

# 極限微生物の研究

## ～放射線耐性菌の分子機構の解明～

2002/12/5(Nature 日本語版 タイテックマガジンに掲載)

地球上のありとあらゆるところに生息する微生物。

その生態は多種多様であり、コンパクトなゲノム構造は、

我々ヒトを代表とする多細胞生物とは全く異なる進化の方向にある。

デイノコッカス・ラジオデュランスは放射線抵抗性細菌であり、

ヒトの 1000 倍もの放射線耐性を持つ微生物である。

今回はこの放射線耐性の機構を分子レベルで解明することに挑戦し

その分子機構を明らかにしつつある 日本原子力研究所の鳴海先生にお話を伺った。

### インタビュー

鳴海先生こんにちは。今日は極限微生物研究という観点からラジオデュランスの放射線耐性機構について取材させていただきます。宜しくお願い致します。

### 鳴海先生

宜しくお願いします。

### インタビュー

鳴海先生は放射線抵抗性微生物のゲノムの修復機構の研究をなさっていますが研究に至ったきっかけを、先生のご経歴とその研究を行う上でのターニングポイントを含めてお聞かせ下さい。

### 鳴海先生

私は最初に弘前大学の医療技術短期大学というところにいまして、臨床検査技師の勉強をしていました。その時に臨床微生物学と生化学が面白かったということ、またあまり熱心に就職活動をしなかった為、教官から大学でもっと勉強することを奨められ、東京理科大の理学部化学科に入学しました。大学院の修士過程は宇都宮大学、博士過程は東京農工大学に所属していましたが、実際は自治医科大学の物理学教室で中等度好熱菌のベクター系の開発をして試験管内進化、進化分子工学をやろうと試みていました。ある学会で発表をしていたら、偶然に次の演者が今一緒に研究を

やっているバイオ技術研究室の同僚だったんです。その後ポスドクの公募があって、この研究室では放射線抵抗性細菌を扱っており、DNA修復に関する分子遺伝学の解析を始めたいので来ませんかというお誘いを受け、初めて放射線抵抗性細菌と出会いました。大学院の時は好熱菌をやっている、原研では放射線抵抗性細菌、研究人生ヘンな微生物から離れられないということです(笑)。

## インタビュー

放射線耐性機構のお話の前にデイノコッカスという微生物について簡単にご紹介下さい。私たちにはなじみが薄い印象です。

### 鳴海先生

デイノコッカスはいろんなところに分布しています。普通の土壌細菌のようにそこら辺の土の中にもいます。デイノコッカスに属し種名がついている菌は現在のところ全部で7種ありますが、それぞれ動物の糞であるとか、淡水魚や海水魚の体表、牡蠣とか病院の埃などから分離されました。一番先に分離されたのは牛肉の缶詰からです。また、南極の氷の中、成層圏の空に漂うものなど地球環境のあらゆる場所にいます。

## インタビュー

南極の氷とか、成層圏と言うのはすごいですね。

### 鳴海先生

成層圏も1万メートル上空は、地上に比べて紫外線が強くて、宇宙線も沢山降り注いでいます。そんな極限環境で生き残れるのは放射線抵抗性細菌だけなんだろうと思います。ただ、山にいた菌が風で吹き上げられたもので、雲の中に住んでいるわけではないと思いますけど(笑)。デイノコッカスは放射線耐性が強いのが特徴で、大腸菌の100倍、ヒトの細胞の1000倍以上の放射線耐性を示します。デイノコッカスの能力で驚くことはその細胞のゲノムDNA修復機構です。放射線による損傷の最も重要な現象にDNA鎖の切断があります。生物にとって1番ダメージが大きいのはDNAの2本鎖が切断されてしまうことです。DNAは遺伝情報ですから切断を受けると遺伝情報が分断されてしまいます。デイノコッカスはそれを修復する能力にもものすごく長けているのです。デイノコッカスが初めて分離されたのは1956年ですが、それから40数年経った今でも、放射線耐性の分子メカニズムは良く解っていません。この原研高崎研究所では以前から食品照射の研究を行っていました。食品に放射線をあてて滅菌し、食品の安全性を高めようという研究です。1970年代からやっていたんですが、その頃放射線をあてても生き残っている微生物が分離されて、そういう菌株がストックされていました。今から8年くらい前に、それらの菌のDNA修復のメカニズムを解明しよう

