

氏名	魏 云 林
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1405 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies of Enzymes from Cold-adapted Microorganisms and Construction of Their Overproduction Systems (低温適応微生物の酵素とその高生産系構築に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 江崎信芳 教授 加藤暢夫 教授 喜多恵子

### 論 文 内 容 の 要 旨

低温環境は極地、深海、高山など、地球上の大きな部分を占めている。このような低温環境に棲息する低温適応微生物が生産する酵素の多くは低温で高い活性を示す。近年、これらの酵素の産業利用に対する関心が高まっている。低温活性酵素は、冷水中で用いられる洗浄用酵素や、品質保持の観点から低温で行われる食品加工酵素などとして、特に利用価値が高いと考えられている。しかしながら、低温活性酵素には熱安定性の低いものが多いため、いかに活性を損わずに大量生産するかが重要な課題となっている。本研究は、低温で良好に生育する低温適応微生物を宿主とした発現システムを開発することにより、熱安定性の低い外来タンパク質を低温で高生産することを目指したものであり、その成果は、以下のように要約される。

1. 外来タンパク質を低温で生産する宿主として、低温での生育が良好で菌体収量も多い菌株を南極海水から単離した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列より *Shewanella* 属に帰属されたため、*Shewanella* sp. Ac10 と命名した。本菌は、7℃における倍加時間が4.8時間、15℃における倍加時間が2.6時間で、低温で良好に生育することが示された。伝達性プラスミドを保持する *Escherichia coli* との接合により、本菌の形質転換に成功した。広宿主域コスミドである pJRD215 をベクターとし、*E. coli* S17-1 を遺伝子供与菌として17℃で接合させることにより、*Shewanella* sp. Ac10 の形質転換が可能であることが示された。続いて、本菌で機能するプロモーターの単離を試みた。本菌を低温で培養したときに高生産される可溶性タンパク質を二次元電気泳動で解析した。4℃で高発現するタンパク質の一つは、*Synechococcus* sp. strain PCC7942 の鉄応答性タンパク質 *IrpA* のホモログであった。本タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子上流に接続し、pJRD215 に挿入して、*Shewanella* sp. Ac10 に導入したところ、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現が認められた。以上のように、*Shewanella* sp. Ac10 を宿主とした外来遺伝子発現系を構築することに成功した。

2. シベリア永久凍土から単離した低温菌 *Acinetobacter* sp. strain no. 6 を宿主としたタンパク質生産系を開発した。本菌は4℃において倍加時間7.3時間で生育し、約48時間で定常期に達した。本菌を宿主とするベクターを開発するため、常温菌 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のプラスミド pWH1266 から *Acinetobacter* 属で機能する複製起点を含む DNA 断片を PCR によって増幅し、pUC118 に導入した。得られたプラスミドは *Acinetobacter* sp. strain no. 6 と *E. coli* の両方で安定に保持された。*Acinetobacter* sp. strain no. 6 のエレクトロポレーションの条件を至適化した結果、約  $3 \times 10^6 / \mu\text{g}$  DNA の形質転換効率が得られた。細胞あたり10-30コピーのプラスミドが保持された。次に  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子をレポーターとしたプロモーター探索用ベクターを構築し、プロモーターの単離を試みた。ゲノム DNA ライブラリーをレポーター遺伝子上流に挿入し、*Acinetobacter* sp. strain no. 6 に導入した。形質転換体の中から高いアンピシリン耐性をもつものを3株単離した。これらの形質転換体から単離されたプラスミドは、本菌で機能する強力なプロモーターを含んでいた。これらのプロモーターを P1, P3, P6 と名付けた。プライマー伸長実験の結果、P1 と P3 には二つの転写開始点があり、P6 には一つの転写開始点があることがわかった。活性測定の結果、 $\beta$ -ラクタマーゼの90%以上は培養上清に分泌されていた。

