

Title	温度調節型発現ベクターを利用した大腸菌によるフェニルアラニン生産
Author(s)	杉本, 俊二郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35466
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	杉 本 俊 二 郎
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	第 7 7 6 4 号
学位授与の日付	昭 和 6 2 年 3 月 2 6 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	温度調節型発現ベクターを利用した大腸菌によるフェニルアラニン生産
論文審査委員	(主査) 教 授 田 口 久 治 教 授 合 葉 修 一 教 授 岡 田 弘 輔 教 授 大 嶋 泰 治 教 授 二 井 將 光 教 授 山 田 靖 宙

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は λ ファージの $C I^{857}$ リプレッサー遺伝子と、 P_R 及び P_L プロモーター遺伝子領域を有する発現ベクターの、大腸菌によるフェニルアラニン生産への応用を論じたものであり、緒論、本文4章と総括からなっている。

緒論では、遺伝子の発現調節を醗酵生産に応用するさいの問題点、ならびにフェニルアラニンの醗酵生産に関する研究の現状を論じ、本研究の目的と意義を明らかにするとともに本論文の概要を述べている。

第1章では、 P_R - P_L デナムプロモーター下流に接続した β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現と温度との関係を検討し、 β -ガラクトシダーゼ生産と、それに特異的なmRNAの合成が培養温度により調節できること、また、培養温度を35°Cと42°Cに切り換えることにより、 β -ガラクトシダーゼ生産及び特異的mRNA合成の誘導、抑制を繰り返し得ることを明らかにしている。

第2章では、温度調節型発現ベクターに、フェニルアラニン生合成経路の調節酵素をコードする $pheA$ と $aroF$ 遺伝子をクローニングし、フェニルアラニン生産に対する温度の影響を、一定温度での培養により検討した結果、フェニルアラニン生産は温度が高くなるほど向上するが、40°C以上では単位菌体量当りの両調節酵素活性は引き続き上昇するにもかかわらず、菌体の増殖が著しく阻害され、生産は低下することが判明し、フェニルアラニンの生産量は、至適な温度38.5°Cで18.5 g/lが得られている。

第3章では、温度調節型発現ベクターにクローニングした $pheA$ と $aroF$ 遺伝子を高度に発現させた場合に起こる菌体の増殖阻害の原因を、培養温度のシフトアップにより検討し、強度の遺伝子発現により起こる死滅が、 $pheA$ 遺伝子に特異適なmRNAの過剰な合成に起因すると推論している。

第4章では、第3章で得られた結果に基づき、熱交換器型培養槽とジャーフェメンターを連結した循環培養を行い、クローニングした *pheA* と *aroF* 遺伝子に由来する酵素の活性を調節すると同時に、遺伝子の高発現に起因する菌体の死滅を回避し、フェニアラニン生産を向上させることを検討した結果、単槽回分培養では得られない $28.5 \text{ g} / \ell$ のフェニアラニン生産が達成されている。

総括では、本研究で得られた成果をまとめている。

論文の審査結果の要旨

本論文は、 λ ファージの P_R および P_L プロモーターが温度感受性 $C I^{857}$ リプレッサーにより調節され、プロモーター下流の遺伝子発現が培養温度によって調節可能である特性を、大腸菌によるフェニアラニンの生産に応用した研究をまとめたもので、得られた主な成果は次のごとくである。

- (1) $C I^{857}$ リプレッサー遺伝子と $P_R - P_L$ タンデムプロモータを有する温度調節型発現ベクターに β -ガラクトシダーゼ構造遺伝子を挿入し、大腸菌 MC1065 株を宿主として、 β -ガラクトシダーゼ生産を検討し、生産が培養温度によって任意に調節し得ること、 30°C のジャーフェメンターと 42°C の熱交換器型培養槽を連結した循環培養において、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が繰り返し誘導され、 β -ガラクトシダーゼ比活性を一定に調節できることを見いだしている。
- (2) フェニアラニン生合成経路の2種の調節酵素をコードする *pheA* と *aroF* 構造遺伝子の突然変異によるフィードバック阻害の解除を行なった後、温度調節型発現ベクターへのクローニングにより両遺伝子の発現制御部位を変更し、大腸菌 AT2471 株によるフェニアラニン生産が宿主株の約12倍に増加することを見いだしている。
- (3) 形質転換した大腸菌 AT2471 株を用い、 38.5°C のジャーフェメンターと 43.5°C の熱交換器型培養槽を組み合わせた循環培養において、それぞれの滞留時間を限定することによって、遺伝子の高発現に起因する菌体死滅を回避させ、宿主株を用いた単槽回分培養での生産に比して約1.6倍のフェニアラニン $28.5 \text{ g} / \ell$ を55時間で生産することに成功している。

以上のように本論文は、温度調節型発現ベクターに目的とする代謝生産物の遺伝子をクローニングすることにより、培養温度でその遺伝子の発現量が制御できる利点を、大腸菌によるフェニアラニン生産で実証し、遺伝子組換え技術を醸酵生産に応用する上で有用な知見を与えており、醸酵工学ならびに培養工学の発展に寄与することが大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。