

嫌気的環境汚染物質分解菌の 遺伝子導入・破壊系の開発

野尻 秀昭（東京大学生物生産工学研究センター）

背景と目的

嫌気性細菌の環境汚染物質分解能力を利用したバイオレメディエーション技術の開発の重要性は高い

- ① 嫌気環境の汚染が頻発している
- ② 他の物理化学的手法より浄化コストが低い

分解能を利用・制御するため、遺伝子レベルでの解析が求められている

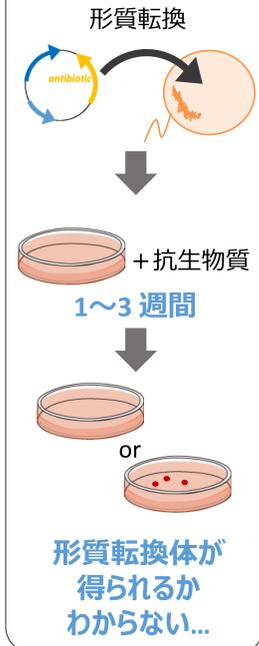
- ① 遺伝子組換え体の検出システムの開発が不十分
- ② 有用嫌気性細菌の単離・培養が困難
- ③ 嫌気性菌の培養には時間がかかることが多い

遺伝子機能の解析に大きな後れ
有用嫌気性細菌の遺伝子組換え法（遺伝子導入や破壊）は確立されていないものが多い

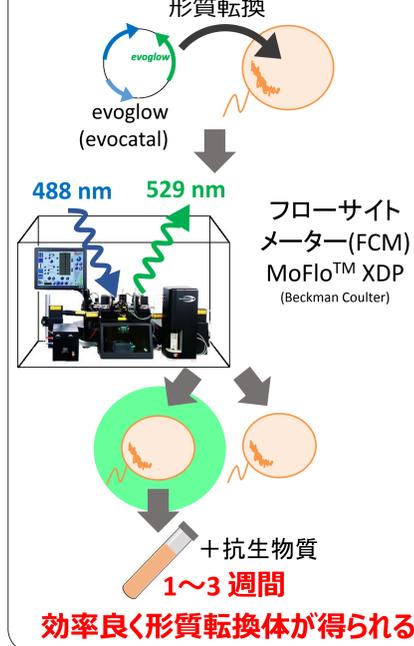
目的 培養を行わずに一細胞レベルで改変の起こった細胞を検出できるシステムの構築

- フローサイトメーターの利用
- 嫌気条件でも蛍光を発するタンパク質の利用

従来的方法



今回実行する方法



(1) FCMを利用するための環境整備

- FCM用ビニールチャンバーの設置
- 嫌気化手法の確立
- 嫌気化の評価
- 改良点の洗い出し

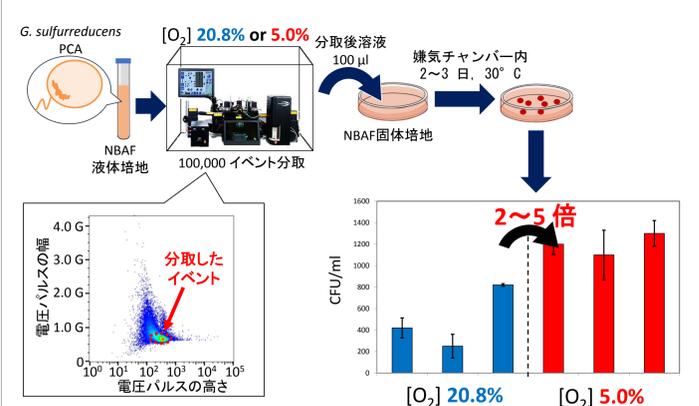
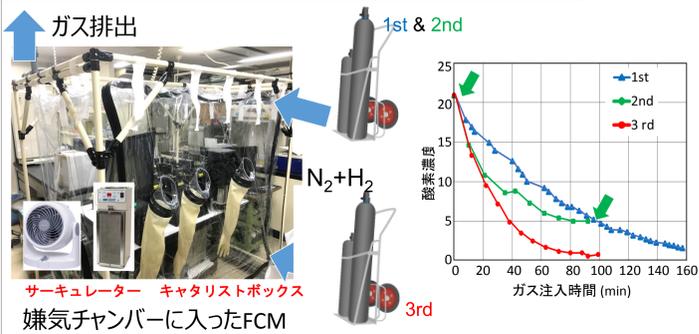
(2) 蛍光タンパク質の選択

