

Title	遺伝子組換えを用いた耐熱性β-ガラクトシダーゼ生産菌株の育種
Author(s)	平田, 晴久
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36672
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【5】

氏名・(本籍)	ひら 平	た 田	はる 晴	ひさ 久		
学位の種類	工	学	博	士		
学位記番号	第	8 2 2 4	号			
学位授与の日付	昭和 63 年 5 月 11 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	遺伝子組換えを用いた耐熱性 β -ガラクトシダーゼ生産菌株の育種					
論文審査委員	(主査)					
	教授	岡田 弘輔				
	(副査)					
	教授	大嶋 泰治	教授	高野 光男	教授	菅 健一
	教授	山田 靖宙	教授	二井 将光		

論文内容の要旨

高温での運転可能な乳糖分解プロセスの実用化に必要な耐熱性 β -ガラクトシダーゼ生産株の育種を目的として、好熱性細菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローン化し、その構造と発現機構を解析している。また本酵素の *Bacillus subtilis* での生産と固定化法についても検討している。

第 1 章では、*B. stearothermophilus* I AM11001 株の 3 種類の β -ガラクトシダーゼを精製し、 β -ガラクトシダーゼ II と III は同じサブユニットからなるが会合度が異なるアイソザイムであることを明らかにしている。また β -ガラクトシダーゼ I は他の酵素とは熱安定性、分子量が異なる別種の蛋白質であり、応用的観点から最も優れたものであるとしている。

第 2 章では、これら β -ガラクトシダーゼ遺伝子を大腸菌を宿主としてクローン化し、遺伝子の構造ならびに、大腸菌または枯草菌に導入して生産される遺伝子産物の性質を調べている。 β -ガラクトシダーゼ II と III は同一遺伝子 *bgaA* にコードされ、 β -ガラクトシダーゼ I は別の遺伝子 *bgaB* にコードされることを結論している。また *bgaB* 遺伝子は枯草菌中で高発現され、 β -ガラクトシダーゼが宿主菌の細胞蛋白質の 7% を占めることを見出している。

第 3 章では、*bgaB* 遺伝子の塩基配列を決定し、プロモーター領域を同定した結果、 β -ガラクトシダーゼ I は従来知られている他の β -ガラクトシダーゼとアミノ酸配列の相同性が全く認められないこと、*bgaB* のプロモータが枯草菌で効率よく機能することを見出し、 β -ガラクトシダーゼの高発現に寄与していることを見出している。

第 4 章では枯草菌における β -ガラクトシダーゼ I の生産のための培養条件、精製法について研究し、枯草菌は β -ガラクトシダーゼを構成生産し、生産量は培養液 1 ℓ 当り 100mg に達し、枯草菌で生産し

た β -ガラクトシダーゼ I は熱処理によって効率よく精製できることを認めている。また β -ガラクトシダーゼを固定化し、60°Cで乳糖を連続分解すると活性半減期が100~340時間と安定であると報告している。

論文の審査結果の要旨

本論文は食品工業上有用な耐熱性の β -ガラクトシダーゼ生産菌を遺伝子工学の手法を用いて育種したものであり、次のような重要な成果を含んでいる。

- (1) 中等度耐熱性菌, *Bacillus stearothermophilus* は3種類の β -ガラクトシダーゼを生産し、そのうち2種は***bgaA*** 遺伝子にコードされているサブユニット蛋白質の会合度の差によって生じること、ならびに他のアイソザイム、 β -ガラクトシダーゼ I は他の遺伝子、***bgaB*** にコードされ、より耐熱性であることを明らかにしている。
- (2) ***bgaB*** 遺伝子の塩基配列を決定し、それより推定されるアミノ酸一次配列が従来知られている β -ガラクトシダーゼのものとは相同性が認められない新しいものであることを証明している。
- (3) ***bgaB*** 遺伝子のプロモーターは枯草菌中で高い活性を有しており、枯草菌細胞蛋白質の7%におよぶ β -ガラクトシダーゼを生産するほか、他の酵素遺伝子に連結すると高発現させることができ、高発現ベクター作成の要素として期待される。
- (4) 中温菌の生産する耐熱性酵素は加熱処理によって容易に精製できる。枯草菌中で β -ガラクトシダーゼを生産させると、加熱処理により80%純度まで精製でき、純化が容易になった。
- (5) β -ガラクトシダーゼ I を固定化し、乳糖を60°Cで連続分解を行い、活性半減期100~340時間を得ている。これは充分実用化に耐える値である。

以上の成果は遺伝子工学、酵素工学ならびに食品工学に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。