



# 好熱性Bacillus属細菌における新規発現ベクターの開発とその利用

池田, 隆幸

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1992-10-02

(Date of Publication)

2009-05-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1673

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3070638>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001673>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	いけ だ たか ゆき 池 田 隆 幸	(京都府)
博士の専攻分野の名称	博 士 (農学)	
学位記番号	博ろ第23号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成4年10月2日	
学位論文題目	好熱性 <i>Bacillus</i> 属細菌における新規発現ベクターの開発とその利用	

審 査 委 員	主査 教授 新 家 龍	
	教授 湯 木 昭八郎	教授 大 川 秀 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

微生物の中には55℃の高温環境下で増殖する好熱性細菌が存在する。これらは一般に高い増殖速度を示し、かつその生産する各種酵素は熱や化学的変性材に対して耐性が強いことが知られている。このような好熱性細菌を発酵工業に利用することで、耐熱性酵素の生産や培養時における冷却費の軽減等が期待され、その利用価値は極めて高いものと考えられる。近年飛躍的に発展した遺伝子操作技術をこのような好熱性細菌に適用することができれば、高い増殖速度と遺伝子導入効果による物質生産能力の飛躍的向上が期待できる。さらに、好熱菌における各種(中温菌由来、好熱菌由来)遺伝子の形質発現とその遺伝子産物を比較検討することにより、好熱菌における耐熱機構の分子解明などの基礎的研究も可能となり、応用的見地からも学術的見地からもその意義は極めて大きいと考えられた。

好熱性細菌は、大きく分けて生育温度が75℃以上の高度好熱菌と、55~75℃の中等度好熱菌とに分類される。この中で中等度好熱菌である *Bacillus caldolyticus*, *B. caldotenax*, *B. stearothermophilus* などの好熱性 *Bacillus* 属細菌は、内生孢子を形成する点で枯草菌 (*B. subtilis*) の類縁であると言える。ある特定の遺伝子をクローン化しこれら類縁菌相互にそれぞれ導入したり、中温菌と好熱菌から同一遺伝子をクローン化しその構造を明らかとすることは、酵素の耐熱性などの特性を解明する上からも進化論的立場からも興味あることである。さらに、*Bacillus* 属細菌は種々の菌体外分泌酵素を生産することから、これら酵素の利用および分泌機構の解析について研究を行う意義は大きいと考えられた。本研究は、このような観点から好熱性細菌 *B. stearothermophilus* をとりあげ、安定で薬剤耐性遺伝子の発現可能なプラスミドベクターの開発を行ったものである。さらに、全塩基配列が明らかとなった枯草菌とのシャトルベクターを構築し、枯草菌においてテトラサ

イクリン (Tc) による分泌酵素の誘導発現を検討したものである。

一般に、プラスミドをベクターとして利用する場合の理想的な条件として、1) 宿主内で自立的に複製する、2) 外来DNAの挿入可能な制限酵素切断点を複数個保持する、3) 選択マーカーを保持する、4) 分離調製が容易である、5) 分子量が小さい、6) 宿主域が広い、7) 外部因子による発現の調節ができるなどがあげられる。本研究で発見、構築したプラスミドベクターはこれらの諸条件をほとんど満たすことができると考えられた。

第1章では、自然界から種々の好熱性細菌のプラスミドを検索し、*B.subtilis* の形質転換で薬剤耐性を担う2種のプラスミドpTHT15 (Tc耐性 (Tc<sup>r</sup>)、4.5キロベースペア (kb) 及びpTHN1 (カナマイシン耐性 (Km<sup>r</sup>)、4.8kb) を分離した。これら2種類の薬剤耐性プラスミドについて基本的な性質検討を行い、詳細な制限酵素地図の作製と、それぞれの薬剤耐性遺伝子や複製開始点領域の位置を決定した。さらに、pTHT15及びpTHN1の形質転換実験から、両プラスミドが *B.stearothermophilus* CU21株で複製及び形質発現が可能であることを確認した。

第2章では、pTHT15、pTHN1、pUB110間の遺伝子レベルでの相同性をサザンハイブリダイゼーションを用いて調べた。その結果、pTHN1、pUB110のKm<sup>r</sup> 遺伝子部分、pTHT15とpUB110の複製開始点領域、及び3つのプラスミド間で膜への結合領域と考えられる部分にそれぞれ高い相同性が認められた。また、pTHN1、にコードされているKm<sup>r</sup> 酵素がpUB110のそれと同じカナマイシンヌクレオチジル転移酵素であることを確認した。さらに、pUB110とpTHT15の *B.subtilis* 及び *B.stearothermophilus* でのコピー数を調べ、不和合性であることを明らかにした。

