



Title	ナイロンオリゴマー分解酵素とそのプラスミド依存性
Author(s)	根来, 誠司
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1276
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ナイロンオリゴマー分解酵素と そのプラスミド依存性

1982年1月

根 来 誠 司

まえがき

産業廃水の微生物による分解浄化は、活性汚泥法等の種々の分解システムによって実用に供されている。しかし放出される廃棄物も毎年、質、量とも増大の一途をたどり、どこまで微生物に依存できるかは疑問である。特に質的な問題は、微生物の分解能力の多様性に期待せざるを得ない。しかしながら、従来の微生物による非天然合成基質分解機構の研究は、単に現象面の把握にとどまり、酵素学的、遺伝学的に解析された例は少ない。そこで本研究では、ナイロン工場廃液中に含まれるε-アミノカプロン酸環状二量体の *Flavobacterium* sp. KI72株による分解系を解明する為に、分解に関与する酵素系と、これを支配する遺伝子の構造及び機能の研究を行った。ここで得られた小さな進展が微生物の能力の多様性を知る基礎的知見に少しでも寄与し、それが体系的な能力開発へと発展する事を期待する。ここに省みる時、まだ解明すべき問題が山積しており、今後ともその究明に努力する所存である。

1982年1月

著者

目次

緒論	1
第1章 ナイロンオリゴマー分解酵素の精製と性質	
第1節 緒言	5
第2節 実験材料及び方法	6
第3節 結果	11
1. 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer Hydrolase の精製	11
2. 純度の検定	11
3. 分子量	11
4. 酵素の性質	14
5. 酵素活性に対する阻害剤の影響	14
6. 反応速度定数 K_m , V_m の決定	14
7. 基質特異性	17
8. アミノ酸組成	17
第4節 考察	19
第5節 要約	21
第2章 ナイロンオリゴマー分解酵素系のプラスミド支配	23
第1節 緒言	23
第2節 実験材料及び方法	25
第3節 結果	31
1. プラスミド消去実験	31
2. 消去株中の酵素活性	31
3. 形質転換	33
4. 電子顕微鏡観察	33

5.	アガロースゲル電気泳動によるプラスミドの分画	37
6.	制限酵素解析によるプラスミドの同定	39
第4節	考察	46
第5節	要約	48

第3章	ナイロンオリゴマー分解プラスミド pOAD2の構造と機能	50
第1節	緒言	50
第2節	実験材料及び方法	52
第3節	結果	59
1.	欠失プラスミド pOAD21保持株の分離	59
2.	pOAD2 と pOAD21の制限酵素切断地図	62
3.	EI, EII遺伝子のクローニング	66
4.	EI遺伝子の発現機構	72
	A) pNDH5の制限酵素切断地図	72
	B) 欠失プラスミドの作製	72
	C) 大腸菌で生産される EI蛋白質	77
	D) EIプロモーターの同定	81
5.	EII遺伝子の発現機構	86
	A) 欠失プラスミドの作製	86
	B) lac UV5プロモーター支配下での EII 遺伝子の発現	87
6.	EI*酵素のプラスミド (pOAD21)依存性	93
7.	pOAD2 上の繰り返し配列	95
第4節	考察	103
第5節	要約	106

総括(結論)	109
引用文献	113
本論文に関係のある報告	118
謝辞	119

緒論

近年の化学工業の発展に伴い、膨大な非天然型の合成化合物が製品として、或いは廃棄物として環境へ拡散される様になった。その為本来の自然環境に適合した生態系を攪乱し、天然の淘汰力を歪ませる結果になっている。この様な環境下で、i)生物、特に微生物が新しい能力、すなわち新酵素を創造し定着させる現象が起こっているかどうか、ii)起こっているとすると期待しうる所要時間はどれほどか、iii)どの様なプロセスで進行するのか、iv)酵素進化で分解できる非天然基質の範囲はどれほどか等の諸問題は、公害処理の観点のみでなく酵素進化の面からも重要である。

一般に微生物は多種多様な能力を有し、環境条件に高度に順応しうる能力を有すると言われている。例えば、ある基質（乳糖等）が存在する場合にのみ、オペロンが発現したり、或いは生体内のアミノ酸プールの量が減少した場合に、そのアミノ酸の合成系の遺伝子が発現する現象は生物固有の合目的性に合致する。このような遺伝子発現の制御機構は、Jacob や Monod の提唱したオペロン説^{1,2)}の発表に端を発し、以来集中的な研究がなされた結果、現在では発現に関与する制御蛋白質、プロモーター、オペレーター領域の塩基配列、DNA と制御蛋白質との相互作用等が分子レベルで説明されるに至っている^{3,4)}。しかし同じ適応現象であっても、酵素の進化を直接証明する事は、進化の頻度が実験室規模をはるかに超えたものである為、不可能に近い。従って蛋白質進化の証明は同一活性を持つ蛋白質が種々の起源の生物間で類似性が高いという様な間接的方法に依らざるを得ない。特にチトクロームCについては、微生物から人間に至る26種について全アミノ酸配列が決定され、104個のアミノ酸の中で35個は、同じ位置に同じアミノ酸が存在する事が判っている⁵⁾。又、馬肝臓と、酵母の alcohol

dehydrogenase は 25% の相同性があり、豚とイセエビの 3-phosphoglycerate dehydrogenase では 78% の相同性がある。又、*Acinetobacter calcoaceticus* や *Pseudomonas putida* の β -ketoadipate pathway に関与する 2 種類の酵素、muconolactone hydrolase と β -ketoadipate enol-lactone hydrolase のアミノ酸配列が類似している事から^{7,8)} 共通の起源を持つと推定されている。

Ohno は、このような酵素進化には遺伝子の重複が必須である事を提唱した。⁹⁾ これは、重複を考えねば、既存の遺伝子内の変異により生物に必須の機能が失われ、致死的になる為である。実際、真核生物には転写されない遺伝的に不活性な領域がヘテロクロマチン¹⁰⁾ として存在し、この領域内に蓄積された冗長な繰り返し配列が欠失、逆位、転位、挿入等の遺伝子変化をうける過程で、新機能を持った遺伝子が創生されるという概念^{9,11)} が一般的に認められている。

Campbell らは、大腸菌の β -galactosidase 構造遺伝子領域の欠失株 ($\Delta lac Z$, $lac Y^+$) から Lac^+ 復帰株を分離し、実験室レベルでの遺伝子進化のモデル系とした。¹²⁾ 彼らは復帰変異株で生産される β -galactosidase が $lac Z$ 遺伝子産物とは免疫性、及び染色体上での遺伝子座が異なる事から、新しい遺伝子 ebg (evolved β -galactosidase) に支配されると結論した。¹²⁾ 又、Hall と Zuzel は、復帰変異座がいずれも同一の ebg 遺伝子内にあるか、その部位の異なる 2 株間の組換えにより新しい基質特異性が発現する事を示した。¹³⁾ 又、Clark 一派の *Pseudomonas aeruginosa* の acylamidase の基質特異性を実験室的な選択環境下で変化させた例¹⁴⁾ も進化のモデル実験としては貴重であるが酵素蛋白質の安定性等の理由で自然界で定着される事は期待できないし、遺伝子変化が染色体 DNA 上で起こっている限り解析は困難となる。

