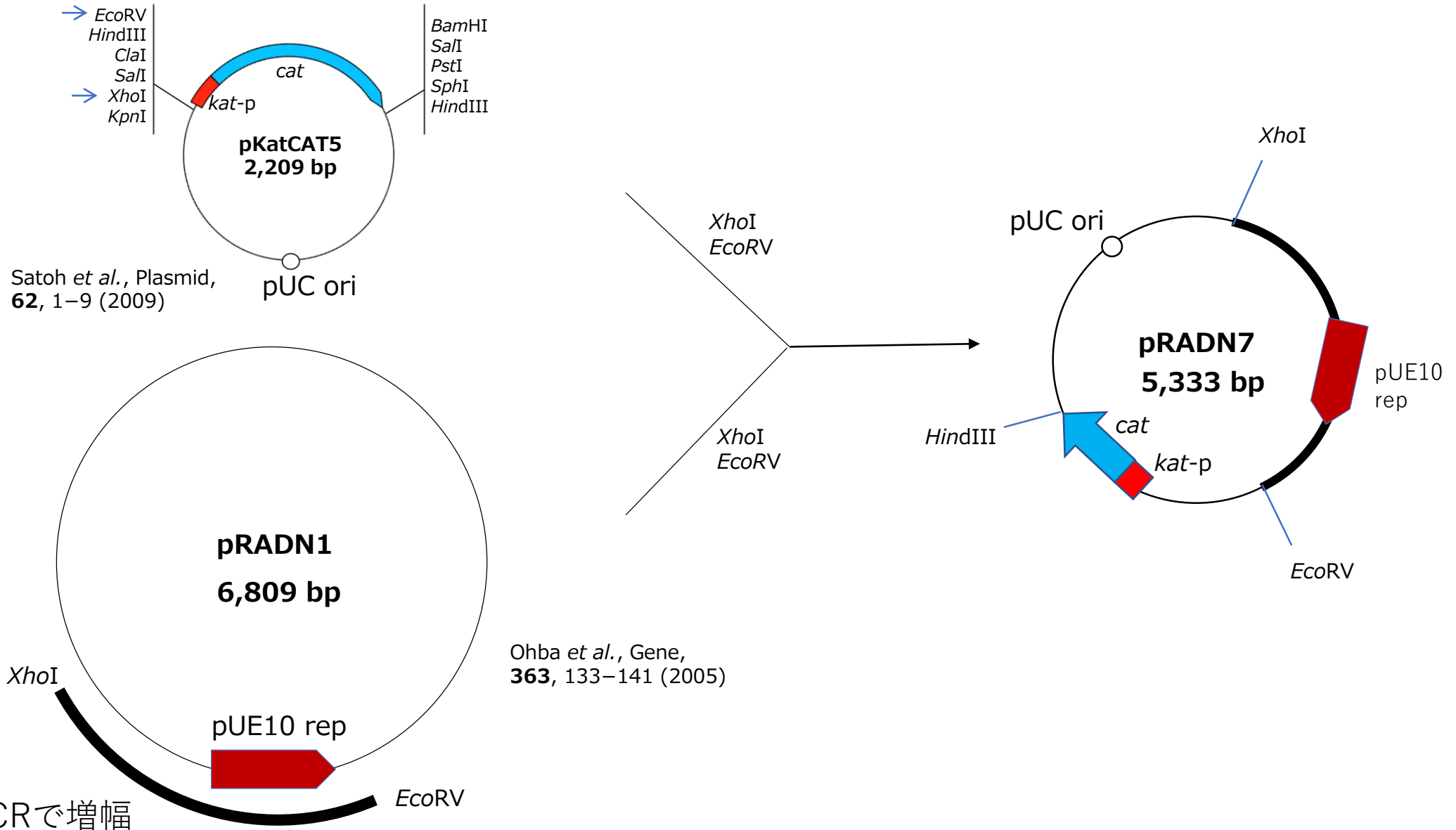


PCRで増幅

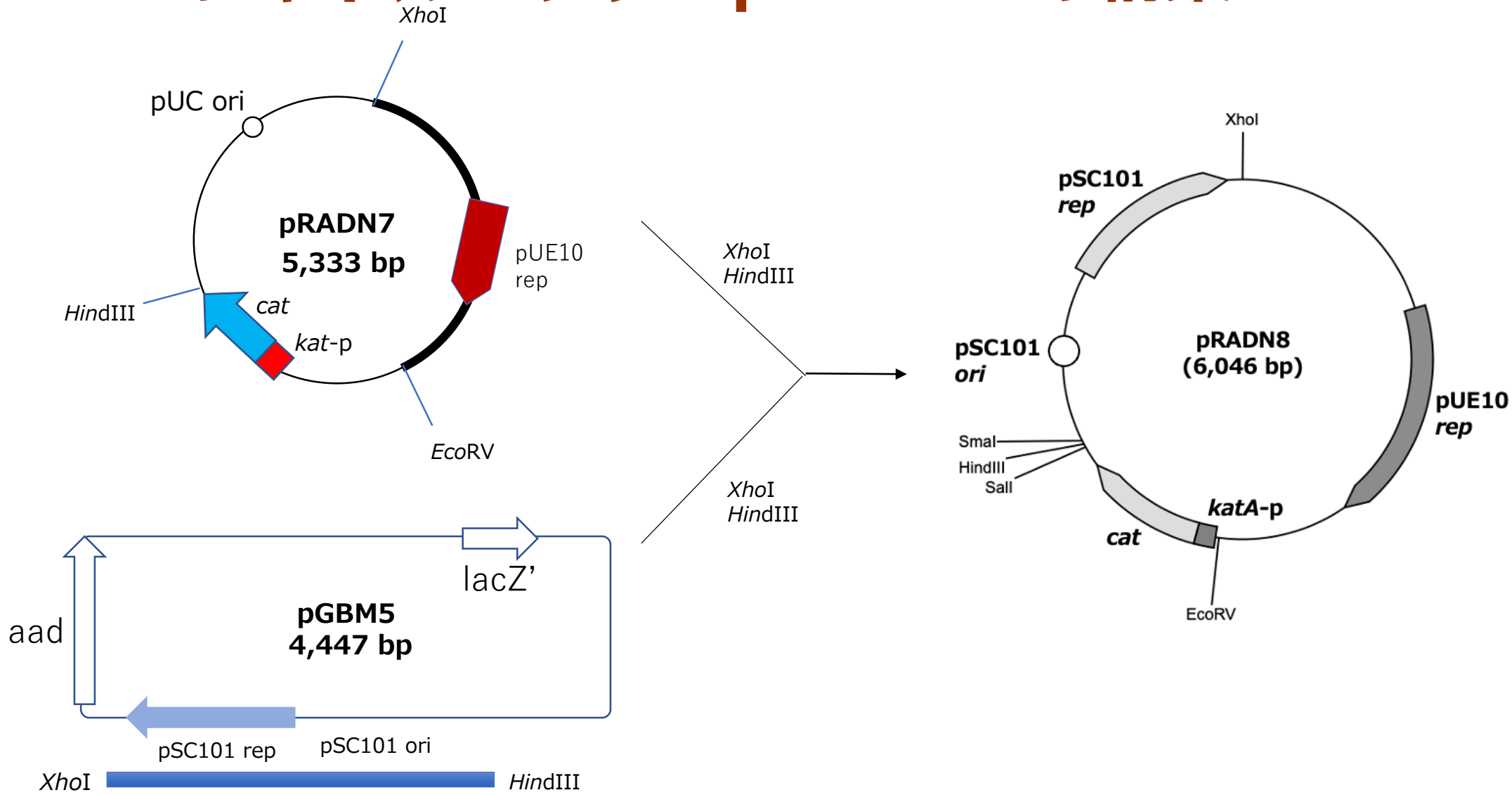
実施例3: シャトルベクターpGRC5の構築



