



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	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35466">https://hdl.handle.net/11094/35466</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	杉 本 俊二郎
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	第 7764 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 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  $\lambda$  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醸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醸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、 $P_R - P_L$  デンデムプロモーター下流に接続した  $\beta$ -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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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、フェルニ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た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* 遺伝子に特異的な mRNA の過剰な合成に起因すくと推論している。

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ァー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、フェル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 g / l のフェル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、 $\lambda$  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<sup>857</sup> 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ル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とくである。

- (1) C I<sup>857</sup> 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  $\beta$ -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、 $\beta$ -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 のジャーファーメンターと 42°C の熱交換器型培養槽を連結した循環培養において、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が繰り返し誘導され、 $\beta$ -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) フェニル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 株によるフェニル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 のジャーファーメンターと 43.5°C の熱交換器型培養槽を組み合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 倍のフェニルアラニン 28.5 g / l 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ル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。