



Title	遺伝学的手法によるアミノ酸生産菌株の育成とその安定性について : <i>Serratia marcescens</i> のアルギニンおよびプロリン生産菌株
Author(s)	高木, 勉
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35527
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

氏名・(本籍)	高木	つとむ
学位の種類	理学	博士
学位記番号	第	7588号
学位授与の日付	昭和62年3月18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	遺伝学的手法によるアミノ酸生産菌株の育成とその安定性について — <i>Serratia marcescens</i> のアルギニンおよびプロリン生産菌株	
論文審査委員	(主査) 教授 小川 英行	
	(副査) 教授 越田 豊 教授 松原 央	

論文内容の要旨

遺伝学的手法を用いて *Serratia marcescens* のアルギニンおよびプロリン生産菌株を育成するとともに、それら生産能の安定性と安定化法について検討した。

1. アルギニン生産菌株の育成と生産能の安定化

アルギニン分解能欠損株からカナバニン耐性株を分離し、ディリプレッション変異株 (aru arg R 2) を得た。また、[pro A/B arg D arg R 3] 三重変異株からアルギニン存在下で 3, 4-デヒドロプロリン耐性株を分離し、N-acetylglutamate synthase のフィードバック阻害脱感作変異株 (arg A 1) を得た。

ついで、ファージ P S-20 を用い、ディリプレッション変異株からのチミン要求株に arg A 1 変異を、選択マーカーとしての thy+ と同時形質導入した。得られた [aru arg R 2 arg A 1] 株は 41mg/ml のアルギニンを生産したが、その生産能は継代培養中に著しく低下した。この不安定性は、生産菌株における増殖能の低下と arg A 1 変異における幾分高い変異率によって、生産菌株が増殖能の強い arg A 酵素欠損株に淘汰され易いためであった。

arg A 酵素のグルタミン酸に対する km 値が増大した菌株は生育速度が高くなり、安定な生産能を示した。そして、フマール酸アンモニウム存在下でアルギニンを 50mg/ml 生産した。

2. *S. marcescens* におけるホスト・ベクター系の開発

S. marcescens をホストとする場合、細胞外ヌクレアーゼの産生、抗生物質に対する低感受性、制限系の存在などの障害が考えられた。

そこで、野生株から、細胞外ヌクレアーゼ非産生性、アンピシリンおよびカナマイシン感受性、かつ

制限酵素欠損性の変異株を育成した。この変異株では、形質転換頻度が約10倍上昇し、*E.coli*と同程度の低濃度の抗生物質で形質転換株を選択でき、さらには*E.coli*から調製したプラスミドDNAでの形質転換が可能になった。

一方、ベクターとしては、*E.coli*で開発された各種のプラスミドベクターを*S.marcescens*でも利用できることを見いだした。

上記の検討により、効率の良い*E.coli*の系が利用可能となり、*S.marcescens*における組換えDNA実験が実際的なものになった。

3. プロリン生産菌株の組換えDNA技術による改良

*S.marcescens*のプロリン生産菌株はpro B/Aにマップされた代謝調節変異dpr-1 (3, 4-デヒドロプロリン耐性変異)を有している。*E.coli* HB101をホストとして、ミニFプラスミドpKP1154、低コピープラミドpLG339、多コピープラスミドpBR322にdpr-1変異をクローニングした。

dpr-1組換えプラスミドはそのコピー数に応じてホストの生育速度を低下させた。そしてpBR322上のdpr-1変異は野性型菌株においてすら安定には保持されなかった。pLG339上のdpr-1変異はプロリン生産菌株では安定に保持されず、生産能の改良に使えなかった。

一方、pKP1154-dpr-1組換えプラスミドはプロリン生産菌株でも安定に保持され、その生産能を42から62mg/mlに高めた。

結論

*S.marcescens*では形質導入が可能であり、これをを利用してアルギニン生産菌株を育成した。また、*S.marcescens*に組換えDNA技術の適用できる系を開発し、プロリン生産菌株の改良にこの技術を利用した。そして、これらの遺伝学的手法で育成した菌株の生産能を安定化する方法を見いだした。

論文の審査結果の要旨

この論文は、アミノ酸酸酵目的として、今まで遺伝学的解析のほとんど行なわれていない*Serratia marcescens*に遺伝学的解析と遺伝子操作技術を導入して、アルギニンとプロリンについて最も生産性の高い株を作った研究内容を述べたものである。

一般に菌のアミノ酸合成は、リプレッサーによる転写調節と合成したアミノ酸によるフィードバック阻害とアミノ酸の分解系の3種類の系によって、その量が必要以上に増加しないように調節されている。高木君はアミノ酸合成量を上げるには、これら3つの制御を全部外してしまえば良いという考え方から、それぞれの調節を司る酵素に遺伝子学的手法で1つ1つ突然変異を導入して全ての調節系が不活性化した株をつくりあげた。しかし変異を導入する際、それぞれ固有の困難さがつきまと、それらを次々と克服する工夫がなされた。例えば、アルギニン合成のリプレッサーの不活性化した変異を分離する際に、アルギニンのアンタゴニストのカナバニンに対して耐性となった変異をとることが行なわれるが、この菌株では通常の最小培地では、その生育阻害作用が悪く、他の培地を探しグルタミン酸培地が最も効果が

あることを見つけ、これを用いて見事変異の分離に成功した。またアルギニンのフィードバック阻害を受けない変異をとるのにも更に巧妙な工夫がなされた。プロリン要求性の変異 (pro B Aの変異) がアルギニン変異 (arg Dの変異) で抑制されるようになった株、つまりプロリン合成がアルギニンによって制御されている変異株に注目して、それからアルギニン存在下でプロリンのアノログ耐性になったものを分離して、アルギニンのフィードバック阻害脱感作した変異をとるのに成功した。このようにして分離したそれぞれの制御を外す変異を 1 つの株に同時に入れるのに、初めてファージ S P -20 による形質導入を用い、それに見事成功してこの系で形質導入法が有用であることを示した。しかしこのようにして全ての制御を外した株は不安定で、そのままでは醸酵には向かなかったので、それから安定で生育速度の早いものを選択して、96時間培養で 50mg / ml のアルギニンを生産させることに成功した。これは最高の記録である。プロリン生合成株も同じように作られたが、これには更に遺伝子組換え技術が導入された。そのために先ず、大腸菌 K12 株のベクター系が使用できることを証明し、そのベクターを導入し選択を容易にするために、この菌から抗生物質高感受性で制限系が欠損し、更に細胞外に産生されるヌクレアーゼが欠損した株が作られた。この株を利用して、プロリンのフィードバック阻害脱感作した変異遺伝子をクローニングして、それを導入した結果プロリン生産能を 62mg / ml という抜群の成果を収めた。これらの結果は遺伝学的手法を高度に駆使したものであり、実用株を育成した意義は大きい。理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。