実施例4: シャトルベクターpRADN8の構築

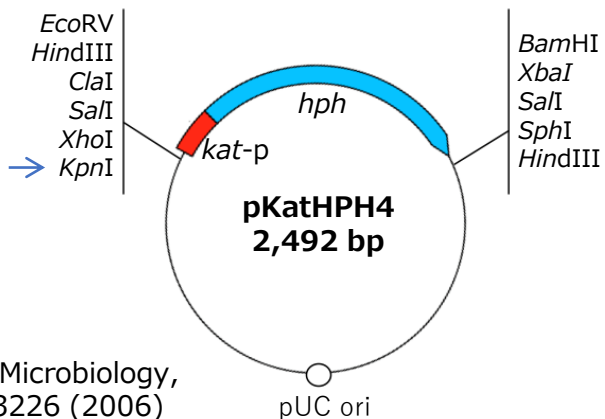


実施例4: シャトルベクターpRADN8の構築

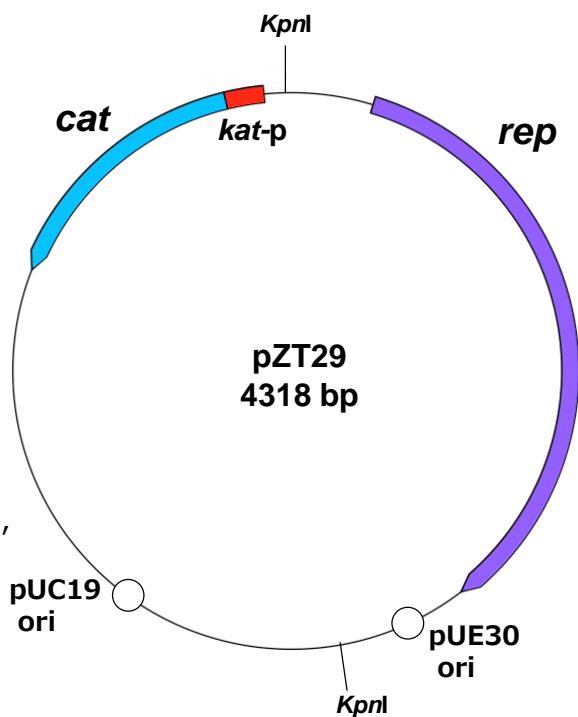