という研究を開始しました。放射線による損傷と修復に関する研究は原子力と放射線利用の基礎基盤研究においても重要なのです。

### インタビュー

基礎的な質問で恐縮ですが、DNA以外の細胞を構成する物質、例えば蛋白質などは放射線によって損傷しないのですか？

### 鳴海先生

影響は受けます。アミノ基が最も感受性が高く、またSH基を持つ蛋白質は一般に感受性が高いと言われています。しかし、蛋白質は細胞内に同じ分子が複数存在する 경우가多く、少くらい壊れても影響は少ないのです。膜も放射線の影響を顕著に受けます。実際に実験していると、デインコッカスの細胞膜に存在するカロチノイドが強い放射線によってすぐに分解してしまうのが目で見て分かります。膜脂質も影響を受けますが、これも細胞内での分子数が多いので、あまり問題にならない。しかし、放射線を受けたというシグナルは細胞膜から伝達されるという説もあります。蛋白質や膜といった生体高分子に比べると、DNAは放射線の作用に対して最も重要な標的のです。細胞中に1コピーしかない遺伝子が受けた損傷は、それが修復できないとき生命にとって重大な意味を持つのです。

### インタビュー

デインコッカス・ラジオデュランスの遺伝子解析はどのように進めていったのですか。

### 鳴海先生

遺伝子解析は変異株を集めるところから行いました。1980年代にイギリスのエジンバラ大学のモズレー先生と理研の北山先生によって40種類以上の放射線感受性変異株が得られていました。それらの解析がまだ行われていなかったので、変異株を譲り受けて、放射線感受性株の変異領域を同定する試みを行いました。研究をスタートしてから2、3年後にアメリカのTIGR(The Institute for Genomic Research)がこの菌のゲノムプロジェクトを始めるといった情報を知りました。彼らはホールショットガンでゲノムを決定しましたが、丸5年かかりました。

### インタビュー

ラジオデュランスはどのくらいのゲノムサイズですか。またゲノムプロジェクトの存在によって研究のステラテジーはどのように変化したのですか？

### 鳴海先生

ゲノムサイズは3.2メガベースでそれほど大きくないです。ゲノム配列の解読に時間

がかかった理由は GC 含有量が約 70%と高かったからだと聞いています。今でしたら GC 含有量が高いゲノムでも比較的容易に読めるんですが、当時は時間がかかったのでしょう。確かにゲノムプロジェクトが終わった後で何が必要になるのかを当時真剣に考えました。そこで我々は変異の原因遺伝子をクローニングするのにコスミドライブラリーを作りました。またコスミドライブラリーを用いてゲノムマップ物理地図を作成しました。またデインコッカスは、遺伝子操作系の開発が進んでいなかったので、遺伝子破壊法を開発しました。薬剤耐性カセットを挿入して遺伝子を破壊する簡便な方法です。幸いなことにゲノム物理地図も遺伝子破壊法もゲノムプロジェクトが終わる前に論文として投稿することができました。基本的には変異株の解析を続けてきて、ゲノムプロジェクトが終わった後には遺伝情報を利用して分子遺伝学がやれるような状態を作るとというのが戦略でした。

### インタビュー

TIGR の方々がゲノムプロジェクトをやっている間にその次のプロセスを開発されたわけですね。そういう過程の中で、デインコッカスの放射線耐性機構が明らかになりはじめた。

### 鳴海先生

そうです。TIGR が全部シーケンスを決めました。ゲノム解析の結果、デインコッカスは、大腸菌やヒトが持っている既存の DNA 修復遺伝子をほとんど全て持っているということがわかりました（遺伝子数は約 3000 個、機能未知はそのうち 52%）。しかしなぜこの菌が放射線耐性なのかはゲノムプロジェクトから明らかにすることはできなかったんです。

### インタビュー

この場合、ラジオデュランスの放射線耐性に関連する機構は、既存のシステムの遺伝子の変異か、機能未知の遺伝子群が存在すると考えられますか？

### 鳴海先生

そうです。既知の修復遺伝子、ヒトでも大腸菌でも持っている遺伝子からできる蛋白質のどれかが特異的に機能が良くて、それで放射線抵抗性とか DNA 修復能が長けている可能性があります。しかし既知の修復酵素で高機能性のものが、今の所見つかっていません。我々は RecA という組換え DNA 修復系に中心的な役割を果している遺伝子を最初の標的にしました。実際に放射線感受性変異株の幾つかを調べてみると RecA の遺伝子に変異があるものが見つかったからです。抽出して蛋白質の性質を調べた結果、大腸菌とラジオデュランスの RecA 蛋白質との違いはほとんどありませんでした。アミノ酸の相同性も高いですから機能も変わりませんでした。放射線で

