OUKA
Osaka University Knowledge Archive

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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【6】

氏名・（本籍）	吉村浩二
学位の種類	工学博士
学位記番号	第7080号
学位授与の日付	昭和61年2月6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	*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
論文審査委員	（主査）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。