ることがわかった。SDS-PAGEで培養上清のタンパク質を分析したところ、P1をプロモーターとした系では、全タンパク質の約34%、P3をプロモーターとした系では、全タンパク質の約56%を占めることが示された。P1をプロモーターとした系では、発現レベルが培養温度に依存しており、培養温度を低くするほど、高発現する傾向が見られた。次に、本システムを利用して、低温適応微生物由来の酵素の生産を試みた。*Shewanella* sp. Ac10 の $\alpha$ -アミラーゼは熱安定性が低く、*E. coli* を宿主とした系では、ほとんど活性の発現が見られなかった。本酵素遺伝子をP3プロモーターの下流に挿入し、*Acinetobacter* sp. strain no. 6 に導入した。その結果、7℃において、 $\alpha$ -アミラーゼが高生産されることが示され、その量は、全菌体外タンパク質の35%を占めた。以上のように、*Acinetobacter* sp. strain no. 6 を宿主とする外来タンパク質高生産系の開発に成功した。

## 論文審査の結果の要旨

低温適応微生物が生産する低温活性酵素の産業利用に対する関心が高まりつつある。これらの酵素は低温で高い活性を示す反面、熱安定性が低いものが多く、活性を保持した状態での高生産が困難な場合が多い。本研究は、0℃付近の低温で生育する低温適応微生物を異種タンパク質生産の宿主として利用することにより、熱安定性の低いタンパク質の高生産を実現しようとしたものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 南極から単離した低温菌 *Shewanella* sp. Ac10 の生育特性を解析し、本菌が、外来タンパク質の低温での生産に適した特性を有することを明らかにした。効率的な外来タンパク質の生産を実現するためには、速やかな増殖と高い菌体収量が望まれるが、これらの条件を満たす菌株を見いだした意義は大きい。本菌は、ポリエチレングリコールや塩化カルシウムを用いた化学法やエレクトロポレーションによる形質転換は不可能であったが、広宿主域ベクターである pJRD215 を保持した *Escherichia coli* と低温で接合させることで、形質転換が可能であることを見いだした。低温適応微生物に外来遺伝子を導入するための新しい方法を提示したもので、注目に値する。*Shewanella* sp. Ac10 は全ゲノム解析が行われている数少ない低温適応微生物の一つであり、本菌の形質転換法を確立したことは、外来タンパク質高生産系の開発に寄与するのみならず、低温適応微生物で見られるユニークな生命現象の分子基盤解明にも寄与するところが大きい。さらに、本菌で機能するプロモーターの単離と外来タンパク質の生産にも成功しており、応用微生物学的な観点からも高く評価できる。

2. シベリア土壌から単離した低温菌 *Acinetobacter* sp. strain no. 6 の生育特性を解析し、本菌が外来タンパク質の生産に適した特性を有することを明らかにした。常温菌 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のプラスミドの複製起点を利用し、*Acinetobacter* sp. strain no. 6 で安定に保持されるベクターの構築に成功した。常温菌由来の複製起点が、低温菌でも機能することを実証したもので、注目に値する。また、本菌の簡便で効率の良い形質転換法を確立したことは、本菌を宿主として利用する上で、きわめて重要な意義をもつ。さらに、薬剤耐性遺伝子をレポーターとしたプロモーター探索用ベクターを構築し、本菌で機能する強力なプロモーターの単離に成功している。薬剤耐性遺伝子が、低温で微弱な活性を保持することを巧みに利用したプロモーターのスクリーニング方法であり、注目に値する。単離されたプロモーターの中には、培養温度を低くすることで発現効率が向上するものも含まれ、温度による発現制御を研究する材料を提供するものとしても意義深い。さらに、単離されたプロモーターを利用することにより、*E. coli* を宿主とした系では活性がほとんど発現されなかった、低温菌 *Shewanella* sp. Ac10 由来の熱安定性の低い $\alpha$ -アミラーゼの分泌生産にも成功している。7℃での生産量は、全菌体外タンパク質の35%を占めており、培養上清からの目的タンパク質の精製が容易に行えるものと考えられる。低温適応微生物を宿主とした外来タンパク質の高生産に成功したはじめての例として高く評価される。

以上のように本論文は、外来タンパク質の生産に適した低温適応微生物を見いだすとともに、形質転換法を確立し、これらを宿主とした発現ベクターを開発したものである。さらに、本システムが熱安定性の低い低温活性酵素の高生産に有効であることを実証しており、応用微生物学、生体触媒化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。