出来る重篤な傷は DNA の 2 本鎖切断、それを修復するには組換え修復系の機能がまず考えられるのですが、RecA に依存する組換え修復系はラジオデュランスの放射線耐性の主要な機構ではないことが強く示唆されました。その後も、他の変異株の解析を継続しました。現在ではモズレー先生と北山先生、アメリカのジョン・バチスタ先生から頂いた約 60 種類ぐらいの変異株を持っています。感受性の程度も重要ですが、特に放射線に感受性の高い株に狙いを絞って解析しました。その中の 1 種類が持つ変異が新規の遺伝子にあったのです。その遺伝子を pprA と名付けました。この遺伝子は、他の遺伝子と全く相同性がなく、既知のモチーフ構造もありませんでした。そこで実際に蛋白質を精製して、DNA と混ぜてみました。その結果、DNA の損傷を認識して切断末端に付着するという機能を持つことが分かりました。

### インタビュー

それは付着する末端を認識する上での特異性(例えば 5'末端、3'末端もしくは 1 本鎖・2 本鎖)はあるのですか？

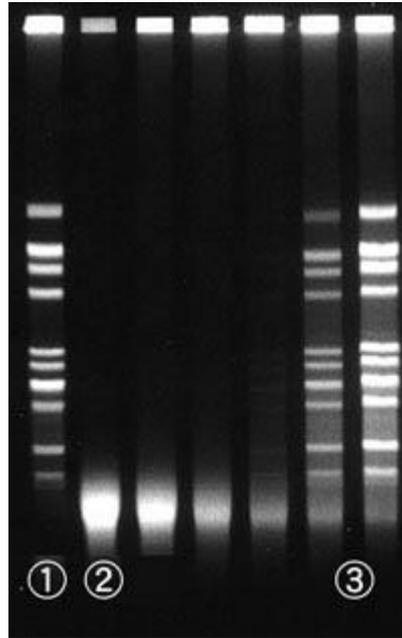
### 鳴海先生

2 本鎖 DNA の切断末端であれば末端の性状に係わらず付着します。また、2 本鎖 DNA 上の片方の鎖切断部位 (ニック)にも付着します。しかし、1 本鎖 DNA に対する結合能はありません。DNA に末端が出来るとエキソヌクレアーゼ分解を受けます。そこで PprA という蛋白質がヌクレアーゼとどのように反応するのかを調べた結果、その活性を阻害してしまうことが分かりました。また同様に DNA 末端に作用する DNA リガーゼとの組み合わせを調べた結果、今度は逆に DNA 結合反応を促進する活性が見つかったのです。

図: 電気泳動の写真は放射線を受けた菌のゲノムが再生する様子

①は放射線を照射する前

②は照射後



③は再生したゲノムの断片です。

### インタビュー

少しずつ、この蛋白質を中心に色々なパスウェイがわかり始めているんですね。

### 鳴海先生

ええ。これはちょっと宣伝なんですけど(笑)、PCR産物のクローニングにTAクローニングキットが売られています。そのキットにPprA蛋白質を至適濃度加えてやるとクローニング効率が倍増するんです。現在、某試薬メーカーと商品化について話しています。放射線抵抗性細菌はDNA修復能力が高い。遺伝子工学に使う試薬はポリメラーゼでもリガーゼでもほとんどがDNAを標的にしています。ですからDNAを加工する上でより有用な蛋白質が取れる可能性は多いにあるわけです。環境への対応から進化してきた極限環境微生物はおもしろい蛋白質を持っている可能性が高いと言えます。

### インタビュー

極限環境への適応は、その微生物特有の分子機構の影響が大きいんですね。ところでラジオデュランスのそれぞれの染色体の複製開始点や終了点は既にわかっているのですか？

### 鳴海先生

これがまだ解からないんです。例えば複製開始点を同定するのにGCスキューという方法がありますが、その開発者との前話をしました。しかし、ラジオデュランスだけはGCスキューで分析しても複製開始点が同定できないといっていました。TIGRのデ

データベースでは配列番号の1番は、複製に関係する遺伝子がそこにあることに由来しています。しかし実際にそこに複製開始点があるかどうかはまだ分かりません。バイオインフォマティクスの発展に期待しています。ラジオデュランスは既知のDNA修復機構も持っていますが、全く独自の修復機構も持っていることが解かってきました。ゲノムの52%が機能未知遺伝子ですから、独自の修復に係わる遺伝子がまだまだあると考えられます。遺伝子の機能予測法の開発もバイオインフォマティクスに期待するところです。ラジオデュランスのDNA修復機構でもうひとつ重要なことは、損傷誘導性であることです。修復機構に関与している遺伝子はDNAに傷ができた時、例えば放射線があたった時、発現が誘導されてきます。放射線に暴露したというシグナルを何処かで受けとって、蛋白質を大量に誘導してDNAの修復にかかるわけです。pprAやrecAのような修復遺伝子を発現せよと指令をする誘導メカニズムというの、またこの菌独自のものがあります。