近年の抗生物質の臨床使用に伴って、病院内に薬剤、(特に複数

の薬剤)に対する耐性菌が広く分布する様になった。この様な遺伝子の伝播に重要な役割を果たしたのは薬剤耐性(R)プラスミド^{15,16)}である。特に大腸菌のプラスミドの中で pSC101¹⁷⁾, ColEI¹⁸⁾ 等の小型プラスミドを中心に、複製、或いは遺伝子発現の制御機構のモデル系として、近年、集中的な研究が行われている。¹⁹⁾ Rプラスミド上には、オペロンの発現を制御する挿入断片 IS²⁰⁾ 或いは両末端に繰り返す配列を持ち且つ薬剤耐性遺伝子を含む転位可能な因子、トランスポゾン(Tn)²¹⁾ が載っている場合がある。又、Tn 内には、recA 非依存性の転位反応触媒酵素(transposase)も同定されている。²²⁾ IS や Tn はプラスミドの解離、特定領域の欠失、挿入、転位等の遺伝子変化をもたらす重要な因子であり、その機構や認識の特異性も塩基配列のレベルで把握されつつある。²⁰⁻²²⁾

しかし、薬剤耐性を支配する構造遺伝子が、いかなる起源(原始型酵素)から、どのようなプロセスで発生したかという問題については殆ど解答が得られていない。以上、酵素進化とそれを引き起こす遺伝子変化に関する研究の現状を述べて来たが、本研究では非天然合成化合物に作用する酵素が進化により異常な淘汰力の下で創造され定着したものと考えられる結果を得た。

近代化学工業の発展により拡散された非天然合成化合物の中で農薬類(2,4-dichlorophenoxyacetic acid [2,4-D] 等)、加塑剤として使用されているテレフタル酸エステル類、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等の微生物分解が研究されている。²³⁾ 本研究で主題として取り上げたのは、この様な非天然基質の1つのナイロンオリゴマーの分解機構である。

6-ナイロンは、ε-カプロラクタムの開環重合によって製造され、構造式 $H-(NH(CH_2)_5CO)_n-OH$ を持ち、重合度 n が 200 以上のものである。ナイロンの重合途中、オリゴマーの段階で重合を停止した直鎖状オリゴマーや、途中で分子内縮合を起こした環状

オリゴマーが副産物としてでき、廃棄物として廃液中に捨てられていた。この様な環境から ϵ -アミノカプロン酸の環状二量体を資化する菌、*Flavobacterium* sp. KI72 株を分離し、その酵素系と酵素系支配の遺伝子を調べたのが本論文である。

第1章では、同環状二量体の分解には2種類の酵素 6-amino-hexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI), 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) が関与する事が既に証明されていたので、特に EI を精製しその分子量、基質特異性、アミノ酸組成等を研究した。その結果、本酵素は、環状二量体以外の天然のアミド化合物、ペプチドに対して活性がない全く特殊な酵素である事を認めた。

第2章では、これら特殊酵素の遺伝子がプラスミド上に座位を占める事を示した。すなわち、プラスミドの関与は、まず消去実験によって示唆され、次いで消去株を受容株とし親株のプラスミド DNA を用いた形質転換実験により証明した。さらに電子顕微鏡観察と、制限酵素による解析から、KI72 株は3種類のプラスミド、pOAD1, pOAD2, pOAD3 を有するが、この中で pOAD2 がナイロンオリゴマーの分解に関与する事を結論した。

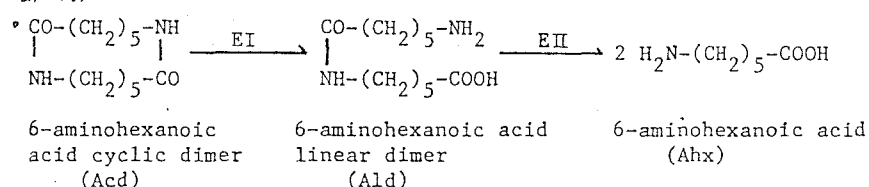
第3章では、EI, EII の様な特殊酵素を支配するプラスミド構造の研究は、遺伝子及び酵素の進化の立場からも重要な知見が得られるという観点に立ち、両遺伝子は大腸菌においてクローン化した。さらに、大腸菌内での発現機構、pOAD2 上の繰り返し配列等の解析から、EI, EII 遺伝子の進化論的な考察を行った。

総括では、上記の結果を、特に酵素及び遺伝子進化の観点から展望した。

第1章 ナイロンオリゴマー分解酵素の精製と性質

第1節 緒言

Flavobacterium sp. KI72 株は、1972年に、当研究室の射場氏らによって染色工場廃液中から分離された菌株であり、ε-アミノカプロン酸 (Ahx) の環状二量体 (Acd) を単一の炭素源、窒素源として生育可能である。²⁴⁾ 沢田、Bisaria、村松各氏の研究では、この株の細胞抽出液を DEAE-Sephadex カラムでクロマトグラフィーを行うと、Acd から Ahx の直鎖状二量体 (Ald) を生ずる活性と、Ald からモノマーの Ahx を生ずる活性が分離して溶出される。そこで前者の活性を EI (6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase)²⁵⁾、後者の活性を EII (6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase)²⁶⁾ と命名した。この結果から環状二量体の代謝は次式に従っていると推定した。²⁴⁻²⁶⁾



一般に、微生物が新しい化合物を資化する為には、その化合物から共通代謝中間体へ至る代謝経路を開拓する必要がある。その為には、新しい酵素を創造し、定着させる事が必須である。Acd の代謝に関与する2種類の酵素 EI, EII は、いずれも新しい代謝経路を担い、その発生の起源をナイロン工場出現以後のこの30年間にたどる事ができる。その様な観点から、ナイロンオリゴマー分解酵素の性質を把握し、aminopeptidase や amidase の様な既存の類似酵素との比較検討により、新酵素発生の起源を推察できると考えられる。本章では、両酵素のうち特に EI の精製を行い、酵素の一般性質、分子量、基質特異性、及びアミノ酸組成等を明

らかにした。²⁵⁾ なお、EIの精製ならびに諸性質は、木下博士らによって検討されている。

第2節 実験材料及び方法

使用菌株 1972年に当研究室で分離したナイロンオリゴマー資化性菌 *Flavobacterium* sp. KI72株を使用した。本菌株は、以前、*Achromobacter guttatus* と同定されたが、Bergey's manual (第8版)²¹⁾ によって再度、同定した結果、*Flavobacterium* に所属させるのが、妥当と考えられた。しかし生理試験とDNAのGC含量の結果 (Table 1-1) からは、既存の種で該当するものがなく、単に *Flavobacterium* sp. KI72株とする事にした。

培養 本菌株の培養にはCDY培地 (基本組成: Acd, 8; K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 3; NaCl, 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; 酵母エキス, 0.5 g/l (pH 6.4)) を用いた。前培養は500 ml容のマイヤーフラスコ (培地 100 ml) に寒天斜面から一白金耳、接種し、30℃、2日間ロータリーシェーカーで培養した。本培養は、3 lの坂口フラスコ (実容 1 l) に前培養液 10 ml を植菌し、30℃で24時間、往復振盪培養した。培養後の残余基質は、濾過により除去した。冷却遠心分離 (8000 × g, 10分間) により集菌後、緩衝液 A (0.02 M リン酸緩衝液 [pH 7.4] に 10% グリセリンを含む) で2回洗浄した。

酵素活性の測定 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI) の活性測定は、緩衝液 A に溶解させた 10 mM Acd を基質とし、30℃で一定時間反応後、100℃、3分間の熱処理で反応を停止させた。

Table 1-1. Morphological and physiological characteristics of *Flavobacterium* sp. KI72

