

Title	Development of Genetic Manipulation System in Probiotic Strains of Lactobacilli and Propionibacteria
Author(s)	Kiatpapan, Pornpimon
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42738
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

氏名	キヤットぱん ほーんびもん Kiatpapan, pornpimon		
博士の専攻分野の名称	博士(工学)		
学位記番号	第 16379 号		
学位授与年月日	平成13年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文名	Development of Genetic Manipulation System in Probiotic Strains of Lactobacilli and Propionibacteria (プロバイオティック細菌、乳酸菌およびプロピオン酸菌、における遺伝子操作システムの開発研究)		
論文審査委員	(主査) 教授 室岡 義勝		
	(副査) 教授 塩谷 捨明 教授 原島 俊 助教授 金子 嘉信 助教授 山下 光雄		

論文内容の要旨

本論文は、プロバイオティック細菌(健康維持を促す細菌)である乳酸菌及びプロピオン酸菌の育種を目的として、両細菌における遺伝子操作システムの開発、異種遺伝子の発現をまとめたもので、緒論、本文5章及び総括より構成されている。

第1章では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の宿主ベクター系を確立している。まず、L137株由来の内在性プラスミド pLTK 2 の全 DNA 塩基配列を決定している。相同性検索と欠損解析から本 pLTK 2 では複製に関与する RepA タンパク質とプラス複製起点を持つローリングサークル型が存在していることを見いだしている。本 pLTK 2 を基本にして大腸菌とのシャトルベクター pRN14 を構築し、種々の条件検討の結果、エレクトロポレーション法により高効率 (2×10^4 CFU/ug) の形質転換系の開発に成功している。

第2章では、脂肪酸合成の第1段階であるアセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子群を L137 菌株よりクローニングし、その DNA 塩基配列を決定している。相同性検索、大腸菌における強制発現とプライマー伸長法により、5つの読み枠 (orf) がオペロンを形成していることなどを発見している。このことにより乳酸菌の脂肪酸要求の関係を考察している。

第3章では、種々のプロピオン酸菌で利用できる宿主ベクター系を確立している。まず、プロピオン酸菌由来の内在性プラスミド pRGO 1 の全 DNA 全塩基配列を決定している。相同性検索より6つのタンパク質読み枠 (orf) を同定している。Orf 1 は ColE1 型の複製タンパク質と相同性があり、 θ 型の複製をするものと思われる。本 pRGO 1 を基本にして大腸菌とのシャトルベクター pPK705 を構築し、種々の条件検討の結果、エレクトロポレーション法による種々のプロピオン酸菌に利用できる高効率の形質転換系の開発に成功している。

第4章では、開発したプロピオン酸菌宿主ベクターによりポルフィリン化合物前駆体の5-アミノレブリン酸 (ALA) の高発現に成功している。種々の条件検討の結果、元株の70倍生産量は向上し、ALA量は最高8.6mMに達している。

第5章では、上記のシャトルベクターを基本にして、自己プロモーター下に放線菌由来のコレステロール酸化酵素遺伝子を連結し、乳酸菌及びプロピオン酸菌で本遺伝子の発現に成功している。

総括では、本研究の成果、意義を要約し、今後の課題と展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

健康維持のため伝統的に利用されてきた、健康飲料、中でも乳酸菌、プロピオン酸菌やビフィズス菌などが、血糖値の低下やコレステロール値を調節するといわれ、現在世界的に再注目されている。しかしながら、これら細菌においては株間の特異性が高く、遺伝子解析のための遺伝子操作系が未だ一般化されてなく、その開発が待たれていた。そこで、申請者はプロバイオティック細菌（健康維持を促す細菌）である乳酸菌及びプロピオン酸菌の育種を目的として、両細菌における遺伝子操作システムを開発し、異種遺伝子の発現に成功している。

第1に、フィリッピンの伝統発酵食品から分離された、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* L137株における宿主ベクター系を確立している。まず、L137株由来の内在性プラスミド pLTK 2 の全 DNA 塩基配列を決定している。相同性検索と欠損解析から本 pLTK 2 では複製に関与する RepA タンパク質とプラス複製起点を持つローリングサークル型が存在していることを見いだしている。本 pLTK 2 の塩基配列を基本にして大腸菌とのシャトルベクター pRN14 を構築し、種々の条件検討の結果、エレクトロポレーション法により高効率 (2×10^4 CFU/ μ g) の形質転換系の開発に成功している。

第2に、脂肪酸合成の第1段階であるアセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子群を L137菌株よりクローニングし、その DNA 塩基配列を決定している。相同性検索、大腸菌における強制発現とプライマー伸長法により、5つのタンパク質読み枠 (orf) がオペロンを形成しているなどを明らかにしている。乳酸菌の脂肪酸要求性との関係を考察している。

第3に、種々のプロピオン酸菌で利用できる宿主ベクター系を確立している。プロピオン酸菌由来の内在性プラスミド pRGO 1 の全 DNA 全塩基配列を決定している。相同性検索より6つのタンパク質読み枠 (orf) を同定している。Orf 1 は ColE1 型の複製タンパク質と相同性があり、 θ 型の複製をするものと思われる。本 pRGO 1 を基本にして大腸菌とのシャトルベクター pPK705 を構築し、種々の条件検討の結果、エレクトロポレーション法による種々のプロピオン酸菌に利用できる高効率の形質転換系の開発に世界で初めて成功している。

第4に、開発したプロピオン酸菌宿主ベクターによりポルフィリン化合物前駆体の5-アミノレブリン酸 (ALA) の高発現に成功している。種々の条件検討の結果、元株の70倍生産量は向上し、ALA 量は最高8.6mM に達している。

第5に、上記のシャトルベクターを基本にして、自己プロモーター下に放線菌由来のコレステロール酸化酵素遺伝子を連結し、乳酸菌及びプロピオン酸菌で本遺伝子の発現に成功している。

以上のように、プロバイオティック細菌、*Lactobacillus* 乳酸菌および種々なプロピオン酸菌の遺伝子操作システムを世界で初めて開発し、その系を利用してコレステロール酸化酵素や5-アミノレブリン酸の高発現を行うなど工学の発展に寄与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。