## インタビュー

それも明らかになったのですね。

## 鳴海先生

そうです。放射線に高度に感受性な別の変異株を解析した結果わかったんです。この遺伝子を破壊するとラジオデュランスが大腸菌並の放射線感受性になってしまうのです。この遺伝子破壊株では、RecAやPprAというようなDNA修復蛋白質の放射線照射後の誘導が全く見られませんでした。これもまた全く新規の遺伝子でppr1と名付けました。大腸菌ではSOS応答といわれているメカニズムが誘導性DNA修復の主流パスウェイで、RecAとLexAがその主役です。LexAが普段はDNA修復に関係する遺伝子の発現を抑えていて、DNA修復が必要なときにRecAがLexAによる抑制を解除することによっていろんな遺伝子が発現します。大腸菌でも、枯草菌でも同じメカニズムが働いていますから、原核生物はみな同じだと思っていました。でもラジオデュランスは全く違いました。ラジオデュランスのRecAは蛋白質の基本的な性質は大腸菌のものと同じですが、発現制御のメカニズムは大腸菌や枯草菌と全く別なんです。Ppr1という新規のレギュレーター蛋白質がシグナルになっているんです。

## インタビュー

膜に関するシグナル因子が存在する可能性はあるんですか？

## 鳴海先生

ありますね。Ppr1蛋白質は膜蛋白質です。疎水性アミノ酸残基のクラスターが1箇所あります。Ppr1が直接にPprAのプロモーターを制御しているのではなく、その間に幾

つか介在する物があると現在考えています。思ったより複雑なことをやってるなという印象です。

## インタビュー

今後の研究の方向の展開についてはどのようにお考えですか？

### 鳴海先生

ひとつは Deinococcus の放射線耐性メカニズムを解明することによって生物一般の DNA 修復に関する基礎的な理解に役立てられると思っています。もう一つは、実際にもう始めていますが、生物線量計というのがあります。今、Deinococcus に特異的な放射線応答メカニズムが明らかになりました。それに関与するタンパク質と遺伝子の標的も分かりました。それらの材料を使って細胞にどれだけ放射線が当たったかを感知できる、すなわち線量が推定できる生物線量計のプロトタイプを開発できるのではないかと期待しています。実際にルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして、細胞に放射線がどれだけ当たったか活性で評価します。例えばルシフェラーゼの遺伝子の upstream に PprA のプロモーターを繋げた DNA 断片をシャトルベクターに入れて Deinococcus の中で発現させてやります。そうすると放射線があたると光り、放射線量に依存して光が強くなります。Deinococcus は六キログレイというとても多い放射線の量でも 100% 生き返りますから、広範囲の放射線の線量域で使える生物線量計になると考えています。もう一つは、今、放射線防護で問題になっている低線量放射線の影響です。人体に対して低い線量の放射線の影響があるのかないのか、影響がない閾値があるのかないのかという問題です。低線量の放射線はかえって体に良いんだともいわれています。

## インタビュー

温泉などの場合ですね。

### 鳴海先生

そうです、ラドン温泉は体にいいという話があります。本当に低線量域では高線領域とは違う放射線の生体影響があるのかどうか、それを調べるのが重要になっています。生物線量計に関しても、もっと低い線量で高感度に生体に対する放射線量を計れることができればベストですから、それを開発しようと思っています。Deinococcus の放射線応答に必要なタンパク質、ターゲットになる DNA プロモーター領域が解っているわけですから、それらを改変することも我々にはできるわけです。ですから低線量でも敏感に反応する系を作っていけるのではないかと考えています。PprA 蛋白質の特質を生かした別の計画も進めています。PprA は放射線等でできた DNA の切断末端に付着します。そこで、高等動物の細胞に放射線が当たった時に、細胞核にどれ

だけ DNA の鎖切断が生じて、どれだけ修復されるのかを PprA の結合量・結合位置とその変化を指標にして調べることが出来ると考えています。現在プロトタイプが出来て、ミトコンドリアの中で起こっている DNA の切断が検出できていますし、核の中の DNA 切断も検出できています。重要なのは、いかに低線量のところで起こっている現象を捉えられるかということなので、今低線量放射線の生物影響で問題になっている辺りの線量(センチグレイオーダー)で DNA に生じた傷を検出できるような高感度のものを作ろうとしています。