Rod shape, occurring singly, in chains.	
Size : 0.5 - 0.7 to 1.2 - 1.6 μm	
Gram negative	
Non-motile	
Pigmentation : yellow	
Growth at 37 °C	+
Require added NaCl	-
Hydrolysis of gelatin	+
casein	-
starch	-
agar	-
cellulose	-
chitin	-
Methyl red	-
Acid from glucose	+
lactose	+
sucrose	+
maltose	+
Citrate	+
Indole	-
H ₂ S	-
Urease	-
NO ₃ $\rightarrow$ NO ₂	-
Catalase	+
GC content of DNA	63.4 %

生成した Ald は trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 法²⁸⁾を用いて定量した。酵素活性 1 単位は、1 分間に 1 μ mole の Ald を加水分解して同 mole の Ald を生成しうる酵素量と定義する。

蛋白質濃度 280 nm の吸光度を日立分光光度計 (モデル 200-20) により測定した。

菌体量 600 nm の吸光度を日立分光光度計 (モデル 101) により測定した。

食塩濃度 食塩濃度は、電導度計 CD-35 MII (M & S Instrument Inc.) により測定した。又、Mohr 法²⁹⁾も併用した。

粗酵素液の調製 9 l の培養液から得た 22 g (乾燥重量) の菌体を 100 ml の緩衝液 A に懸濁した。フレンチプレス (400 Kg/cm²) で細胞を破碎後、20,000 $\times$ g, 15 分間の遠心分離を行った。残渣に、50 ml の緩衝液 A を添加後、超音波処理 (20 KHz, 5 分間) を行い、同様に遠心した。前述の上澄液と混合後、分離用超遠心機 (日立 80P), ローター RP50-2 を用いて 190,000 $\times$ g, 1 時間遠心しこの上澄液分 175 ml を粗酵素液とした。

酵素の精製 精製操作は、すべて 5 $^{\circ}$ C 以下で行った。

(段階 1) DEAE-sephadex A50 カラムクロマトグラフィー

混在する aminopeptidase の分離を容易にする為、緩衝液 B (緩衝液 A に 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む) を使用した。粗酵素液を DEAE-sephadex A50 カラム (ϕ 5.5 $\times$ 35 cm, 緩衝液 B で平衡化したもの) に負荷した。100 ml の緩衝液 B で洗滌後、0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M の食塩を含む緩衝液 B、各 1 l で、240 ml/hr の流速にて溶出し、20 ml ずつ分取した。EI 活性は食塩濃度 0.25 - 0.3 M で溶出されたので活性区分 (分画番号 67 ~ 77) を集め (227 ml), 限外濾過 (Amicon モデル TCF10, UK50 膜) により 12 ml に濃縮した。この段階で EII 活性は、除去された。

(段階 2) Sephadex G200 カラムクロマトグラフィー

段階 1 の濃縮試料を緩衝液 A で平衡化した Sephadex G200 カラム ($\phi 2.8 \times 82$ cm) へ負荷した。緩衝液 A (流速 15 ml/hr) で溶出し 10 ml ずつ分取した。酵素活性区分 (分画番号 29~33, 液量 50 ml) を集め、限外濾過で 11 ml まで濃縮した。

(段階 3) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

段階 2 の試料を緩衝液 A で平衡化した DEAE セルロースカラム ($\phi 2.2 \times 45$ cm) に負荷した。溶出は食塩濃度を 0 より 0.4 M まで直線的に変化させ、全容 800 ml, 流速 40 ml/hr で溶出した。(7.5 ml ずつ分取した。) 活性区分 (分画番号 84~91, 液量 61 ml) を集め、限外濾過で 4.3 ml まで濃縮した。

電気泳動 Sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Weber と Osborn の方法³⁰⁾に従った。10% ポリアクリルアミドゲルを用い、以下の標準蛋白質を基準にして、本酵素のサブユニット分子量を決定した。Bovine serum albumin (m.w. 67,000), Bovine pancreas catalase (m.w. 60,000), Hen egg albumin (m.w. 45,000), rabbit muscle aldolase (m.w. 40,000), thermolysin (m.w. 35,000), bovine pancreas chymotrypsinogen (m.w. 25,000), horse heart cytochrome C (m.w. 13,500)。ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動は、pH 8 及び 9 で Davis の方法³¹⁾に従い、7% アクリルアミド標準ゲルを使用した。泳動後の蛋白質バンドは、アミドブラックで染色した。活性バンドの検出には、ゲルを 2 mm ずつスライスし、基質 (緩衝液 A に 20 mM Accl を溶解させたもの) を 100 μ l 添加して、30 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。反応液 5 μ l を濾紙 (東洋 No. 50) に置き、 α -ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 2 で展開後、0.2% ニンヒドリンで発色させて Ald への転換活性を調べた。

超遠心分析 精製酵素を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化

した Sephadex G 25 カラム ($\phi 2 \times 40$ cm) を通した後、溶出液を限外濾過で濃縮し、さらに同緩衝液に対して一晩透析した。沈降係数の決定には、酵素液 (4.4 mg/ml) を Spinco E 遠心機を用いて $47,660$ rpm, 1 時間、遠心分離を行い、シュリーレン光学系で撮影した。一方、沈降平衡実験は Spinco E 遠心機で、 7419 rpm, 20 時間、行った。酵素初濃度は、 2.0 , 2.6 , 3.0 , 3.5 mg/ml を用い、レーリー光学系で撮影した。本実験は、大阪大学蛋白質研究所で行った。

アミノ酸組成の決定 精製酵素を Sephadex G 25 カラム ($\phi 2 \times 40$ cm) で脱塩後、溶出液を凍結乾燥した。この標品 0.4 mg を 4 M メタンスルホン酸 (2 mg/ml トリプタミンを含む) で 24 , 48 , 72 時間、加水分解し、アミノ酸分析計 (日立モデル 50) で分析した。本実験は、大阪大学蛋白質研究所で行った。

第3節 結果

1. 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase の精製

本酵素の各精製過程における結果を Table 1-2 に要約した。粗酵素液中の活性は、混在する 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) 活性の為に過大評価されている。従って最終精製過程 (DEAE セルロースカラム活性区分の限外濃縮液) では、10% の収率で 100 倍以上に比活性が上昇した。本酵素の吸光係数 ($E_{280}^{1\%}$) は 19.4 であった。

2. 純度の検定

単離した酵素標品の均一性を証明する為に、Sephadex G200 カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及び、超遠心分析を行った。まず Sephadex G200 で再度、クロマトグラフィーを行うと、蛋白質ピークと活性ピークは一致し、活性分画中の比活性は同一値 (2.5 units/mg) を示した。さらに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で「単一バンド」が、ポリアクリルアミド「ディスク」ゲル電気泳動 (pH 8 及び 9) でも「単一バンド」を示し、活性区分とも一致した (Fig. 1-1)。さらに本酵素の沈降像を Fig. 1-2 に示す様に超遠心的にも均一性を示した。以上の結果から、本酵素が単一である事を結論した。

3. 分子量

沈降速度法 (Fig. 1-2) から本酵素の沈降係数 (S_{20}) は 5.7 S と計算された。これは球状蛋白質と仮定すると分子量 86,000 となる。さらに 4 種類の濃度で行った沈降平衡実験から、分子量 $100,000 \pm 2,000$ を得た。以上の値は、村松氏が Sephadex G200 カラムクロマトグラフィーで求めた推定分子量 110,000 と比較的、良く一致する²⁵⁾。

Table 1-2. Purification of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase

Purification step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Enzyme		Recovery (%)
			activity (U/ml)	specific activity (U/ml)	
Crude enzyme	175	21.6	0.45 ^a	0.02	100
DEAE-Sephadex	227	0.80	0.18	0.23	52
Ultrafiltration	12	0.35	2.63	0.76	41
Sephadex G-200	50	0.22	0.48	2.21	30
Ultrafiltration	11	0.096	2.14	2.23	30
DEAE-cellulose	61	0.008	0.18	2.33	14
Ultrafiltration	4.3	0.081	1.88	2.25	10

a) This activity was measured in the existence of 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase

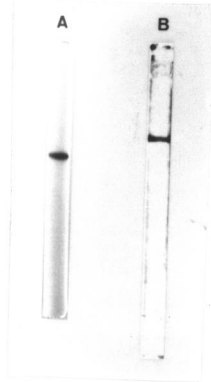


Fig. 1-1. Polyacrylamide disc gel electrophoresis (pH 8.0) (A) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (B) of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase.

