

氏名(本籍)	まついとおる 松井 徹 (神奈川県)
学位の種類	学術博士
学位記番号	博甲第730号
学位授与年月日	平成2年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	遺伝子組換え大腸菌の高密度培養
主査	筑波大学教授 農学博士 高橋 穰 二
副査	筑波大学教授 工学博士 片岡 廣
副査	筑波大学教授 工学博士 中村 以正
副査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠篤

論 文 の 要 旨

遺伝子組換え技術の確立に伴い、各種の有用蛋白質の生産が可能になったが、最近では、このような手法による有用物質の生産の一部は既に実用化の域に達している。特に、遺伝子操作において頻繁に用いられている大腸菌のように、菌体内生産を主に行う微生物では、菌体を高密度に培養することは生産性を高める上に極めて有効である。

本研究は、組換え大腸菌の高密度培養による遺伝子産物の生産性の向上を目的として、大腸菌の高密度増殖を可能とする培養条件の検討と組換え体への応用に関する培養工学的な検討を行ったものである。

まず、大腸菌の高密度増殖を可能とする培養条件の検討を野生株を用いて行い、無機栄養分を高濃度に含む完全合成培地 TK-25 を設計したが、本培地は、通常の高温殺菌条件では培地が変性して生育阻害が起こるので、65℃、30min の低温殺菌が有効である事を明らかにした。炭素源としてのグルコースは、培養中の濃度が 20 g / ℓ 以上になると生育阻害が起こる事を見出し、それ以下の濃度に保つよう、粉体グルコースを逐次添加する fed-batch 法によって高い増殖速度を得る事に成功した。また、生育阻害物質である酢酸の副生は溶存酸素 (DO) の低下に伴い蓄積量が増大し、一方、DO が 10ppm 以上になると高酸素濃度による生育阻害を受けるようになるため、菌体増殖のための DO の最適値は 6.5ppm 位である事を明らかにした。以上のような検討結果から得られた最適条件下で *E. coli* K12 株を培養する事により、酢酸の蓄積量を 8 g / ℓ に抑え、培養 12 時間で 134 g (dry weight) / ℓ の高密度の菌体の培養に成功した。

また、pBR322 をベクターとしてトリプトファンシンターゼ (TSase) 遺伝子を時計回りに挿入した組換えプラスミドを導入した組換え大腸菌 *E. coli* / pBR322

は達成困難であった100 g / ℓ 以上の高密度培養に成功したが、これは、本研究において確立した培養法が、組み換え大腸菌にも十分適用可能である事を示すものである。一方、上述のプラスミドと TSase 遺伝子の挿入方向が逆の pBR322trpAB(2)を保持した組換え大腸菌を用いると、菌体量は培養16時間で123 g / ℓ に達し、初期の TSase 比活性も270 U / mg-protein と高いので *E. coli*pBR322trpAB(2)は TSase の生産のために極めて有望である事を見出した。

次に、高密度培養における問題の一つである酸素供給の手段として、加圧培養に関する培養工学的な検討を行うため、加圧下で運転可能な粉末グルコースフィーダーを新たに開発し、それが加圧下の fed-batch 培養にとって極めて有用である事を示した。

一方、空気通気下の加圧培養においては、通常の質量速度の条件下では溶存炭酸ガス濃度の増加による生育阻害が著しく認められたが、通気線速度一定として通気量を増加させる事により気相部炭酸ガスの置換を効率的に行い、溶存炭酸ガス濃度を低く抑える事で、空気のみを通気による加圧培養によっても K12株で130 g / ℓ 以上の高密度培養を達成する事が出来る事を示した。

また、*E. coli*/pBR322trpAB(1)を用いて上述の空気加圧培養を行った場合、100 g / ℓ 以上の高密度菌体が得られると同時に培養後半には TSase の発現量が倍増するという点で有利である事も明らかにした。

一方、プラスミドの安定化と TSase 生産性の向上を目的として、栄養条件の検討を行い、有機栄養物、特に、酵母エキスの添加が、何れの挿入方向のプラスミド保持株を用いた場合にも極めて有効である事を明らかにした。さらに、酵母エキス中のどの成分がプラスミドの安定化に有効であるかを検討し、シスチン、プロリン、グルタミン酸等の数種のアミノ酸類に効果がある事を見出した。

さらに、菌体増殖および TSase の生産に及ぼすアミノ酸添加の影響を検討した結果、プラスミド安定性、TSase 生産の両面を満足するアミノ酸はグルタミン酸である事を明らかにした。すなわち、*E. coli*/pBR322trpAB(2)をグルタミン酸 1 g / ℓ を添加した TK-25培地で培養を行う事で、菌体量は培養14時間で115 g / ℓ に達し、TSase 生産量も無添加の場合の1.33倍に増大する事を示した。

以上のように、本研究は、最近、急速に必要な性の高まってきた組換え大腸菌の高密度培養法を菌体増殖のみならず、プラスミド安定性、遺伝子産物の生産等の面からも検討したものであり、得られた知見は工業的利用に十分耐えられるものである。

審 査 の 要 旨

組換え大腸菌の高密度培養について、菌体増殖、プラスミドの宿主内安定性、遺伝子産物の生産等の面から詳細に検討している。

まず、大腸菌の菌体増殖に影響を及ぼす因子について検討し、高密度菌体の成育を支えるに十分高濃度な栄養分を含む合成培地を設計すると共に、培地の殺菌条件、グルコース濃度、溶存酸素濃度等の最適条件を明らかにする事で *E. coli* K12株を130 g / ℓ 以上、組換え *E. coli* についても最大123 g / ℓ という、従来の報告に無い高密度培養に成功している。また、高密度菌体の酸素要求量を賄

うために従来殆ど試みられることのなかった加圧培養を検討し、6 atm 以上に達する加圧下においては溶存炭酸ガスによる生育阻害が著しい事を示すと共に、通気線速度一定として通気量を増加すれば、溶存炭酸ガスによる生育阻害が避けられ、さらに遺伝子産物の発現量を倍増できるという有利な知見を見出している。

一方、組換え菌の工業用利用において重要であるプラスミドの安定性についても検討し、プラスミドの安定化には有機栄養物、特に酵母エキスが極めて有効である事を見出すと共に安定化が酵母エキス中のアミノ酸類によるものである事を明らかにした。さらにこれらの知見に基づいて、組換え大腸菌 *E. coli*/pBR322*trpAB* を用いたトリプトファンシンターゼの大量生産を行い、遺伝子産物の生産性が著しく増大する事を示している。

以上の研究は、最近重要性の高まってきた遺伝子組換え大腸菌の高密度培養について、十分な基礎的検討を行うと共に応用面における実例を示したものであり、得られた知見は組換え菌による有用タンパク質あるいはその関連物質の工業的生産等における今後の技術発展に大いに役立つものである。

よって、著者は学術博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。