## インタビュー

極限微生物はそれぞれの環境でオリジナルな耐性の戦略をとっていると思いますが、そういった多様性はどのように形成されてきたとお考えですか？デインコッカスの場合を例にお話下さい。

## 鳴海先生

そうですね。デインコッカスがなぜ放射線に強くなったのか。ルイジアナ州立大学のジョン・バチスタ先生によれば、進化の過程で乾燥耐性を得た際の副産物であるということです。その根拠は、乾燥でも DNA 鎖の切断が起こり、デインコッカスで今まで調べている放射線感受性株のほとんどが乾燥には弱いからです。しかし、これはニワトリが先か卵が先かと同じことで、私は彼の説には賛成しないことにしています。最近、バチスタ先生は乾燥耐性には重要だけでも放射線耐性には関係ないという遺伝子を



発見しています。私はちょっと違う考えを持っています。

アフリカのガボン共和国のオクロという所にウラン鉱床があります。天然ウランのうち、核分裂性ウラン 235 の同位体存在比は現在 0.72%と一定なのですが、オクロのウラン鉱床でのウラン 235 の割合がこの標準値よりも異常に少なかったのです。調査の結果、約 20 億年前にウラン 235 が自然に核分裂連鎖反応を起こしたということが分かっています。天然ウランの大半を占めるウラン 238 の半減期は  $4.47 \times 10^9$  年、ウラン 235 の半減期は  $7.04 \times 10^8$  年ですから、20 億年前にはウラン 235 の割合が三%を越えていたという計算になります。三%というのは現在の原子炉(軽水炉)を作動させるのに使われているウラン 235 の濃縮度です。従って、20 億年前には自然に核分裂連鎖の臨界の条件が整っていたのです。オクロで天然原子炉が作動していたのは 100

万年以上であると見積もられています。また、地球の過去の歴史において存在したオクロ型の天然原子炉の数は約 1 億個という試算も報告されています。

## インタビュー

100 万年とはすごく長いですね。

## 鳴海先生

新しい微生物の種が生まれるには十分な時間なので、もしかしたら放射線抵抗性細菌というのは、デインコッカスに限らず、ウラン鉱床の天然原子炉の近くで生まれたのではないかと言うことを提唱しようと思っています。実際、デインコッカスは、ウランを還元することが出来るんです。ウランには価数が四価と六価の 2 種類あって、四価は水に溶けにくく、六価は水に溶けやすい。20 数億年前に呼吸をする生物シアノバクテリアが出てきて、地球が酸化的な状態になってくると四価のウランが酸化されて溶けやすい六価になって移動してあるところに堆積するわけです。そこで微生物によって還元されて不溶性なものになり、やがてまた酸化状態で溶け出して…というサイクルを繰り返して堆積型のウラン鉱床が出来るわけです。デインコッカスの近縁の高度好熱菌サーマスもウランを還元する能力があります。ですからデインコッカスとサーマスの共通祖先型の生物が 20 億年前のウラン鉱床の形成に関与していた可能性があります。

## インタビュー

還元する代謝経路は明らかになっているんですか？

## 鳴海先生

まだ、そこまでは解っていません。鉄の還元とか重金属の還元と似たような機構だと考えられています。今は現象的なことしか解っていません。化学従属、例えば鉄還元菌とか硝酸還元菌とか原始的な微生物がもつ代謝系をそのまま維持しているとも考えられます。デインコッカス、サーマスは明らかに古細菌ではなくて原核生物、真正細菌ですが進化系統樹の根元付近から分岐して独特なグループを作っています。原始的な生物なので微生物の発生起源に近いといえます。その生物の DNA 修復を調べていくと DNA 修復の起源と進化という研究もできるのではないのでしょうか。ただ、超好熱古細菌パイロコッカスはデインコッカスと進化系統樹の全然似ていないところにいますが、放射線にかなりの耐性を示すことが分かっています。それから鳥取の三朝温泉と言うラドン泉から、ルブロバクター・ラジオトーランスという菌が分離されています。この菌はデインコッカスよりも放射線耐性がありますが、進化的にはかけ離れていて、枯草菌に近いグラム陽性菌です。これらの菌の DNA 修復メカニズムがデインコッカスと共通なのか違うのか興味がありますね。

