OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	好熱性細菌における宿主-ベクター系の開発とその利用
Author(s)	藤井, 幹夫
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33370
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【8】

氏名・(本籍)	藤井幹夫
学位の種類	工学博士
学位記番号	第6033号
学位授与の日付	昭和58年3月25日
学位授与の要件	工学研究科 醱酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**好熱性細菌における宿主-ベクター系の開発とその利用**
論文審査委員	(主査) 教授 合葉 修一 教授 大嶋 泰治 教授 岡田 弘輔

論文内容の要旨

本論文はプラスミドDNAによる好熱性細菌*Bacillus stearothermophilus*形質転換法と，ベクタープラスミドの開発さらに，ここで開発した宿主-ベクター系の利用に関する一連の実験的研究をまとめたもので，全体は緒論，本論3章，および総括からなっている。

緒論では好熱性細菌の特性とその工業的利用上の意義について概観し，本研究の目的とその内容の概略を述べている。

第1章では，温泉・たい肥起源の好熱性細菌を用い，プラスミドの検索を行い，遺伝マーカーとして利用可能な薬剤耐性遺伝子を保持するプラスミドpTB19，pTB20を得ている。すなわち，pTB19はカナマイシン耐性（Km^r）とテトラサイクリン耐性（Tc^r）を示し，pTB20はTc^rを示している。なお，これらのプラスミドにつき分子量，コピー数を測定し，さらに制限酵素切断地図を作成している。

第2章では，pTB19を*in vitro*で小型化しpTB90（Km^r Tc^r）を得ているが，このpTB90は*B. stearothermophilus*を高ひん度で形質転換すること，またpTB90は中温菌*Bacillus subtilis*でも自律的に複製することを見出している。pTB90を保持する*B. stearothermophilus*は65℃でもそれぞれの薬剤に耐性を示している。

第3章では，中温菌*Bacillus licheniformis*が生産する菌体外分泌酵素ペニシリナーゼの遺伝子をpTB90をベクターとして*B. stearothermophilus*に移入している。培養温度の上昇に伴いペニシリナーゼの活性は低下するが，中温菌由来のペニシリナーゼ遺伝子が好熱性細菌*B. stearothermophilus*で形質発現すること，かくして*B. stearothermophilus*で生産されるペニシリナーゼの約10～20％が可

溶性ペニシリナーゼとして菌体外に分泌されることをそれぞれ確認している。

総括においては，以上の本論各章に述べている成果を要約し，*B. stearothermophilus*の形質転換系系とpTB90の利用によって，好熱性細菌を宿主とする遺伝子操作が可能になったと結論している。

論文の審査結果の要旨

本論文は好熱性細菌の特性とその工業的利用上の意義を明らかにしたうえで，プラスミドDNAによる好熱性細菌*B. stearothermophilus*の形質転換系を新たに開発し，その利用法を明らかにしたもので，その主な成果は以下のごとくである。

(1) 抗生物質に耐性を示す種々の好熱性細菌により10種類のプラスミドを閉環状DNAとして分離しているが，そのうち2種類のプラスミド上には薬剤耐性遺伝子がコードされていることを，*B. subtilis*を形質転換することで確認しかつそれらのプラスミドの特性を検討している。すなわち，pTB19（Km^r Tc^r, 17.2Md, コピー数約1）とpTB20（Tc^r, 2.8Md, コピー数約24）である。

(2) プラスミドによる，好熱性細菌*B. stearothermophilus*の形質転換法（プロトプラスト法）を開発し，かくしてpTB19, pTB19由来の小型プラスミドpTB90（Km^r Tc^r：6.7Md）などが高ひん度で*B. stearothermophilus*のみならず*B. subtilis*をも形質転換することを確認している。なお，pTB90は*B. stearothermophilus*内においてTcを数mg/ℓ培地中に加えることによりそのコピー数を無添加の場合（約5コピー）の約4倍に増幅すること，およびpTB90には*B. subtilis*内での複製に必要な断片以外に好熱菌内での安定な複製維持に不可欠な断片（1.0Md, *Eco*RI断片）の存在をそれぞれ見出している。

(3) pTB90をベクターとして*B. stearothermophilus*へ移入した中温菌*B. licheniformis*由来のペニシリナーゼ遺伝子が48～60℃でも形質発現することを確かめ，好熱性細菌への遺伝子操作の適用による，その工業的利用の拡大の可能性を示唆している。

以上のように，本論文は好熱性細菌における宿主-ベクター系を開発し，かつ具体例をもってその利用法を明らかにしたものであり醱酵工学の発展に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。