



Title	遺伝子組換えによる <i>Rhizopus</i> グルコアミラーゼ生産酵母の育種とそれを用いた穀類からの生澱粉直接発酵
Author(s)	芦刈, 俊彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37356
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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)	あし 芦	かり 刈	とし 俊	ひこ 彦
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	9 4 6 9	号	
学位授与の日付	平成 3 年 2 月 1 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	遺伝子組換えによる <i>Rhizopus</i> グルコアミラーゼ生産酵母の育種とそれを用いた穀類からの生澱粉直接発酵			
論文審査委員	(主査) 教 授 大嶋 泰治	教 授 今中 忠行	教 授 高野 光男	教 授 吉田 敏臣
	教 授 山田 靖宙	教 授 菅 健一	教 授 二井 将光	

論文内容の要旨

本論文は、クモノスカビ (*Rhizopus oryzae*) から澱粉分解酵素 (グルコアミラーゼ) の遺伝子をクローニングし、酵母宿主で発現させ、その組換え体酵母を用いて穀類澱粉の直接発酵を行うことによる新しいエタノール生産方法に関する研究をとりまとめたもので、緒論、本文 5 章、総括から構成されている。

緒論では、穀類からのエタノール発酵生産方法の変遷について概説し、本論文の目的、意義、ならびに構成について示している。

第 1 章では、*R. oryzae* のグルコアミラーゼを精製し、その諸性質を明らかにするとともに、部分的なアミノ酸配列の決定について述べている。

第 2 章では、第 1 章で得られたアミノ酸配列の結果を基にしてオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて *R. oryzae* の染色体および cDNA からグルコアミラーゼ遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を決定している。さらに、既に知られている他生物種起源のグルコアミラーゼと比較することにより、グルコアミラーゼタンパク質の構造的な特徴について述べている。

第 3 章では、酵母細胞で *R. oryzae* グルコアミラーゼを効率的に生産するために、各種発現プラスミドを構築し、それらによる形質転換体酵母を造成し、プロモーター、遺伝子投与量、培養方法などについて検討を行い、組換え体酵母による効率的なグルコアミラーゼの生産方法を提示している。

第 4 章では、酵母で生産された組換え体グルコアミラーゼと天然型グルコアミラーゼの構造および酵素化学的性質について比較検討し、それらの同一性を確認している。また、アミノ末端領域に欠失を持つ、*R. oryzae* 変異グルコアミラーゼに対応する各種遺伝子を構築し、酵母で発現させることにより、その

領域の生澱粉吸着機構について明らかにしている。

第5章では、前章までに育種した *R. oryzae* グルコアミラーゼ生産酵母を用いて、各種澱粉質からの澱粉直接発酵を行い、組換え体酵母のグルコアミラーゼ生産能とエタノール生産量の相関関係を明らかにし、この酵母の有用性について検討している。

総括では、上記の結果をとりまとめるとともに、*R. oryzae* グルコアミラーゼ生産酵母を用いたエタノール生産プロセスの展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文はクモノスカビ (*Rhizopus oryzae*) からグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングし、それを酵母に導入し発現させることにより、穀類澱粉の直接発酵による、新しいエタノール生産技術の開発を目的として行った研究結果をまとめたもので、その主な成果を要約すると次のとおりである。

- (1) *R. oryzae* のグルコアミラーゼを精製し、その物理学的性質を明らかにし、*R. oryzae* のDNAからクローニングした遺伝子により形質転換された酵母株の生産するグルコアミラーゼは、天然型酵素と同じくシグナルペプチドは切除されているが、糖鎖の構造は異なることを見いだしている。
- (2) *R. oryzae* の染色体及び cDNA よりクローニングしたグルコアミラーゼ遺伝子を用いて発現プラスミドを構築し、酵母宿主におけるその発現性を検討し、i) *R. oryzae* のプロモーターは酵母宿主ではほとんど機能しないこと、ii) イントロンはスプライシングされないこと、iii) 酵素生産に対して最適遺伝子コピー数があることを明らかにしている。
- (3) *R. oryzae* のグルコアミラーゼ遺伝子について塩基配列を決定し、その塩基配列に欠失を導入した遺伝子よりのタンパク質を検討することにより、この酵素がN末端に澱粉吸着部位を、C末端区分に活性部位をもつことを見いだしている。
- (4) 形質転換酵母株による穀類澱粉の直接発酵では、これまでの単一タンパク質生産目的の育種と異なりグルコアミラーゼ遺伝子の適度な発現がエタノールの高生産に必要であることを明らかにしている。
- (5) トウモロコシ澱粉を原料とした、無蒸煮発酵方式による研究室規模のエタノール生産実験を行い、 α -アミラーゼ製剤との併用により、現行法を上回る成績をあげている。

以上のように、本論文は遺伝子工学方式による代謝能の改変を目指す、新しい微生物育種の在り方を示すものであり、発酵工学に寄与することが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。