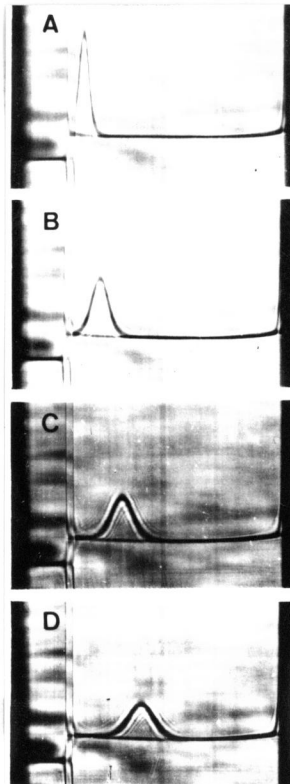


Fig. 1-2. Schlieren pattern of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase. Rotor speed: 47660 rev./min. Angle: 70°. (A) 0 min, (B) 20 min, (C) 40 min, (D) 60 min.

本酵素のサブユニット分子量を決める為、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。相対移動度 0.30 (Fig. 1-18) から分子量は、55,000 と推定された。以上の結果は、本酵素が2個の同一のサブユニットから構成される事を示している。

4. 酵素の性質

本酵素の最適 pH は 0.2 M リン酸緩衝液中で pH 7.6 であった (Fig. 1-3)。又、最適温度は、Fig. 1-4 に示す様に、36°C であった (緩衝液 A 中で 1 時間反応)。本酵素は 5°C では、pH 5.5 ~ 8.5 の間で安定であるが、45°C、10 分間の処理で 50% の活性が、55°C、10 分間の処理では全活性が失われた。本酵素はリン酸 (0.02 ~ 0.2 M)、グリセリン (5 ~ 25%) で安定化されるが、 β -メルカプトエタノールや金属イオン (Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) は、活性、安定性のいずれにも影響を与えなかった。

5. 酵素活性に対する阻害剤の影響

種々の濃度の diisopropylphosphofluoridate (DFP), p-chloro-mercuribenzoate (PCMB), 及び EDTA の酵素活性に対する影響を調べた (Table 1-3)。1 μM の DFP, 10 μM の PCMB で活性は、ほぼ完全に阻害されたが、EDTA は 100 mM でも殆ど影響を与えなかった。さらに 50 μM , 或いは 5 μM の PCMB で阻害された活性は、0.3 mM β -メルカプトエタノール存在下で 15 分間、処理すると、それぞれ、80%, 90% 活性が回復する事から、活性中心には、セリンよりはむしろシステインが関与していると考えられる。

6. 反応速度定数 K_m , V_m の決定

酵素反応初速度と、基質 (Accl) 濃度の Lineweaver - Burk プロットから K_m 値は 4.4 mM, V_m 値は 4.7 $\mu\text{mole/min/mg}$ を得た。これより代謝回転数は蛋白質分子量 100,000 を用い

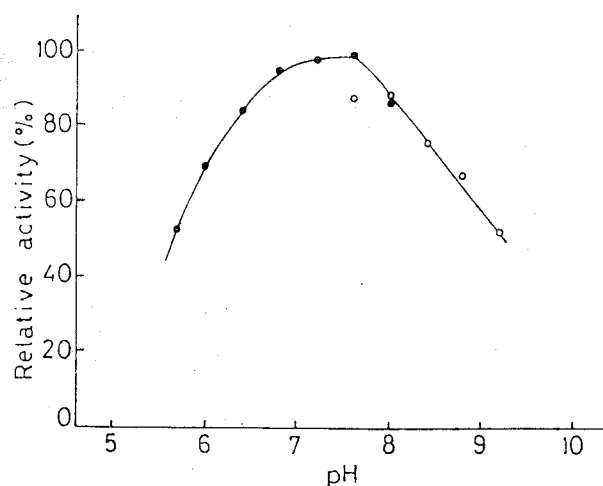


Fig. 1-3. Effect of pH on the enzyme activity. Enzyme reactions were performed in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 5.7 - 8.0) (●), or 0.1 M barbital-HCl buffer (pH 7.6 - 9.2) (○) containing 6-aminohexanoic acid cyclic dimer as substrate.

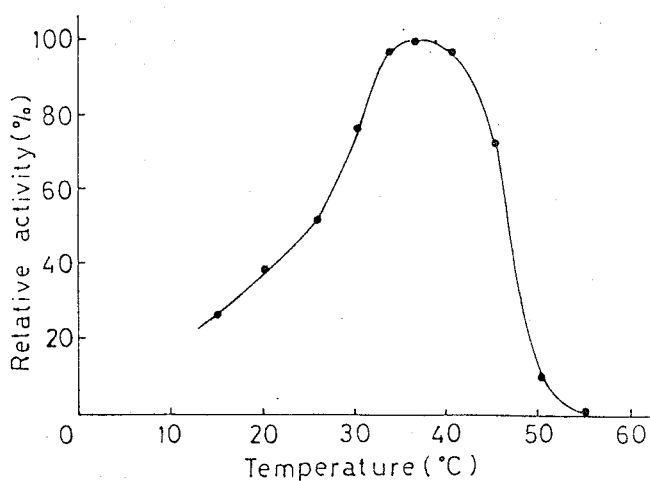


Fig. 1-4. Temperature-activity curve of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase reaction. Enzyme reactions were performed in buffer A containing 20 mM of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer.

Table 1-3. Effect of inhibitors on the activity of 6-amino-hexanoic acid cyclic dimer hydrolase

Diisopropyl-phosphofluoridate		p-Chloromercuri-benzoic acid		Ethylenediamine-tetraacetic acid	
concentration (μM)	activity (%)	concentration (μM)	activity (%)	concentration (μM)	activity (%)
50	0	50	0	0.15	95
5	2	5	12	0.03	97
0.5	52	0.5	83		
0.05	100	0.05	95		

The enzyme (0.2 ml) and inhibitor (0.2 ml) were preincubated for 15 min at 30 °C before the reaction. Activity was expressed as percentage of the activity without inhibitor.

