OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on Biosynthesis of Vitamin B12 and the Related Compounds in Genetically Engineered Propionic Acid Bacteria
Author(s)	朴, 永哲
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45859
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	朴（パク） 永哲（エイテツ）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 18979 号
学位授与年月日	平成16年7月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Studies on Biosynthesis of Vitamin B_{12} and the Related Compounds in Genetically Engineered Propionic Acid Bacteria （プロピオン酸菌におけるビタミンB_{12}および関連物質生合成に関する遺伝子工学的研究）
論文審査委員	（主査） 教授 室岡 義勝 （副査） 教授 小林 昭雄　教授 金谷 茂則　教授 福井 希一 教授 仁平 卓也　教授 清水 浩

論文内容の要旨

本研究では、プロピオン酸菌によるビタミンB_{12}及びその関連物質の生産性向上を目指し、プロピオン酸菌の種々なプロモーター領域を取得・解析し、それらを用いて多種遺伝子発現ベクターを構築した。組換えプロピオン酸菌においてビタミンB_{12}及び関連物質の生合成に対する遺伝子導入効果を研究した。本論文は序論、第2章、第3章、第4章、及び総括から構成されている。

序論では本研究の背景をなす知見を概説し、本論文の目的と意義について述べた。ビタミンB_{12}は構造が複雑なため、工業生産は微生物発酵法によって行われており、プロピオン酸菌またはシュードモナス菌が使用されている。ビタミンB_{12}の生産性向上のためにこれら細菌の変異株の取得、高濃度発酵法などが用いられてきたが、本研究はプロピオン酸菌において遺伝子工学的なアプローチによるビタミンB_{12}および関連物質の生合成に及ぼす影響の研究を行った。

第2章では、放線菌のコレステロール酸化酵素をレポーター遺伝子として用い、プロピオン酸菌からプロモーター断片をクローニングし、解析したことについて述べた。取得したモーター領域を特定し、MultiAlinで解析した結果、プロピオン酸菌において大腸菌と違う特異的なプロモーター配列を見つけた。このモチーフはプロピオン酸菌のプロモーター活性に関与していると考えた。

第3章では、プロピオン酸菌由来の*hemB*遺伝子を光合成細菌由来の*hemA*の下流に繋ぐことにより新規オペロンを構築し、プロピオン酸菌における発現について述べた。組換え菌では、5-アミノレブリン酸（ALA）とポルフォビリノーゲンは最大4.5倍と36倍増加した。プロピオン酸菌のALA生合成経路をC4経路に転換し、新規合成されたALAはポルフィリンの生産量に著しく影響を与え10～22倍増加したことから、ALAはヘム生合成経路で一つの律速因子であることが分かった。

第4章では、ビタミンB_{12}生合成経路の分岐点である合成遺伝子とcobalt-precorrin-2からビタミンB_{12}まで行く初期と後期の生合成経路の遺伝子に着目し、様々な発現ベクターの構築について述べた。多種遺伝子発現ベクターとして、*cobA*遺伝子を*hemAB*下流に挿入し、三つの遺伝子がオペロンになる発現ベクターを構築した。*hemABcobA*

を保有するプロピオン酸菌ではビタミン B_{12} の生合成量は最大 2.2 倍になった。

総括では本研究の成果、意義を要約し、今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

ビタミン B_{12} は構造が複雑なため、工業生産は微生物発酵法によって行われており、プロピオン酸菌またはシュードモナス菌が使用されている。ビタミン B_{12} の生産性向上のためにこれら細菌の変異株の取得、高濃度発酵法などが用いられてきたが、本研究はプロピオン酸菌において遺伝子工学的なアプローチによるビタミン B_{12} および関連物質の生合成に及ぼす影響の研究を行っている。すなわち、プロピオン酸菌によるビタミン B_{12} 及びその関連物質の生産性向上を目指し、プロピオン酸菌の種々なプロモーター領域を取得・解析し、それらを用いて多種遺伝子発現ベクターを構築している。組換えプロピオン酸菌においてビタミン B_{12} 及び関連物質の生合成に対する遺伝子導入効果を研究している。

(1)放線菌のコレステロール酸化酵素をレポーター遺伝子として用い、プロピオン酸菌からプロモーター断片をクローニングし、解析している。取得したモーター領域を特定し、MultiAlin で解析した結果、プロピオン酸菌において大腸菌と違う特異的なプロモーター配列を見つけた。このモチーフはプロピオン酸菌のプロモーター活性に関与していると考えている。

(2)プロピオン酸菌由来の *hemB* 遺伝子を光合成細菌由来の *hemA* の下流に繋ぐことにより新規オペロンを構築し、プロピオン酸菌における発現を行っている。組換え菌では、5-アミノレブリン酸（ALA）とポルフォビリノーゲンは最大 4.5 倍と 36 倍増加した。プロピオン酸菌の ALA 生合成経路を C4 経路に転換し、新規合成された ALA はポルフィリンの生産量に著しく影響を与え 10～22 倍増加したことから、ALA はヘム生合成経路で一つの律速因子であることを明らかにしている。

(3)ビタミン B_{12} 生合成経路の分岐点である合成遺伝子と cobalt-precorrin-2 からビタミン B_{12} までの初期と後期の生合成経路の遺伝子に着目し、様々な発現ベクターの構築について述べている。多種遺伝子発現ベクターとして、*cobA* 遺伝子を *hemAB* 下流に挿入し、三つの遺伝子がオペロンになる発現ベクターを構築している。*hemABcobA* を保有するプロピオン酸菌ではビタミン B_{12} の生合成量は最大 2.2 倍に増加している。

以上のように、本論文はビタミン B_{12} と関連物質の生合成に関与する重要な遺伝子をクローニングし、これら遺伝子の発現によりビタミン B_{12} および関連物質の蓄積に及ぼす影響を解析し、生産性の増加に成功している。これは生物資源工学および代謝工学の発展に少なからず寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。