PCRで増幅

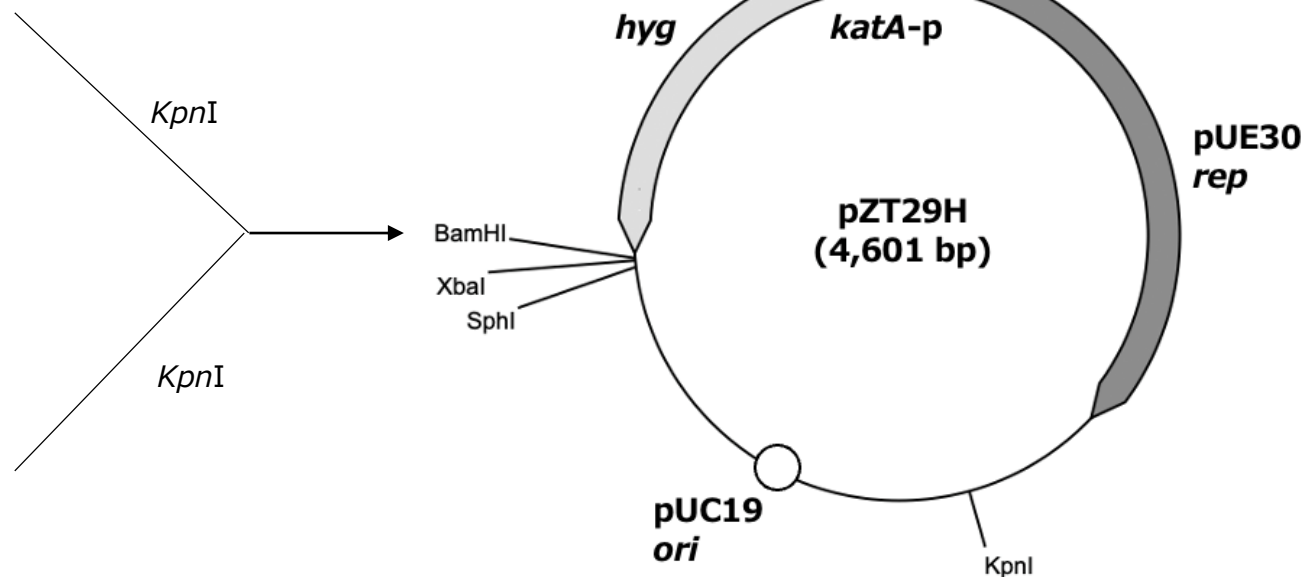
実施例5: シャトルベクターpZT29Hの構築



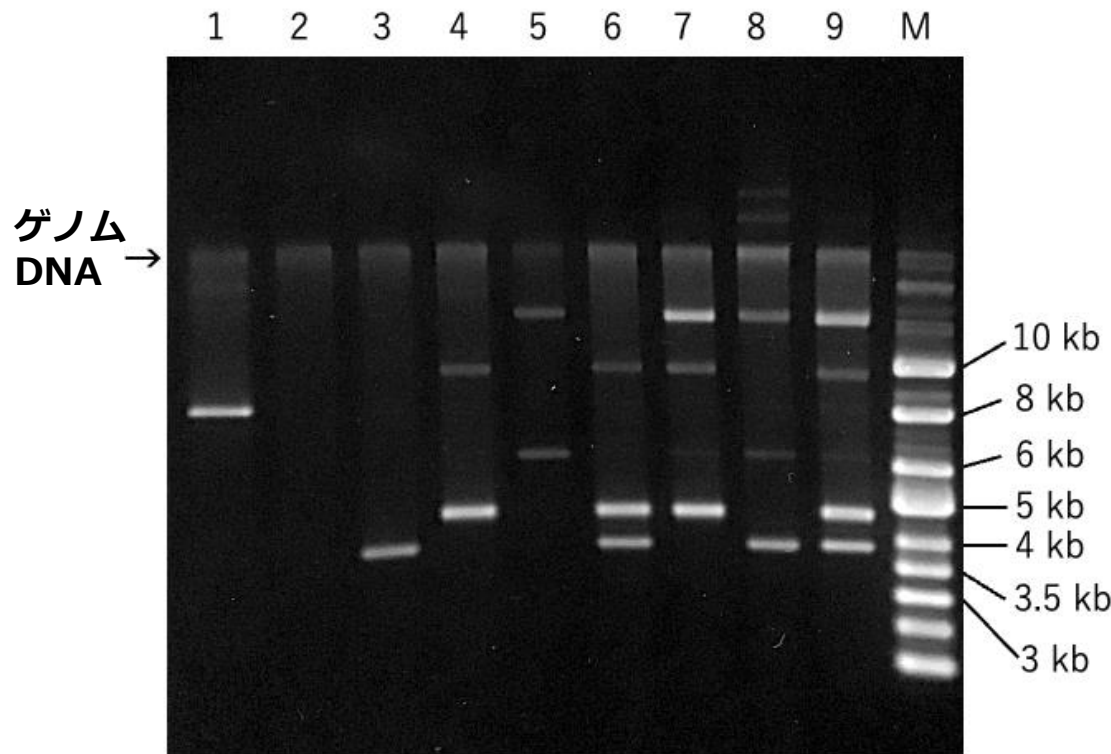
