



Title	Bacillus subtilisを宿主とする非相同的DNA配列を持つプラスミドベクターの開発
Author(s)	吉村, 浩二
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35161
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

【6】

氏名・（本籍）	よし	むら	こう	じ
学 位 の 種 類	吉	村	浩	二
学 位 記 番 号	工	学	博	士
学 位 授 与 の 日 付	第	7	0	8
学 位 授 与 の 要 件	号	0	0	号
	昭 和 61 年	2 月	6 日	
	工学研究科	醸酵工学専攻		
	学位規則第 5 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	<i>Bacillus subtilis</i> を宿主とする非相同的 DNA 配列を持つプラスミドベクターの開発			
	(主査)			
論 文 審 査 委 員	教 授 大嶋 泰治			
	教 授 合葉 修一	教 授 田口 久治	教 授 岡田 弘輔	
	教 授 山田 靖宙			

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、*Bacillus subtilis* 宿主・ベクター系において、ベクターに利用可能なプラスミドの検索、宿主染色体とは非相同的な遺伝子をベクター符号に利用し、染色体への組込みを防いだクローニングベクター及びプロモーター検索ベクターの構築についての研究をまとめたものであり、4章からなっている。

第1章では、ベクターの構築に用いるプラスミドを得るために、111株の *Bacillus* 属細菌について検索を行い、13株にプラスミドを見出している。*Bacillus amyloliquefaciens* S 294株から分離したプラスミド pFTB 14 は、分子サイズ及び制限酵素の解析では、*B. subtilis* や *B. amyloliquefaciens* で報告されている既知のいずれのプラスミド種にも該当しない。しかし、サザンハイブリダイゼーション法による解析で、pFTB 14 はこれらプラスミド種と相同性があることを認め、それら相互間の類縁性を示唆している。

第2章では、*B. amyloliquefaciens* の *ilvC*, *leuA*, *leuC* 及び *leuB* 遺伝子のクローニングと性格付けを行い、これらの遺伝子を利用してクローニングベクター pFTB 91 の構築を行っている。クローニングされた遺伝子は *B. subtilis* 宿主では正常に発現するが、*Escherichia coli* 宿主では *leuC*, *leuB* 遺伝子は正常に発現し、*ilvC* の発現は弱く、*leuA* の発現は見られないことから、遺伝子と宿主細胞による発現特異性に差を認めている。これら *ilvC*, *leuA* 遺伝子および *Staphylococcus aureus* に由来するプラスミド pTP 5 のテトラサイクリン耐性 (*tet^r*) 遺伝子をベクター符号として用い、pFTB 14 由来の DNA 複製機構を持つベクタープラスミド pFTB 91 を構築している。pFTB 91 は、*Sal I* 切断点において *ilvC* 遺伝子の、また、*Kpn I* 切断点において *tet^r* 遺伝子の挿入失活が

可能である。pFTB 91 はコピー数が染色体当たり約 10 であり、非選択的条件下では宿主細胞から脱落する。

第 3 章では、*B. amyloliquefaciens* の *trpC*, *trpD* 遺伝子のクローニングと解析を行い、*trp* クラスターの構造は腸内細菌のものとよく似ていることを認めている。この *trpD*⁺ 遺伝子が自身のプロモーターを持たないことを利用して、これを選択符号としたプロモーター検出ベクター pFTB 281 を構築している。この pFTB 281 を用いて種々の DNA 起源から、*B. subtilis* 宿主においてプロモーター機能を示す DNA 断片を容易に得ることができる。

4 章では、上記の研究結果をまとめ、今後の課題について述べている。

論文の審査結果の要旨

B. subtilis 168 株は、*E. coli* K-12 株および *Saccharomyces cerevisiae* 種の酵母と並び、組換え DNA 実験における汎用の B1 宿主に認定されている。しかし、ベクターの種類が少ないことがその実用性を制限している。その原因のひとつは、*B. subtilis* 細胞では相同な DNA 鎖間での乗換が高頻度で起こることから、その染色体遺伝子を適当なプラスミドに結合して、ベクターとしての実用性を高めることが困難なためである。本論文は、この問題の解決を目標とした研究をまとめたものであり、以下の成果を得ている。

- (1) 既知のプラスミド種に本研究で検出した 2 種を加えて、合計 7 種、6 種類の *B. subtilis* あるいは *B. amyloliquefaciens* に内在するプラスミドについて検討し、これらすべてがコピー数約 10 の潜在性の小型プラスミド (3.4 ~ 5.4 Md) であり、相互に制限酵素地図は異なるが DNA 塩基配列に相同性が認められることから、それらの同一性を示唆している。
- (2) *B. subtilis* 染色体とは相同性の無い *B. amyloliquefaciens* 染色体遺伝子を、*B. amyloliquefaciens* のプラスミドに由来する自律複製能を持つ DNA 断片に結合することにより、組換え能を有する野生型 *B. subtilis* 宿主に使用可能な、実用性の高いクローニングベクターの構築を行い、工業的に実用される多くの *Bacillus* 属株を宿主とする宿主・ベクター系を構築することの可能性を示した。
- (3) *B. amyloliquefaciens* のトリプトファン合成遺伝子を利用して、*B. subtilis* 宿主用プロモーター検出ベクターを構築し、これが十分機能することを示した。

以上の成果は *B. subtilis* 株のみならず、一般の *Bacillus* 属工業実用株における宿主・ベクター系構築に重要な知見を与えるものである。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。