第3章では、*B.subtilis* と *B.stearothermophilus* での6種類のプラスミド (pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194、pTP4、pTP5) の熱安定性と、形質発現の限界温度について調べた。まず、*B.subtilis* では、pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194がその生育限界温度まで安定に保持され薬剤耐性遺伝子の発現が可能であったが、pTP4とpTP5は45°C以上で複製が不安定となり宿主内から脱落することが判明した。しかし、これらの不安定なプラスミドも、pUB110と組換えプラスミドを作製し、pUB110の複製領域を導入することで安定化された。次に、*B.stearothermophilus* ではpC194、pUB110、pTHT15、pTHN1が形質転換可能であったが、pTP4とpTP5は形質転換不可能であった。宿主内における安定性を検討したところ、pC194は55°Cでほとんど宿主内から脱落したが、pTHN1は55°Cまで、pUB110、pTHT15は60°C付近まで安定に保持された。しかし、pTP4及びpTP5は、それぞれの薬剤耐性の発現自体が不可能であることが判明した。またpC194の複製開始点領域を熱安定なpTHT15の複製開始点領域に変換することで、59°Cまでクロラムフェニコール耐性 (Cm<sup>r</sup>) を安定に発現できた。これらの結果に基づいて、*B.subtilis* と *B.stearothermophilus* の両方で複製可能で3つの薬剤に耐性なシャトルベクター-pIH41およびpIH42を構築した。

第4章では、好熱菌由来プラスミドpTHT15のTc<sup>r</sup> 遺伝子の全塩基配列を決定し、その構造遺伝子のオープンリーディングフレーム、推定されるアミノ酸配列、プロモーター及びターミネーター、転写開始点をそれぞれ決定した。また、遺伝子構造の解析で、Tc<sup>r</sup> 発現がTcにより誘導されることから、プロモーター部分における発現制御機構について考察をすすめ、mRNAによるトランスレシヨナ

ルアテニューエーションモデルを提唱した。

第5章では、これらの発現制御機構の利用を目的として、まず *B.subtilis* から  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子クローニングした。得られた  $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子の塩基配列を決定し、2塩基対の欠失を除いて既知の枯草菌型  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyEm<sup>-</sup>* の塩基配列と一致することを明らかにした。次に、得られた  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子部分を *Cm<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>* プラスミド pIH4 上に存在する pTH T15由来の *Tc<sup>r</sup>* 遺伝子のプロモーター及び発現制御領域の下流に連結した。その結果、*B.subtilis* の培地へ *Tc* を添加することで  $\alpha$ -アミラーゼを誘導発現できることが明らかになった。さらに、添加される *Tc* の濃度により発現量をコントロールすることができ、500ng/ml を添加することで無添加時よりも約15倍の  $\alpha$ -アミラーゼが生産されることが判明した。また、*Tc* の添加は培養の初期及び定常期の初期のいずれにおいても可能であり、高発現すると *B.subtilis* 菌体への悪影響が考えられる蛋白質の生産に極めて有用であることが示された。

以上の結果から、本研究で構築した *B.subtilis* と *B.stearothermophilus* の間の安定なシャトルベクターを利用することにより、好熱菌を宿主とする遺伝子操作を簡単に行うことが可能になった。また、枯草菌における分泌発現系での発現制御系を構築できたことは、遺伝子組換え枯草菌の発酵生産への利用性を飛躍的に高めたものと言える。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、耐熱性酵素の生産や培養時における冷却費の軽減等が期待される好熱菌に遺伝子操作技術を適用し、高い増殖速度と遺伝子導入効果による物質生産能力の飛躍的向上を目標として、好熱性細菌 *Bacillus stearothermophilus* を取り上げ、安定で薬剤耐性遺伝子の発現可能なベクタープラスミドの開発を行ったものである。さらに、全塩基配列が明らかとなっている枯草菌とのシャトルベクターを構築し、テトラサイクリン (*Tc*) による分泌酵素の誘導発現を検討したものである。