7.9 sec⁻¹ と計算された。

7. 基質特異性

種々の基質（ナイロンオリゴマーや、その類縁化合物、ペプチド、アミド化合物）に対する精製酵素の作用能力を検討した。充分量の酵素を用いた場合には、基質 Acd から Ald を定量的に生産するが、モノマーの Aldx への転換は認められなかった。又、以下の化合物を基質として充分量の酵素と反応させ、生成物をペーパークロマトグラム（第2節参照）で展開後、ニンヒドリン定色反応で分析したが、活性は検出できなかった。Aldx オリゴマー（重合度 2~6）、 ϵ -N-carboxy-6-aminohexanoic acid オリゴマー（重合度 1~6）、 ϵ -N-acrylyl-6-aminohexanoic acid, carbobenzoxy-6-aminohexanoic acid, 6-aminohexanoyl-6-aminohexanoic acid methyl ester, 種々の環状アミド（2-pyrrolidone, δ -valerolactam, ϵ -カプロラクタム, cephalosporine), 環状ジアミド（glycylglycyl-anhydride, alanylalanyl-anhydride, isoleucyl-isoleucyl-anhydride), N-carboxybenzoxy-glycylalanine, N-carboxybenzoxy-glycine, ϵ -N-acetyllysine, ϵ -N-benzoyllysine 本酵素は、以下のペプチドに対しても活性を持たなかった。50種類のジペプチド, 16種類のトリペプチド, アラニンオリゴマー（2~5量体）, グリシンオリゴマー（2~5量体）。さらに本酵素には、アスパラギン, グルタミン, ロイシルアミド, アラニルアミドに対する amidase 活性, カゼイン分解活性も認められない事から、Acd のみを基質とする極めて基質特異性の高い酵素である事が判明した。

8. アミノ酸組成

本酵素は、Table 1-4 に示す様に、500 個のアミノ酸残基より成り、分子量は、51600 と計算される。3 個のシステイ

ンの中の少なくとも1個は、活性中心に存在する。又、アミノ酸組成から、本酵素の偏比容として0.74と計算されたが、この値を沈降平衡法での分子量計算に用いた。

Table 1-4. Amino acid composition of 6-aminoheptanoic acid cyclic dimer hydrolase

Amino acids	Amount recovered (mmol/g protein)	Number of residues
Lysine	0.250	12
Histidine	0.140	7
Ammonia	0.758	36
Arginine	0.646	32
Tryptophan	0.185	9
Aspartic acid	0.907	45
Threonine ^a	0.495	25
Serine ^a	0.665	33
Glutamic acid	0.885	44
Proline	0.648	32
Glycine	0.954	48
Alanine	1.430	71
Cysteine ^b	0.067	3
Valine	0.860	43
Methionine	0.145	7
Isoleucine	0.434	22
Leucine	0.922	46
Tyrosine	0.183	9
Phenylalanine	0.254	13
Total		500

a) The data were obtained by extrapolating to 0 h hydrolysis.

b) The datum was determined after performic acid oxidation.

Molecular weight was 51600. Recovery: 88 %.
Moisture content: 9.0 %.

第4節 考察

微生物がナイロンオリゴマーの様な非天然基質を分解する酵素系を獲得する過程として、次の様な可能性が列举できよう。i) 遺伝子の重複、挿入、転位、逆位、欠失等を含む大きな遺伝子変化を伴った全く新しい酵素の創生を必要とする。ii) 既存の酵素の基質特異性が広い為に、細胞内に存在する生理的基質の類似物として非天然基質が分解される。iii) 類縁酵素上に起った点突然変異等のわずかな変異によって基質特異性が変化し、非天然化合物への作用が可能となる。この様な問題を検討する為には、その酵素を単離し、諸性質を知る必要がある。尚、遺伝子の解析は、第2, 3章で扱う。

精製した 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI) は、Acid に対する比活性 (代謝回転数) が 7.9 sec^{-1} で普通の加水分解酵素より 1~2桁小さい。例えば、cyclic amide hydrolase に属する penicillinase でも 35~260 と報告されている。³²⁾ この様に EI が極めて効率の悪い酵素であり、Acid のみを基質とし、天然に存在する 100 種類のアミド化合物やペプチドに作用しない特殊酵素である点を考慮すると、新しく進化により出現した酵素と考えるのが妥当であろう。従って ii) の可能性は否定される。

一方、6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) も当研究室で精製されており、諸性質も明らかにされている。²⁶⁾ 本酵素は、分子量 84,000 で 42,000 のサブユニット 2 個から成るホモダイマー酵素であり、Arx オリゴマー (2~20 量体) に活性があり、N 末端側からエキソ型の加水分解反応を行う (Table 1-5)。又、Acid や ϵ -カプロラクタム、天然のアミド化合物、ペプチドには作用しない基質特異性の高い酵素で

ある。

EI, EII の様なナイロン工業成立以前に基質を持たない特殊酵素の起源を調べる為に、精製した EI から抗血清を調製し、免疫的試験を行ったが、EI 以外に、抗原抗体反応を示す蛋白質を K172 株中から検出できなかった(第2章参照)。従って、既存の蛋白質上の突然変異により基質特異性が変化し、ナイロンオリゴマー分解活性が発現したものと仮定すると、その過程で、遺伝子の重複を伴っていない限り、天然型化合物を基質とする既存の酵素の1つを代償にした事になる。そこで、この様な分解活性の発現が、全く新しい遺伝子の創生を必要とする事を期待して、その遺伝子座を検討した。その結果、第2章で述べる様に、両酵素ともプラスミドに支配される事が判明した。

Table 1-5. Effect of the chain length of 6-aminohexanoic acid oligomer on the reaction rate

Substrate	Activity (%)
6-Aminohexanoic acid	
Dimer	100
Trimer	80
Tetramer	60
Pentamer	25
Hexamer	13
Icosamer	0.16
Hectamer	0

Activity is expressed as percentage of the activity toward the dimer. The reaction time: 1 h for the dimer, trimer and tetramer; 2 h for the pentamer and hexamer; 24 h for the icosamer and hectamer. The substrate concentration was 0.1 %.

第5節 要約

1. *Flavobacterium* sp. KI 72 株の生産する 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase を DEAE-sephadex A50, sephadex G200, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動, sephadex G200 カラムクロマトグラフィー, 超遠心沈降像のいずれにおいても均一であった。
2. 本酵素の沈降係数 (S_{20}) は 5.7 S, 沈降平衡法で求めた分子量は 100,000 であり, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で決定したサブユニット分子量は 55,000 であった。すなわち、本酵素はホモダイマー酵素である。
3. 反応の最適温度は 36°C, 最適 pH は 7.6 で 5°C では pH 5.5 ~ 8.5 の間で安定であった。又、45°C, 10 分間の熱処理で 50% の活性が, 55°C, 10 分間処理で全活性が失われた。ε-アミノカプロン酸環状二量体に対する K_m は 4.4 mM, V_m (代謝回転数) は 7.9 sec⁻¹ であった。
4. 本酵素の活性は 1 μM diisopropylphosphofluoridate, 10 μM p-chloromercuribenzoate で強く阻害されるが、100 mM ethylenediaminetetraacetic acid では殆ど阻害されなかった。p-chloromercuribenzoate で阻害された活性は、β-メルカプトエタノールで回復した。すなわち活性中心にはシステイン残基が関与している。
5. 本酵素は ε-アミノカプロン酸環状二量体から同直鎖状二量体への転換だけを触媒し、同直鎖状オリゴマー (2~6 量体), 種々の環状アミド, 環状ジアミド, アミド化合物, オリゴペプチド, カゼインには活性を持たなかった。本酵素は 500 個のアミノ酸残基より成り、アミノ酸組成からの

推定分子量は、103,200 であった。以上の結果より、本酵素は新しい *cyclic amide hydrolase* と分類するのが妥当である。

第2章 ナイロンオリゴマー分解酵素系のプラスミド支配

第1節 緒言

総性, 抗生物質生産性, 毒素生産性, 薬剤・重金属イオン耐性等の生命維持に本質的でない機能がプラスミドに支配される例は多い。歴史的には、プラスミドの研究は1946~50年の Lederberg や Tatum による F 因子³³⁾の発見に始まる。1959~60年には渡辺らにより薬剤耐性因子が報告されたが³⁴⁾, この様な初期の研究は、いずれも大腸菌, サルモネラ菌等の腸内細菌内に存在する伝達性プラスミドを対象としたものであった。非伝達性プラスミドも含む広範囲の分子生物学的研究は、1970年前後に開発された CaCl_2 を用いた形質転換技術³⁵⁾, CsCl -エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心法によるプラスミドDNAの単離法³⁶⁾の確立によって開始する。

