

Title	Bacillus属プロトプラストの再生とその応用
Author(s)	赤松, 隆
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/194
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	あか 赤	まつ 松	たかし 隆
学位の種類	工	学	博 士
学位記番号	第	6902	号
学位授与の日付	昭和60年4月26日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	Bacillus属プロトプラストの再生とその応用		
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 弘輔		
	教授 合葉 修一	教授 大嶋 泰治	教授 田口 久治

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は近年特に重要視されてきた。Bacillus 属細菌を宿主とする組換えDNA 技術の中で一番問題とされている段階、すなわちプロトプラストの再生法を研究したものである。

第1章ではポリビニールピロリドンが馬や牛血清アルブミンまたはゼラチンよりも高いプロトプラスト再生率を与えることを示した。またプロトプラスト再生促進剤を含まない培地中でも高頻度で再生可能な突然変異株 (AG-5, AH-6, AH-8 および AA-7 株) を *B. subtilis* YS 11 株より分離するのに成功している。うち2株 (AG-5; rgn-1 および AH 6; rgn-2) はポリビニールピロリドン含有培地で100%の再生を得ている。これらの株はオートリシン活性の低下、フェージPBS1耐性、非運動性、細胞の伸長形態およびプロテイナーゼ活性の増加など多面発現することを認めている。また rgn-1 および 2 は *cys A* と連関していることを証明している。

第2章では *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, および *B. pumilus* のプロトプラストがポリエチレングリコールの存在下でプラスミド $pTP 4$ によって形質転換できることを示している。またクローン化ベクターと有用な挿入不活化ベクター ($pAC 1$ と $pAC 2$) を構築している。

第3章では、*B. subtilis*, *B. licheniformis* および *B. megaterium* がポリエチレン存在下で同種間のプロトプラスト融合が可能であることを示したのみでなく、異種間すなわち *B. subtilis* と他種の Bacillus 属細菌 (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* および *B. megaterium*) との間でも可能であることを示している。異種間の頻度は同種間の頻度の $1/100$ であるとしている。同種間プロトプラスト融合は遺伝子間の連関関係の検出に使用できることを示した。例えば *B. megaterium* の同種

間プロトプラスト融合によって得られる組換え体の非選択遺伝子の分離を調べて、*ilv-1*と*arg-1*、*ilv-2*と*thr-1*および*gly-1*と*trp-1*の連関を認めている。

第4章では*B. subtilis*のプロトプラスト再生培地を改良している。ポリビニールピロリドン含有再生培地と非含有の再生培地を重層させて90%以上の再生率を得るのに成功している。

論文の審査結果の要旨

本論文は*Bacillus*属細菌を宿主として使用する組換えDNA技術、および細胞融合技術に必要な単位操作、プロトプラストの再生について研究したもので次のような重要な結果を含んでいる。

- (1) ポリビニールピロリドンをプロトプラスト再生促進剤として使用することにより飛躍的に再生率を増大させたこと。
- (2) *B. subtilis*の高頻度再生変異株の分離に成功し、その遺伝子*rgn-1*と*rgn-2*は*cys A*と連関していること、および、オートリシン活性低下、フェージPBS 1耐性、非運動性、伸長した細胞形態、プロテイナーゼ活性増加などの多重発現を支配していることを示したこと。
- (3) *B. subtilis*の高頻度再生株を用いて、ポリビニールピロリドン添加の再生培地を用いると、プロトプラストの再生頻度は殆んど100%が得られること。
- (4) ポリビニールピロリドンを含有する再生培地に通常の再生培地を重層することによって、*B. subtilis*の野性株においても90%のプロトプラスト再生が可能であった。

以上のように高いプロトプラスト再生率を得るのに成功し、それを応用して次のような成果を得ている。

- (1) *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* および *B. pumilus* のプロトプラストがポリエチレングリコール存在下でプラスミド_pTP 4により形質転換できる。
- (2) *B. subtilis*, *B. licheniformis* および *B. megaterium* で同種間のプロトプラスト融合が効率よく行えることを示し、遺伝子間の連関検索に使用できた。例えば *B. megaterium* の同種間プロトプラスト融合によって得られる組換え体中での非選択遺伝子の分布から、*ilv-1*と*arg-1*、*ilv-2*と*thr-1*および*gly-1*と*try-1*の連関を見出している。
- (3) *Bacillus* 属の異種間でもプロトプラスト融合が可能であることを示した。*B. subtilis* と他種の *Bacillus* 属細菌、*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, および *B. megaterium* との間でプロトプラスト融合が可能であった。異種間では同種間の効率の1/100に低下した。

以上のように本論文は *Bacillus* 属細菌のプロトプラスト再生に有効な遺伝学および培養的手法を確立したもので、遺伝子工学の進歩に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。