Osaka University Knowledge Archive

Title	好熱性細菌Bacillus stearothermophilusにおける宿主・ベクター系の改良
Author(s)	張, 敏
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36449
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

【10】

氏名・（本籍）	張（ちょう）　敏（びん）
学位の種類	工　学　博　士
学位記番号	第　8649　号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	工学研究科醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**好熱性細菌 *Bacillus stearothermophilus* における宿主・ベクター系の改良**
論文審査委員	（主査） 教授 岡田 弘輔 教授 大嶋 泰治　教授 山田 靖宙　教授 菅 健一 教授 高野 光男　教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

遺伝子操作を用いて有用物質を高生産するためには，組み換えプラスミドを安定化させることが必要である。本研究は好熱性細菌，*Bacillus stearothermophilus* を宿主とし，α－アミラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて，その安定化を研究したもので，併せて実用的な宿主・ベクター系を開発したものである。

第1章では，ベクタープラスミドpTB90にα－アミラーゼ遺伝子をクローン化したpAT9を*B. stearothermohilus* に導入した形質転換体（Amy^{+}）が種々の培養条件下で一定の大きさの欠失が起りpAT9sdに変化するとともに表現型がAmy^{+}になること，およびその原因がα－アミラーゼ遺伝子の両端に存在する相同性領域に依存する欠失であることを明らかにしている。また相同領域の一方を除去して得られたpATH9は安定である。

第2章においては，NTG処理によって得たpTRA117（Km^{r}，PCase^{+}）は高温で染色体に組み込まれ，低温では染色体の一部を伴って切り出されプラスミド化することを述べている。この経過はRec機能に依存する。かくして得られたプラスミドpTRZ117は高温でも安定に保持されるが，その原因はKNTaseの耐熱性の上昇と，染色体由来の未知DNA断片の挿入にあるとしている。
pTRZ117から熱安定性のベクターpTRZ90を作成している。

第3章では，ベクタープラスミド，pTRZ90にα－アミラーゼ遺伝子を挿入して得たpATH9とpZAM26をそれぞれ *B.stearothermophilus* CR201株に導入して比較している。形質転換体の増殖，α－アミラーゼの生産およびプラスミドの安定性においてGR201（pZAM26）が優れていることを認め，pTRZ90の有用性を証明している。

第４章では，*B.stearothermophilus* ＳＩＣＩ を天然より分離し，この株が *repA* 型および *repB* 型プラスミドのいずれによっても形質転換でき，プロトプラストの再生速度，再生率ともに高く宿主として有用であるとしている。

論文の審査結果の要旨

遺伝子操作を施した微生物を物質生産に利用するためには，組み換えプラスミドが安定に保持される必要がある。本研究では好熱性細菌，*B.stearothermophilus* を宿主として安定かつ実用的な宿主・ベクター系を開発したもので，次のような重要な結論を得ている。

(1) *B.stearothermophilus* にｐＴＢ９０をベクターとしてα－アミラーゼ遺伝子をクローン化すると，特定の欠失が起り，α－アミラーゼの生産性が失われる。これはα－アミラーゼの両端に存在する塩基配列相同領域が原因でその中間領域が欠損すると推定している。この欠失は相同領域の一方を予め欠失させておくことにより防ぐことができる。

(2) プラスミドｐＴＲＡ１１７は高温で *B.stearothermophilus* の *rec* に依存して染色体に組み込まれ，低温では染色体の一部を伴って切り出される。この過程を用いて高温でも安定なプラスミドｐＴＲＺ１１７を得ている。ｐＴＲＺ１１７らベクターｐＴＲＺ９０を作成している。

(3) このように作成したｐＴＲＺ９０にα－アミラーゼ遺伝子をクローン化し，*B.stearothermophilus* に導入すると，宿主の増殖，アミラーゼ生産性，プラスミドの安定性において優れており，ｐＴＲＺ９０は実用に耐えるものである。

(4) 新しく分離した *B.stearothermophilus* ＳＩＣＩ 株は *rep A* および *rep B* 型プラスミドのいずれによっても形質転換ができ，またプロトプラスト再生速度および再生率ともに高く宿主として有用であることを示している。

以上のように本論文は好熱性細菌 *B.stearothermophilus* の宿主・ベクター系に関して多くの基礎ならびに応用に関する知見を与えており，遺伝子工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。