



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36449">https://hdl.handle.net/11094/36449</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">大阪大学の博士論文について</a>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)	張	敏
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	工学研究科醸酵工学専攻	
	学位規則第5条第1項該当	
学位論文題目	好熱性細菌 <i>Bacillus stearothermophilus</i> における宿主・ベクター系の改良	
(主査)		
論文審査委員	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、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングした pAT9 を *B. stearothermophilus* に導入した形質転換体 (Amy<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>になること、およびその原因が  $\alpha$ -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 (Kmr, PCase<sup>+</sup>) 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、その原因是 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  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングすると、特定の欠失が起り、 $\alpha$ -アミラーゼの生産性が失われる。これは $\alpha$ -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からベクターpTRZ90を作成している。
- (3) このように作成したpTRZ90に $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、*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repAおよびrepB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。