Pseudomonas 属には、有機化合物の分解代謝に関与するいわゆる「代謝プラスミド」を保有するものが多い。現在、報告されている代謝プラスミドの例を Table 2-1 にまとめた。³⁷⁾ *Pseudomonas* 属は、一般に多種多様な有機物の分解能力を持つ菌群であるが、この様な代謝能力の獲得(すなわち、遺伝子の進化)や伝播に、プラスミドが重要な機能を果たしている」と推察されている。例えば *alkane hydroxylase*³⁸⁾ や *catechol 2,3-oxygenase*³⁹⁾ 等の分子状酸素と基質とする酵素, すなわち光合成生物出現後に発生したと考えられる比較的、新しい酵素が、それぞれ、OCT⁴⁰⁾, TOL³⁹⁾ プラスミドに支配されている。最近では、2,4-Dの様な農薬の代謝^{41, 42)}, 或いはハロゲン化酢酸⁴³⁻⁴⁵⁾、多環芳香族炭化水素(フェナントレン等)⁴⁶⁾の分解にプラスミドが関与する事が報告されている。

本研究室で分離した *Flavobacterium* sp. KI72株は 6-ナイロン工場廃水に含まれる非天然基質、 ϵ -アミノカプロン酸環状二量体(Acd)を基質として生育可能である。さらにこの化合物の代謝に 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI), 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) の2種類の酵素が関与する事。両酵素とも天然のアミド化合物、ペプチドに活性を持たない特殊酵素である事は前章で明らかにした。本章では両酵素とも KI72 株が保持する3種類のプラスミド、pOAD1, pOAD2, pOAD3 の中で pOAD2 に支配される事をプラスミド消去実験、形質転換、プラスミド DNA の電子顕微鏡観察、ならびに制限酵素解析から証明した。

Table 2-1. Degradative plasmids

Plasmid	Degradative pathway	Size (Mdal)	Strain
NAH	Naphthalene	46	<i>Pseudomonas putida</i>
SAL	Salicylate	42 - 55	"
CAM	Camphor	> 100	"
TOL	p- or m-Xylene	76	"
OCT	n-Octane, ethylbenzene	> 100	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
NIC	Nicotinate, nicotine	-	<i>Pseudomonas convexa</i>
pJP1	2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid	58	<i>Alcaligenes paradoxus</i>
pAC21	p-Chlorobiphenyl	65	<i>Klebsiella</i> sp.
pAC25	3-Chlorobenzoate	-	-
puO1	Monofluoroacetic acid Monochloroacetic acid	40	<i>Moraxella</i> sp.
pOAD2	6-Aminohexanoic acid cyclic dimer	29	<i>Flavobacterium</i> sp.

第2節 実験材料及び方法

使用菌株 *Flavobacterium* sp. KI72株を親株として使用した。
KI72由来の他の株は Table 2-2 に示す。

培養 KI72株、及びそのロイシン要求株の KI721 の培養には CDY 培地 (第1章、第2節) 或いは、これに L-ロイシン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した培地を使用した。一方、消去株には、LB 培地 (基本組成: トリプトン, 10; 酵母エキス, 5; NaCl, 5; グルコース, 1 g/l (pH 6.8)) を用いた。特に記載しない限り、培養は、500 ml の坂口フラスコ (実容 150 ml) を用いて、30°C で往復振盪で行った。

消去株の代謝能力の確認には、4種類の寒天平板 (Acd, Ald, Ahx, M 平板培養) を使用した。いずれの培地も、 K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 3; NaCl, 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; 寒天, 12 g/l を共通成分とし、炭素源、窒素源として、Acd, 2 g/l (Acd 平板), ϵ -アミノカプロン酸直鎖状2量体 (Ald), 3 g/l (Ald 平板), ϵ -アミノカプロン酸 (Ahx), 5 g/l (Ahx 平板), NH_4Cl , 1 g/l とグルコース, 3 g/l (M 平板) をそれぞれ含んでいる。

粗酵素液の調製 CDY 又は LB 培地で $1 \sim 2 \times 10^9$ cells/ml まで培養した菌体を、冷却遠心分離 (8,000 $\times g$, 10 分間) で集菌後、緩衝液 A (第1章、第2節) で2回洗浄し、5 ml の同緩衝液に懸濁した。超音波破碎 (20 kHz, 6 分間処理) 後、20,000 $\times g$, 10 分間、遠心分離し、この上澄画分を粗酵素液とした。

酵素活性 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolyase (EI) 或いは、6-aminohexanoic acid oligomer hydrolyase (EII) の定性分析には、それぞれ、20 mM Acd, 20 mM Ald を基質とし、

Table 2-2. *Flavobacterium* strains used for this study.

Strain	Phenotype	Derived from	Plasmid	Reference or treatment
KI72	Acd ⁺ Ald ⁺ Ahx ⁺	wild	pOAD1, pOAD2, pOAD3	(24, 25, 26)
KI721	Acd ⁺ Ald ⁺ Ahx ⁺ Leu ⁻	KI72	ND	NTG mutation
KI722	Acd ⁻ Ald ⁻ Ahx ⁺	KI72	pOAD1, pOAD3	curing by mitomycin C (1 µg/ml)
KI723	Acd ⁻ Ald ⁻ Ahx ⁺⁺	KI72	pOAD11, pOAD3	"
KI724	Acd ⁻ Ald ⁻ Ahx ⁻	KI72	pOAD12, pOAD3	"
KI7211	Acd ⁻ Ald ⁻ Ahx ⁺ Leu ⁻	KI721	ND	spontaneous curing
KI7212	Acd ⁻ Ald ⁻ Ahx ⁺ Leu ⁻	KI721	pOAD1, pOAD3	curing by mitomycin C (20 µg/ml)
KI723T1	Acd ⁺ Ald ⁺ Ahx ⁺⁺	KI723	pOAD11, pOAD2, pOAD3	transformation with KI72 plasmid
KI723T2	Acd ⁺ Ald ⁺ Ahx ⁺⁺	KI723	ND	"

Acd⁺, Ald⁺ and Ahx⁺ are metabolic activities on Acd, Ald and Ahx.

NTG is N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Hyper growth is shown by ++.

ND means not determined.