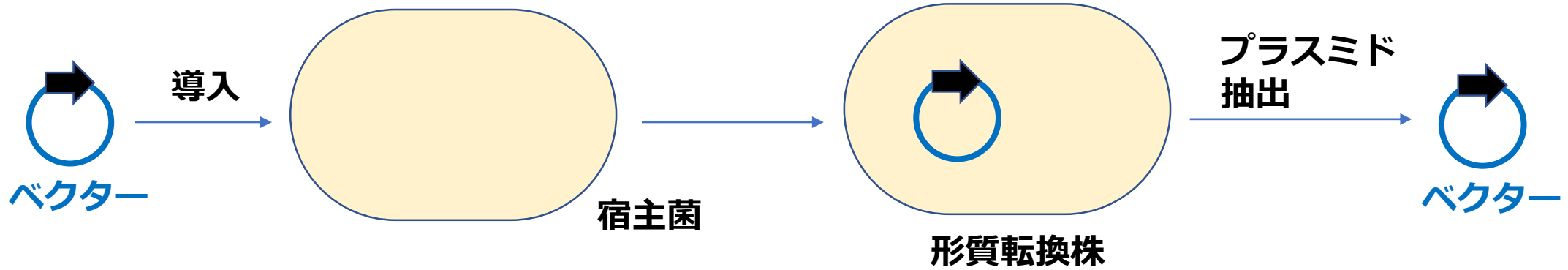
Satoh *et al.*, *Microbiology*,
152, 3217–3226 (2006)