## インタビュー

最後に若手研究者へのメッセージをお願いします。

### 鳴海先生

私自身まだ若い研究者にちょっと毛が生えた位の立場なので、自分自身の信条として、これからも肝に銘じていこうと思っているのですが、それは「サイエンスする心を常に持ち続けること」「Keep doing science」です。それを磨くためには、「自分の専門分野だけに閉じこもらず、広い視野に立っていろんな分野のことを勉強する」ことや、「自分の研究が社会とどんな関わりを持つのかを把握すること」であると思います。また、「サイエンスする心」を持つだけではダメで、それを外に向けて発信したり、アピールできる能力を若いうちに身につけることも研究者として大切なことだと思います。勿論それは、論文を発表することであったり、学会で発表したり、質問したりすることであり、また、ときには、面接などで自分の研究について説明したりすることでしょう。若い方々には積極的にいろんなコミュニティーに参加して知見を深めてほしいと思います。

## インタビュー

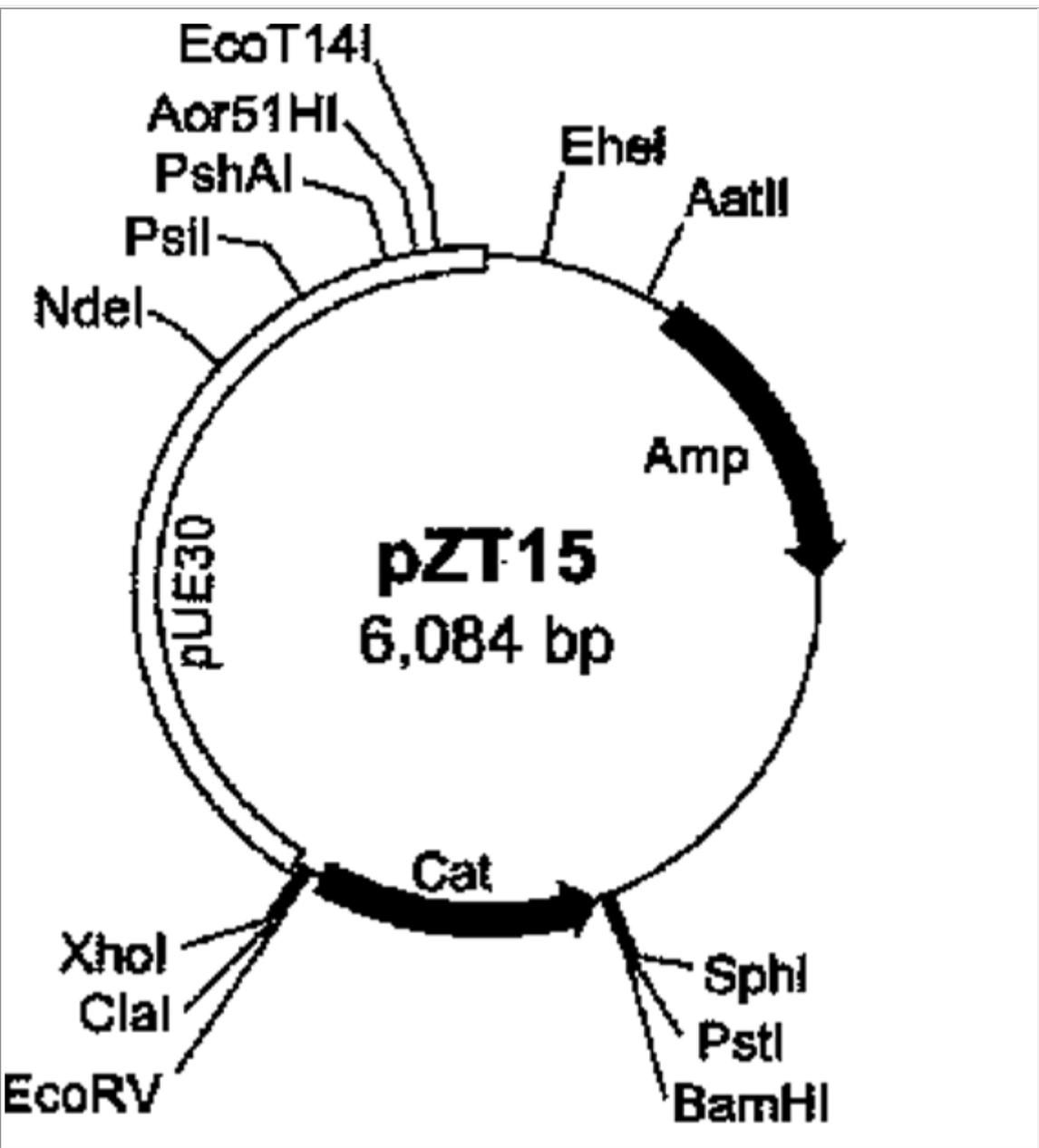
今日はおもしろいお話をありがとうございました。

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| 特許<br>コー<br>ド     | P04A006334              |
| 発明<br>の<br>名<br>称 | 放射線抵抗性細菌／大腸菌シャトルベクター    |
| 出願<br>番<br>号      | 特願平 14-046377           |
| 公開<br>番<br>号      | 特開 2003-245078          |
| 出願                | 平成14年2月22日(2002. 2. 22) |