等量の粗酵素液と混合後、30℃で一定時間、保持した。5 μ lの反応液を濾紙（東洋 No. 50）に置き、n-ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 2 で展開後、生成物を 0.2% ニンヒドリン溶液で発色させた。EI 活性の定量は、第 1 章 第 2 節の方法で、EII 活性の定量は、木下らの方法³⁶⁾に従った。

Acid 資化性欠損株の分離 KI72, 或いは KI721 株を 5ml の LB 培地で、30℃, 16 時間前培養後、マイトマイシン C (1 μ g/ml), SDS (40 μ g/ml), エチジウムブロミド (10 μ g/ml) を含む LB に 0.1% 植菌し、30℃で 5×10^9 cells/ml まで培養した。増殖上限温度でのプラスミド消去の場合には、本培養で薬剤を添加せず、培養温度を 41℃ とした。次に、LB 寒天平板上で単一コロニーを分離し、代謝能力の確認の為に、Acid, Ald, Arx, M の各寒天平板へレプリカした。

CsCl-エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心³⁶⁾ CDC 培地 (CDY 培地の酵母エキスの代りに、0.2% カザミノ酸, 1mM 2'-デオキシアデノシン, 12.4 μ M [³H] チミジン (94 μ Ci/ μ mole) を含む) 20ml で $0.5 \sim 1 \times 10^9$ cells/ml まで培養した KI72 株を集菌後、トリス-EDTA 緩衝液 (20mM トリス-HCl, 2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.4) で 2 回洗淨した。菌体を 2ml の 20% 蔗糖を含むトリス-EDTA 緩衝液に懸濁し、lysozyme (100mg/ml) を最終濃度 3mg/ml とする様に添加して、30℃で 2 時間、保持した。SDS 添加 (最終濃度 2%) で得た溶菌液は、Bazaral と Helinski の方法³⁶⁾に従って CsCl-エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心分離を行った。条件は、日立分離用超遠心機 80P (ローター 65T) を使用し、81,000 xg 40 時間 (20℃) で行った。

プラスミド DNA の調製 プラスミド DNA の調製は、Palchaudhuri らの方法⁴⁷⁾に従った。500ml の CDY 培地 (KI72, KI723T1 株)

又は、LB 培地（消去株）で 10^9 cells/ml まで培養後、集菌した。トリス-EDTA 緩衝液で 2 回洗浄後、20% 蔗糖を含む同緩衝液 40 ml に懸濁し、上述の様に溶菌させた。得られた溶菌液 66 ml に対し、食塩を最終濃度 1 M となる様に加え、さらに、2 N NaOH を添加して pH を 11.9 に上昇させた。室温で 2 分間、保持後、3 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を加えて、pH 8.5 に戻した。変性した DNA は、ニトロセルロース (20 g) に吸着させ、 $5,000 \times g$ 、10 分間の遠心分離で除去した。DNA を濃縮する為に、得られた上澄液 (35 ml) を 1 ml の飽和 CsCl に重層し、 4°C で $48,000 \times g$ 16 時間、遠心分離した。遠心管の底部画分 5 ml にエチジウムブロミド（最終濃度、 $0.3 \sim 0.5 \text{ mg/ml}$ ）を加え、さらに屈折率が $1.393 \sim 1.395$ となる様に CsCl を添加して、上述の条件で平衡密度勾配遠心分離を行った。プラスミド画分を分取し、イソアミルアルコールでエチジウムブロミドを除去後、 $0.1 \times \text{SSC}$ に一晚、透析して精製プラスミド DNA を得た。

電子顕微鏡観察 Innan の方法⁴⁰⁾に従い、プラスミド DNA を電子顕微鏡（日立 B 型）により観察した。プラスミド DNA の分子量は、ColEI::Tn3⁴¹⁾ を内部規準 (7.4×10^6 ダルトン (Mdal)) として決定した。

制限酵素による DNA の切断 プラスミド DNA ($0.5 \sim 2.0 \mu\text{g}$, 50 μl の反応系) に 10 単位の酵素 (EcoRI 又は HindIII) を添加し、 37°C で 1 ~ 3 時間反応させた。反応用緩衝液として、100 mM トリス-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 (pH 7.5) [EcoRI], 6 mM トリス-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ bovine serum albumin (pH 7.5) (HindIII) を使用した。反応停止は、 65°C , 10 分間の加熱処理を行った。

アガロースゲル電気泳動⁴²⁾ 制限酵素処理した DNA 断片を

1% アガロースゲル電気泳動で分析した。50 μ lの試料に15 μ lのBJ-II 溶液(50 mM EDTA, 50% (w/vol) 蔗糖, 0.05% ブロモフェールブルー), 10 μ lのエチジウムブロミド溶液(1.43 mg/ml)を添加し、アガロースゲルに負荷した。泳動用緩衝液は 0.04 M トリス-酢酸, 0.02 M CH_3COONa , 1 mM EDTA (pH 8.0) を使用し、これにアガロースを1%溶かしてゲルを作製した。電気泳動には、縦型スラブゲル電気泳動装置(EC 機器 470型)を使用し、定電圧 75 V/15 cm ゲルで8時間行った。

DNA 断片の分子量の決定には、 λ -Hind III 断片(14.9, 6.07, 4.13, 2.71, 1.42, 1.14, 0.34 Mdal)⁵¹⁾、又は、 λ -EcoRI 断片(13.7, 4.92, 3.70, 3.30, 3.02, 2.16 Mdal)⁵¹⁾を標準にした。各菌株に保持される数種類のプラスミドを別個に分画する為には、平衡密度勾配遠心法で調製したプラスミド 150 μ l (濃度 200 μ g/ml)を 0.55% アガロースゲル上で75 V, 16時間、泳動を行った。エチジウムブロミドで染色後、DNA 画分を切り出し、Vogelstein と Gillespie の「ガラス吸着法」⁵²⁾(Fig. 2-1)に従って、ゲル中からプラスミド DNA を回収した。

形質転換 Cohen らの方法⁵³⁾に従って、形質転換を行った。但し、使用した受容菌(KI72由来の消去株)は細胞外層に、粘質物質を生産する為、以下の前処理を行った。受容菌を、

LB(10 ml)で 10^9 cells/mlまで培養後、集菌洗浄し、*pronase* (科研化学)、*cellulase*, *maceroyzyme* (近畿ヤクルト)、 α -*amylase* (大和化成)、各 3 mg/ml を含む生理食塩水 3 ml に懸濁した。30 $^{\circ}\text{C}$ で90分間、保持後、生理食塩水で2回洗浄し、5 ml の 50 mM CaCl_2 に懸濁し、0 $^{\circ}\text{C}$ で20分間、静置した。冷却遠心分離後、2 ml の 50 mM CaCl_2 に懸濁した細胞を感受性細胞として使用した。この感受性細胞 0.2 ml (約 5×10^9 cells/ml)

と、15 μ g/ml のプラスミド DNA (KI72 株から平衡密度勾配遠心法で調製したもの) 0.1 ml とを混合し、0℃ で 1 時間保持後、Acd 寒天平板へまき、30℃ で 7 日間、培養した。

抗原抗体反応 親株から精製した 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI) (0.1 mg) を Freund adjuvant (incomplete type (B))⁵³⁾ に懸濁させ、ウサギに注射した。7 日間隔で、3 回投与後、全採血し、血清区分 (抗 EI 血清) を得た。抗原抗体反応は、Ouchterlony 法⁵⁴⁾ により行った。

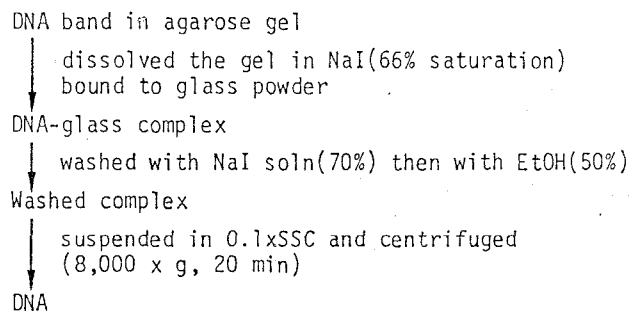


Fig. 2-1. Recovery of DNA from agarose gel

第3節 結果

1. プラスミド消去実験

KI72株を $[^3\text{H}]$ チミジンを含む培地で培養した後、lysozyme, SDSで処理した溶菌液をCsCl-エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心法によって分析した結果がFig. 2-2である。全DNAの約4%に相当するDNAが開環状(ccc) DNAの位置に認められプラスミドの存在が示された。ε-アミノカプロン酸の環状、或いは直鎖状2量体の分解がプラスミドに依存しているならば、細胞からプラスミドを除去すると資化性も同時に欠落するはずである。Table 2-3に示す様に、マイトマイシンC, SDS, エチジウムブロミドの様なプラスミド消去剤で処理するか、又は、本菌の発育許容最高温度で増殖させると、80%以上の頻度で資化性が欠落した株が得られた。Acd資化性、Ald資化性はいずれの消去法でも常に同時に欠落するか、ARx資化性については、例外的に向上する場合と欠損する場合とがあった。又、KI72株をLB培地で数世代培養するだけで、約2%の頻度でAcd, Ald資化性欠損株が得られた。消去株からAcd資化能を回復する復帰変異は 10^{-10} 以下の頻度で、現在までに観察されていない。