Satoh *et al.*, *Plasmid*,
62, 1–9 (2009)



実施例6: シャトルベクターによる形質転換株の作出



- Lane 1: TY1 → pDEGR-3が存在する
- Lane 2: TY3 → pDEGR-3が存在しない
- Lane 3: TY3 (pGRC5)
- Lane 4: TY3 (pZT29H)
- Lane 5: TY3 (pRADN8)
- Lane 6: TY3 (pGRC5, pZT29H)
- Lane 7: TY3 (pZT29H, pRADN8)
- Lane 8: TY3 (pRADN8, pGRC5)
- Lane 9: TY3 (pGRC5, pZT29H, pRADN8)

3種類のベクターが共存できる

実施例7:ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドの構築

pGRC5にGroEp-Nlucを挿入 → pGRC5GN

pZT29HにGroEp-Nlucを挿入 → pZT29HGN

pRADN8にGroEp-Nlucを挿入 → pRADN8GN

Chromosomeの*rpoB'*の下流にGroEp-Nlucを挿入 → TY3GN

実施例8:相対プラスミドコピー数の計測

宿主	プラスミド	相対コピー数/ゲノム
TY3	pGRC5GN	2.00±0.03
TY3	pZT29HGN	2.86±0.02
TY3	pRADN8GN	0.63±0.02

異なる程度で外来遺伝子の発現ができる

新技術の特徴

- デイノコッカス・グランディスにおいて複数のプラスミドベクターを最大で3種類まで共存させることが可能である。
- 大腸菌でも自律複製できるシャトルベクターであるため、大腸菌を用いて容易に構築できる。
- 有用物質生産能や有害物質分解能が強化されたデイノコッカス・グランディスを効率的に作出できる。

想定される用途

- アンチエイジング関連の化粧品・健康食品の製造
- 汚染物質や有害物質の分解による環境浄化
- 放射性物質除去関連のバイオレメディエーション

産業上の利用可能性

- 活性酸素除去作用の高い抗酸化成分デイノキサンチンの生産
- 活性酸素除去作用の高い抗酸化成分バクテリオルベリンの生産
- 健康寿命伸長効果の高いポリアミンの生産
- 食品の腐敗防止などに活用できるクオラムクエンチング酵素の生産
- 都市大気汚染物質である多環芳香族炭化水素の分解
- 海洋汚染物質である酢酸エチルの分解
- 内分泌攪乱物質であるフタル酸ジブチルの分解
- 水産動物への使用が禁止されているマラカイトグリーンの分解
- 内分泌攪乱物質である17 β -estradiolの分解
- イネの重金属毒性の緩和
- 人体に対して非常に有害なヒ素(V)イオンの還元による毒性の軽減

企業への期待

- 本技術を用いた有用物質生産や環境浄化に興味を持つ企業等との共同研究を希望。
- 特に、アンチエイジング関連分野、バイオレメディエーション関連分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : デイノコッカス・グラン
ディスク宿主ベクター系
- 出願番号 : 特願2023-90336
- 出願人 : 学校法人東洋大学
- 発明者 : 鳴海一成

産学連携の経歴

- 2003年 JST新技術説明会
DNA修復促進蛋白質によるDNA結合反応促進剤
特願2001-246260
- 2004年 (株) ニッポンジーンに試料提供
- 2005年 DNA修復試薬の製品化
TA-Blunt Ligation Kit
- 2015年 DNA修復試薬の製品化
TA-Enhancer Cloning Kit

お問い合わせ先

東洋大学 産官学連携推進センター
(研究推進部 産官学連携推進課)

TEL 03-3945-7564

FAX 03-3945-7906

e-mail ml-chizai@toyo.jp