第1章では、自然界から種々の好熱性細菌のプラスミドを検索し、*B.subtilis* の形質転換で薬剤耐性を担う2種のプラスミド pTHT15 (テトラサイクリン耐性 (*Tc<sup>r</sup>*)、4.5キロベースペア (kb) 及び pTHN1 (カナマイシン耐性 (*Km<sup>r</sup>*)、4.8kb) を分離している。これら2種類の薬剤耐性プラスミドについて基本的な性質を検討し、それぞれの詳細な制限酵素地図の作製と薬剤耐性遺伝子や複製開始点領域の位置の決定を行った。さらに、pTHT15 及び pTHN1 の形質転換実験から、両プラスミドが *B.stearothermophilus* CU21 株で複製及び形質発現が可能であることを確認している。

第2章では、pTHT15、pTHN1、pUB110 間の遺伝子レベルでの相同性をサザンハイブリダイゼーションを用いて調べている。その結果、pTHN1 と pUB110 の *Km<sup>r</sup>* 遺伝子部分、pTHT15 と pUB110 の複製開始点領域、及び3つのプラスミド間で細胞膜への結合領域と考えられる部分にそれぞれ高い相同性が認められた。また、pTHN1*Km<sup>r</sup>* 酵素が pUB110 のそれと同じカナマイシンヌクレオチジル転移酵素であることを確認した。さらに、pUB110 と pTHT15 の *B.subtilis* 及び *B.stearothermophilus* におけるコピー数を調べ、両プラスミドが不和合性であることを確認している。

第3章では、*B.subtilis* と *B.stearothermophilus* でのプラスミド6種類の熱安定性と、形質発現の限界温度について調べている。まず、*B.subtilis* では、pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194がその生育限界温度まで安定に保持され薬剤耐性遺伝子の発現が可能であったが、pTP4とpTP5は45℃以上で複製が不安定となり宿主内から脱落することが判明した。しかし、これらの不安定なプラスミドも、pUB110と組換えプラスミドを作製し、pUB110の複製領域を導入することで安定化された。次に、*B.stearothermophilus* ではpC194、pUB110、pTHT15、pTHN1が形質転換可能であったが、pTP4とpTP5は形質転換不可能であった。宿主内における安定性を検討した結果、pC194は55℃でほとんど宿主内から脱落したが、pTHN1は55℃まで、pUB110、pTHT15は60℃付近まで安定に保持された。しかし、pTP4及びpTP5は、それぞれの薬剤耐性の発現自体が不可能であることが判明した。また、pC194の複製開始点領域を熱安定なpTHT15の複製開始点領域に変換することで59℃までクロラムフェニコール耐性 (Cm<sup>r</sup>) を安定に発現できた。これらの結果に基づいて、*B.subtilis* と *B.stearothermophilus* の両方で複製可能で3つの薬剤に耐性なシャトルベクター-pIH41およびpIH42を構築すると共にその有用性を論じている。

第4章では、好熱菌由来プラスミドpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子の全塩基配列を決定し、その構造遺伝子のオープンリーディングフレーム、推定されるアミノ酸配列、プロモーター及びターミネーター、転写開始点をそれぞれ決定している。また、遺伝子構造の解析で、このプラスミドのTc<sup>r</sup>発現がTcにより誘導されることから、プロモーター部分における発現制御機構について考察を進め、mRNAによるtranslational attenuationモデルを提唱している。

第5章では、これらの発現制御機構の利用を目的として、まず*B.subtilis*から $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子クローニングしている。得られた $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子の塩基配列を決定し、2塩基対の欠失を除いて既知の枯草菌方 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のamyEm<sup>+</sup>と一致することを明らかにした。次に、得られた $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子部分をCm<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>プラスミドpIH4上に存在するpTHT15由来のTc<sup>r</sup>遺伝子のプロモーター及び発現制御領域の下流に連結した。その結果、*B.subtilis*の培地へTcを添加すると $\alpha$ -アミラーゼを誘導発現されることが確認された。さらに、添加するTcの濃度により発現量をコントロールすることができ、500ng/mlのTcの添加で無添加時よりも約15倍の $\alpha$ -アミラーゼが生産されることを明らかにしている。また、Tcの添加は培養の開始時及び安定期のいずれにおいても可能であり、蛋白質の生産に極めて有用であることを示している。

以上のように、本研究で構築した*B.subtilis*と*B.stearothermophilus*の間の安定なシャトルベクターを利用することにより、好熱菌を宿主とする遺伝子操作を簡単に行うことが可能になった。また、枯草菌における分泌生産系での発現制御系を構築できたことは、遺伝子組換え枯草菌の発酵生産への利用性を飛躍的に高めたものと言える。

よって、学位申請者池田隆幸は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。