|              |   |
|--------------|---|
| 日<br>(表示用)   |   |
| 公開日<br>(表示用) | 平成15年9月2日(2003. 9. 2)   |
| 発明者          | 鳴海 一成<br>屠 振力<br>佐藤 勝也  |
| 出願人          | 日本原子力研究所  |
| 発明の概要        | <p>【課題】本発明においては、デインコッカス属細菌を形質転換するために有用な新規ベクターであって、デインコッカス属細菌中で抗生物質などの選択圧のない条件において安定に存在できる新規ベクターおよびデインコッカス属細菌とその他の細菌の両方で複製可能なシャトルベクターであって、デインコッカス属細菌中で抗生物質などの選択圧のない条件において安定に存在できる新規シャトルベクターを提供することを課題とする。</p> <p>【解決手段】本発明の発明者らは、鋭意研究を進めた結果、放射線抵抗性細菌デインコッカス・ラジオプグナンス由来の内在性プラスミドである pUE30 またはその誘導体を用いることにより、上述した課題を解決することができることを見だし、本発明の課題を解決した。</p>  |
| 従来技術、競合技術の概要 | <p>生物の放射線耐性は、生物種によって大きく異なるが、放射線抵抗性細菌と総称される、放射線に抵抗性の微生物群が存在することが知られている。代表的な放射線抵抗性細菌として、デインコッカス(Deinococcus)属細菌が知られており、現在までに7種類の菌種(D. radiodurans, D. radiopugnans, D. radiophilus, D. grandis, D. proteolyticus, D. geothermalis, D. murrayi)が同定されている(Ferreira et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 939-947, 1997)。そして、これらの菌の放射線耐性は、大腸菌の約100倍、ヒトの細胞の1,000倍以上であることも知られている。もしこれらの放射線抵抗性細菌に、難分解性の物質や毒性を持つ物質などを除去する際に使用される外来遺伝子を遺伝子工学的手法により導入して形質転換することができれば、これらの細菌を使用して放射性物質で汚染された廃棄物中に含まれる難分解性の物質</p> |