- 発現用大腸菌の作製
- 好気条件下 FCM での蛍光測定
- 嫌気条件下 FCM での蛍光測定
- タンパク質発現量の確認

(3) 有用嫌気性菌での実証試験

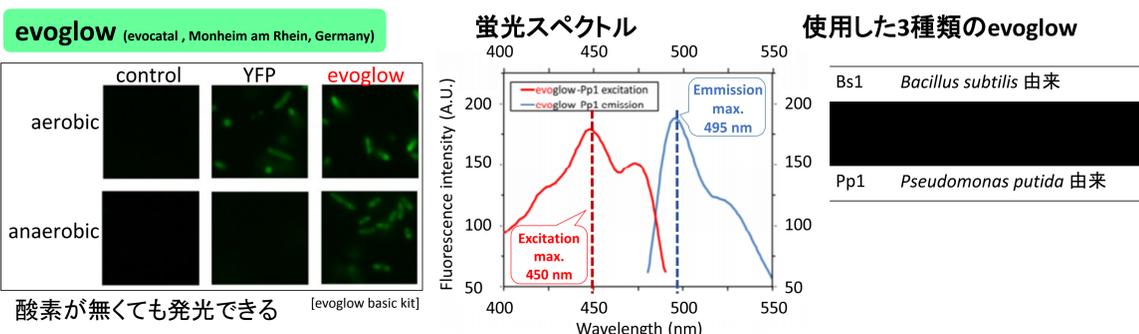
- *Geobacter sulfurreducens* PCA
- プラスミド保持株の作製
- 染色体挿入株の作製

嫌気FCM測定環境の整備

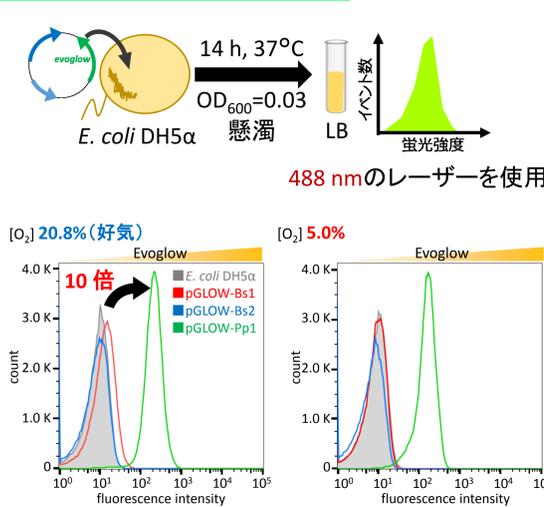


- 混合ガスと触媒を用いれば酸素濃度を下げることができた(20.8→1.6%、FCM非稼働時)
- 嫌気条件をさらに向上させる方策の確立
- FCMを嫌気的に使う手法確立が重要

