

Title	好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミドの複製制御に関する研究
Author(s)	阿野, 貴司
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2816
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・（本籍）	あ	の	たか	し
	阿	野	貴	司
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	7257	号	
学位授与の日付	昭和61年3月25日			
学位授与の要件	工学研究科 醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミドの複製制御に関する研究 (主査)			
論文審査委員	教授 合葉 修一 教授 岡田 弘輔 教授 大嶋 泰治 教授 田口 久治			

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、自然界より単離した好熱性 Bacillus 属細菌が保持する薬剤耐性プラスミド、pTB19から作製した種々の小型プラスミドを用い、プラスミドの複製制御について得た基礎的知見を述べたもので、緒論、本論（4章）及び総括より成る。

プラスミドDNA複製の基本概念と既往の知見を総括し、本研究の目的とその内容の概略を緒論で述べている。

第1章では、pTB19上に2種のDNA複製決定因子 repA及び repBが存在することを種々の派生プラスミドの比較より明らかにしている。このうち repAは Bacillus subtilis 内でのみ機能するが、repBは B. subtilis、B. stearothermophilus 両宿主菌内において複製可能であることを認めている。pTB19より得た repBを含む小型プラスミド、pTB90には B. stearothermophilus の潜在性プラスミド、pBSO2に由来する1.0MDa EcoRI断片が含まれていることを示すと共に、この断片は B. stearothermophilus に対する形質転換頻度を著しく増大させ、かつ同宿主内におけるプラスミドのコピー数調節にも関与していることを明らかにしている。

第2章では、repBを含む小型プラスミド、pTB913を保持する B. stearothermophilus を用い in vitro DNA複製系の開発を試みているが、ATPを要求する熱安定なDNAポリメラーゼによるDNA合成（ポリdAT）活性を認めたもの、複製系の開発には至っていない。

第3章では、pTB913の複製必須領域について塩基配列を決定し、逆方向繰り返し配列、RepB蛋白質の構造遺伝子及びプロモーター配列を見出している。更にコピー数変異プラスミドの解析から RepB蛋白質が複製調節に関与していることを示している。

第4章では、逆方向繰り返し配列もまたコピー数調節に関与していることを明らかにしている。プロモーター活性の in vivo での検出を行うと共に Rep B 蛋白質により P1 プロモーター活性が抑制を受けることをも示している。pRBH1 と Escherichia coli のプラスミド ColE1 との類似性よりプラスミドのコピー数調節が Rep B 蛋白質及び RNA 分子間の相互作用によって行われていると考察している。

総括においては、以上の成果を要約し、Bacillus 属細菌プラスミドの複製制御に関する今後の課題について展望している。

論文の審査結果の要旨

本論文は、工業的に有用な Bacillus 属細菌における有効なベクタープラスミドの複製制御について基礎的知見をまとめたものであり、その主な成果は次のごとくである。

- (1) 好熱性 Bacillus 属細菌に由来する低コピー数プラスミド、pTB19 上に2種の複製決定因子 rep A 及び rep B が存在することを示し、それぞれの宿主域並びにコピー数が異なることを見出している。また、rep B を含む小型プラスミド、pTB90 には B. stearothermophilus の潜在性プラスミドに由来する1.0MDa EcoRI 断片が含まれており、この断片の存在が B. stearothermophilus に対する形質転換頻度を著しく増大させ、かつ同宿主内でのコピー数の低下をもたらすことを発見している。
- (2) rep B を含む多コピー数プラスミド pTB913 を用い B. stearothermophilus における in vitro DNA 複製系の開発を試みているが、その開発は未完成ではあるがその途上で、ATP を要求する熱安定なポリ dAT 合成活性という興味ある反応を見出している。
- (3) pTB913 及び pUB110 の複製必須領域につきそれぞれ塩基配列を決定した結果、両者の塩基配列はほとんど同一であることを見出している。また、本領域内に逆方向繰り返し配列、Rep B 蛋白質の構造遺伝子、及びプロモーター配列を確認しているが、コピー数変異プラスミドの解析から Rep B 蛋白質がプラスミドの複製調節に関与していることを明らかにしている。
- (4) 複製必須領域内に見出した逆方向繰り返し配列もまたコピー数調節に関与していることを明らかにしているが、Rep B 蛋白質による P1 プロモーター活性の抑制作用にも言及している。

以上の成果は、Bacillus 属細菌における有効なベクタープラスミドの複製制御に関し多くの基礎的知見を与えており生物化学工学上貢献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。