|                   |  |
|-------------------|--|
|                   | <p>や毒性を持つ物質などを除去することができると考えられている。現在までに外来遺伝子をデインコッカス属細菌に取り込ませ、異種タンパク質を発現させた例として、デインコッカス・ラジオデュランスにおいてトルエンジオキシゲナーゼを発現させ、難分解性のトルエンをより分解しやすい物質に変換した例(Lange et al., Nature Biotechnol., 16: 929-933, 1998)、デインコッカス・ラジオデュランスに2価水銀イオン還元酵素を発現させ、2価水銀イオンをより毒性の低い揮発性金属水銀に還元した例(Brim et al., Nature Biotechnol., 18: 85-90, 2000)が知られている。しかし、これまでに、デインコッカス・ラジオデュランス以外のデインコッカス属細菌を、外来遺伝子を含むプラスミドベクターで形質転換した例はない。また、これらの形質転換体の作製においては、デインコッカス属細菌では自律複製できないインテグレーション型プラスミドが使用されているため、コピー数の制御ができない点、発現するタンパク質が少量である点、培養液に抗生物質の添加が必要である点、などの欠点が存在していた。これらの欠点を克服すべく、デインコッカス・ラジオデュランス/大腸菌シャトルベクターpRAD1が、D. radiodurans Sark株由来のプラスミドpUE10のレプリコンと大腸菌ベクターpMTL23を用いて開発された(Meima および Lidstrom, Appl. Environ. Microbiol., 66: 3856-3867, 2000)。しかしながら、これまでに、pRAD1を用いて、デインコッカス・ラジオデュランス以外のデインコッカス属細菌を形質転換したという報告はない。また、pRAD1の分配安定性が悪いため、pRAD1は抗生物質クロラムフェニコールを含む選択培地では安定に複製できるが、クロラムフェニコールを含まない非選択培地ではpRAD1を含有する細菌の出現頻度を高く維持することができず、したがって安定に存在できないという欠点を有している。この欠点は、外来遺伝子を導入した放射線抵抗性細菌を、野外開放系に放出する場合に特に問題になる。なぜなら、pRAD1を含有する細菌の出現頻度を高く維持するために、放射性物質で汚染された土壌や廃水などの環境中で抗生物質濃度を一定に保つことは非常に難しいばかりではなく、野外に抗生物質を放出することにより、必要のない抗生物質耐性菌の出現の可能性を高めることにもなり、かえって環境を汚染してしまうことにもなりかねないからである。</p> |
| <p>産業上の用途利用分野</p> | <p>本発明は、デインコッカス属細菌の細胞内で複製可能な新規ベクター、デインコッカス属細菌と大腸菌の両方の細胞内で複製可能な新規シャトルベクター、このシャトルベクターを組み込んでなるシャトルベクター、及びこれらシャトルベクターをデインコッカス属細菌に導入することにより得られた形質転換株に関するものである。</p>  |
| <p>特許請求の範囲</p>    | <p>【請求項1】 デインコッカス・ラジオプグナンス(Deinococcus radiopugnans) ATCC19172由来の内在性プラスミドpUE30またはその誘導体であって、デインコッカス属細菌中で自律複製可能なプラスミド。</p>   |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <p>困</p>                          | <p>【請求項2】 誘導体が、pUE30 の複製に関わる領域を少なくとも含む、請求項 1 に記載のプラスミド。</p> <p>【請求項3】 形質転換したデイノコッカス属細菌中で、外来遺伝子を発現することができる、請求項 1 または 2 に記載のプラスミド。</p> <p>【請求項4】 内在性プラスミド pUE30 が SEQ ID NO: 1 で示される塩基配列を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。</p> <p>【請求項5】 デイノコッカス・ラジオプグナンス (<i>Deinococcus radiopugnans</i>) ATCC19172 由来の内在性プラスミド pUE30 またはその誘導体と、大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) で自律複製可能なプラスミドまたはその誘導体を含み、デイノコッカス属細菌中および大腸菌中で複製可能なシャトルベクター。</p> <p>【請求項6】 pUE30 の誘導体が pUE30 の複製に関わる領域を少なくとも含み、大腸菌で自律複製可能なプラスミドの誘導体が当該プラスミドの複製に関わる領域を少なくとも含む、請求項 5 に記載のシャトルベクター。</p> <p>【請求項7】 大腸菌で自律複製可能なプラスミドが、pUC18、pUC19、pHSG298、pHSG299、pBR322、pSC101、および pGBM5 からなる群から選択される、請求項 5 または 6 に記載のシャトルベクター。</p> <p>【請求項8】 さらにルシフェラーゼ酵素遺伝子を含む、請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載のシャトルベクター。</p> <p>【請求項9】 形質転換したデイノコッカス属細菌中で、外来遺伝子を発現することができる、請求項 5～8 のいずれか 1 項に記載のシャトルベクター。</p> <p>【請求項10】 請求項 5～9 のいずれか 1 項に記載のシャトルベクターを含む形質転換体。</p> |
| <p>国際<br/>特許<br/>分類<br/>(IPC)</p> | <p>C12N 15/09<br/>C12N 1/15<br/>C12N 1/19<br/>C12N 1/21<br/>C12N 5/10<br/>G21F 9/00</p>  |

|               |   |
|---------------|---|
| <p>画像</p>     |  <p>The diagram shows a circular plasmid map for pZT15, which is 6,084 base pairs (bp) in size. The map includes the following features:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Origin of Replication:</b> pUE30, located on the left side of the circle.</li> <li><b>Antibiotic Resistance Genes:</b> Amp<sup>r</sup> (ampicillin resistance) and Cat (catalase), both represented by thick black arcs with arrows indicating their orientation.</li> <li><b>Restriction Enzyme Sites:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Top: EcoT14I, Aor51HI, PshAI, PstI, NdeI, EhfI, AatII.</li> <li>Bottom: XhoI, ClaI, EcoRV, SphI, PstI, BamHI.</li> </ul> </li> </ul> |
| <p>データ収録日</p> | <p>2005年3月9日</p>  |
| <p>整理番号</p>   | <p>高崎 1324</p>  |

※ ライセンスをご希望の方、特許の内容に興味を持たれた方は、下記問合せ先にご相談下さい。

問合せ  
先

独立行政法人日本原子力研究開発機構 産学連携推進部

URL: <http://www.jaea.go.jp>

E-mail: [sangaku@jaea.go.jp](mailto:sangaku@jaea.go.jp)

Address: 〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地  
の 4

Tel: 029-282-5124

Fax: 029-282-6365