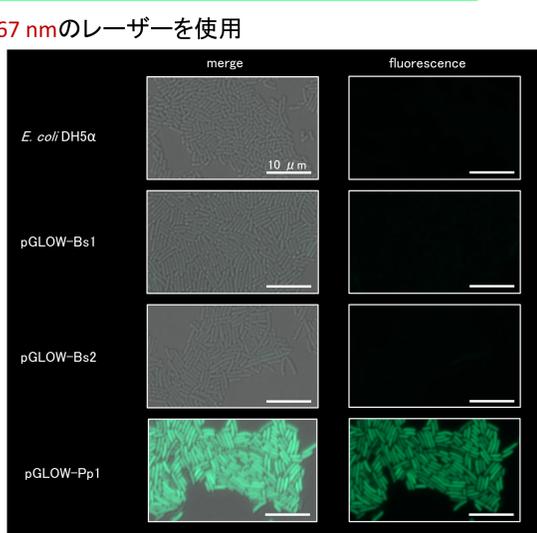
蛍光タンパク質の選択



FCMによる蛍光強度測定



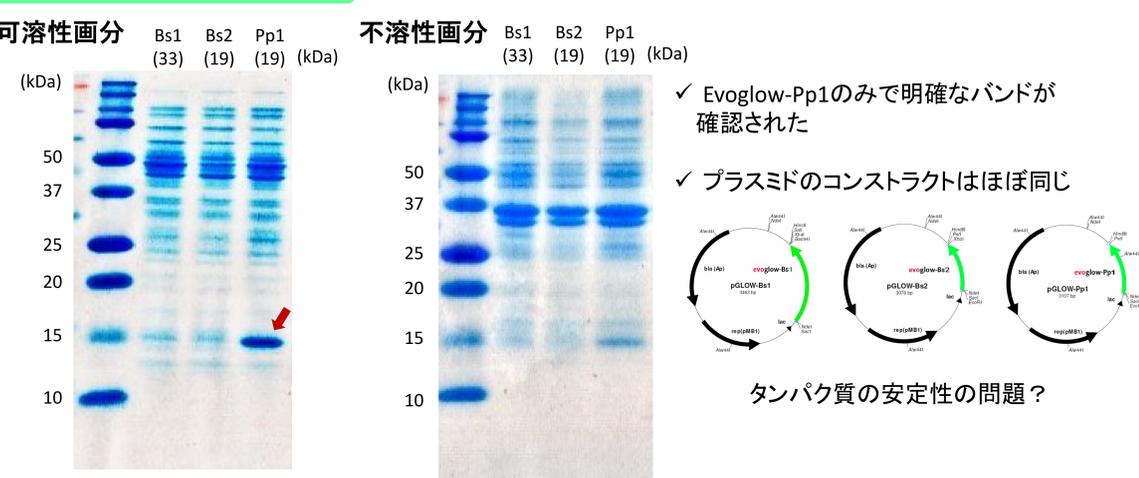
顕微鏡観察による蛍光強度の確認



Evoglow-Pp1のみで蛍光が確認された
→ レーザーの波長が最適ではない？

Evoglow-Bs1やBs2で蛍光が確認できないのは
レーザーの波長の問題ではない

タンパク質発現量の確認



- pGLOW-Pp1でのみ強い蛍光が見られた
- タンパク質の発現量(細胞内の存在量)が重要
- ターゲットの細菌ごとに最適な高発現プロモーターを選択し、同時にタンパク質の安定性も高める必要がある

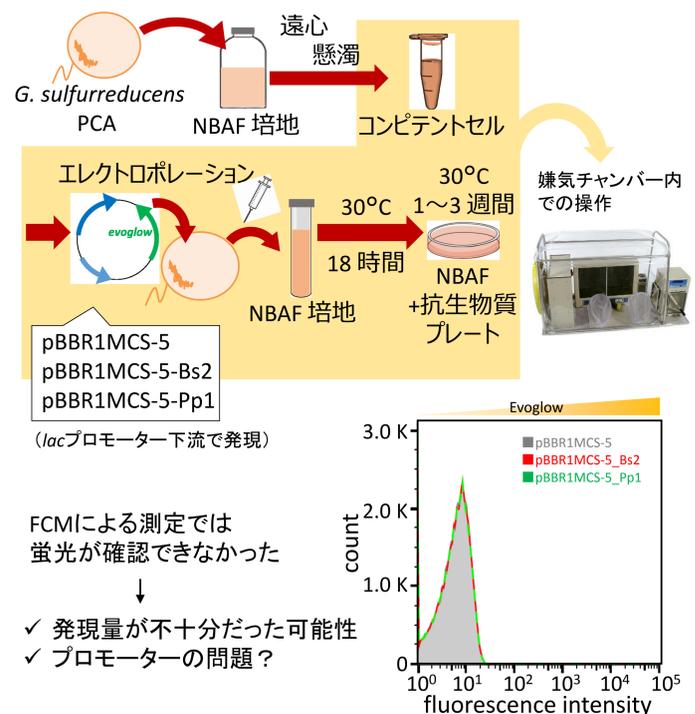
参考文献

Caccavo FJ et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol., 60:3752-3759
 Coppi MV et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol., 67(7):3180-3187
 Drepper T et al., 2007, Nat. Biotechnol., 25(4): 443-445
 Kasai Y et al., 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72(5):3586-3592
 Kasai Y et al., 2007, Environ. Sci. Technol. 41(17):6222-6227
 Kovach ME et al., 1995, Gene, 166(1):175-176
 Methé BA et al., 2003, Science, 302(5652):1967-1969
 Murphy KC et al., 2000, Gene, 246:321-330
 Park I and Kim BC, 2011, Biotechnol. Lett., 33(10):2043-2048
 Rooney-Varga JN et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol., 65:3056-3063
 Snoeyenbos-West OL et al., 2000, Microb. Ecol., 39:153-167
 Song J et al., 2016, Process Biochemistry, 51(1): 34-38
 Souza EC et al., 2014, International Biodeterioration & Biodegradation, 89: 88-94
 Tsién R et al., 1998, Annu. Rev. Biochem., 67:509-544

有用嫌気性菌での実証試験

Geobacter sulfurreducens PCA

- デルタプロテオバクテリア綱に属する偏性嫌気性細菌
- 炭化水素の分解、金属の還元が可能
[Caccavo FJ et al., 1994; Rooney-Varga JN et al., 1999; Snoeyenbos-West OL et al., 2000]
- 遺伝子組換え系が既に確立 [Coppi MV et al., 2001]



FCMによる測定では
蛍光が確認できなかった

- ✓ 発現量が不十分だった可能性
- ✓ プロモーターの問題？