2. 消去株中の酵素活性

消去株中に6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI) 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) 活性が存在するか否かを調べる為、細胞を破碎し得られた抽出液を粗酵素液として、Acd, 又はAldを基質として反応を行い、反応生成物をTNBS比色定量法^{25, 26)}、ペーパークロマトグラムにより解析した。Table 2-4に示す様に、いずれの消去株(KI722, KI723, KI724, KI7211, KI7212)においても、両活性とも原株

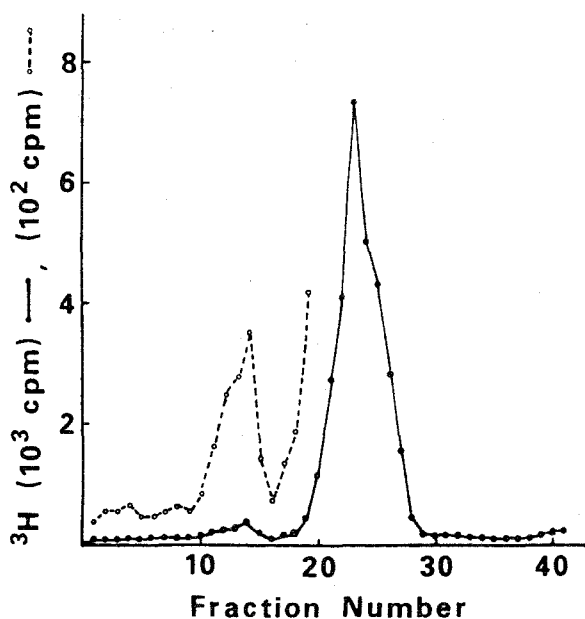


Fig. 2-2. CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation pattern of [^3H]-thymidine labeled DNA of KI72. Experimental procedures are given in "Materials and Methods". Fractions of 6 drops were taken from the bottom of the centrifugation tube, and radioactivities in trichloroacetic acid-insoluble materials of 25- μl samples were counted. --- $\bullet$ --- shows 10 times expanded scale of $\bullet$.

Table 2-3. Phenotypes of cured strains with various treatments derived from Flavobacterium sp. KI72

Treatment	Phenotype			Frequency
	Acid	Ald	Ahx	
Mitomycin C (1 $\mu\text{g/ml}$)	-	-	+	351/436
	-	-	++	1/436
	-	-	-	2/436
Sodium dodecyl sulfate (40 $\mu\text{g/ml}$)	-	-	+	165/175
Ethidium bromide (10 $\mu\text{g/ml}$)	-	-	+	54/54
Growth at 41°C	-	-	+	98/100

Acid, Ald and Ahx are the same as in Table 2-2.

の0.5%以下で検出不能であった。消去株では、EI酵素の活性が欠損しているだけでなく、その蛋白質が完全に欠落している事を免疫反応を用いて試験した。EIの精製標品に対して得られたウサギの抗血清を中央の穴に入れ、1~6の穴には親株と消去株の抽出液を入れて Ouchterlony 試験を行った結果が Fig. 2-3 である。沈降線は、親株抽出液との間のみで、消去株との間では作らない。

3. 形質転換

消去株から感受性細胞を作り、親株のプラスミド DNA を用いて形質転換を行った。KI723株においてのみ成功例が認められ、Acd 資化能を回復した形質転換株が 6×10^9 の細胞あたり11個得られた。他の消去株ではまだ成功していないが原因は不明である。得られた形質転換株 KI723T1 では、EI、EII 両活性とも原株水準まで回復していた (Table 2-4 参照)。さらに、形質転換株で回復した EI 蛋白質が原株の EI と免疫的に同一であることを Ouchterlony 試験によって確認した。抗 EI 血清に対して作る形質転換株、KI723T1、KI723T2 の沈降線は、原株のものと融合する (Fig. 2-4)。

4. 電子顕微鏡観察

親株 (KI72)、消去株 (KI722, KI723, KI724, KI7212)、及び形質転換株 (KI723T1) からプラスミド DNA を調製し、電子顕微鏡下で観察した。Fig. 2-5 は、その例で、原株 KI72 と消去株 KI723 のプラスミド標品である。各標品とも、内部標準として Col EI::Tm3 (7.4 Mdal) を含んでいる。内部標準と対照して各プラスミド分子の長さを測定し、分子量を決定した結果を Table 2-5 に示した。これから原株 KI72 は、分子量の異なる少なくとも2種類のプラスミドを保有する事、37 Mdal プラスミドは原株、消去株、形質転換株に共通である事が判

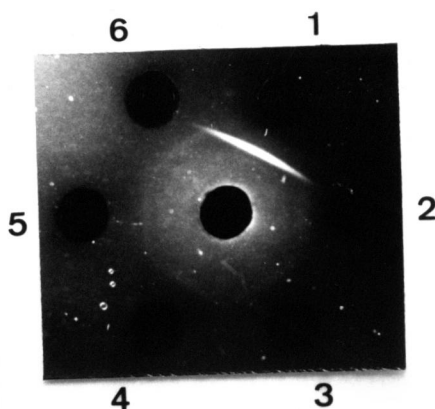


Fig. 2-3. Double diffusion test between cell extracts of wild (KI72) and cured strains and anti-6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase serum. Contents of wells were: central well, antiserum; well 1, cell extract of KI72; well 2, KI722; well 3, KI723; well 4, KI724; well 5, KI7211; and well 6, KI7212.

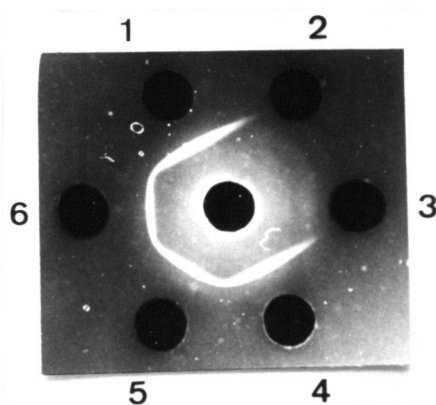


Fig. 2-4. Double diffusion test between cell extracts of wild (KI72), recipient (KI723) and transformant (KI723T1 and KI723T2) strains, and anti-Acd hydrolase serum. Contents of wells were: central well, antiserum; wells 1 and 5, cell extract of KI72; well 2, KI723; well 3, KI722; well 4, transformant KI723T1 and well 6, transformant KI723T2.

Table 2-4. Enzyme activities of wild, cured and transformant strains

Strain	Relative specific activity	
	EI	EII
KI72	100 (21.3) ^a	100 (3.6) ^a
KI722	< 0.5	< 0.5
KI723	< 0.5	< 0.5
KI724	< 0.5	< 0.5
KI7211	< 0.5	< 0.5
KI7212	< 0.5	< 0.5
KI723T1	84	79

a) The numbers in parentheses indicate the specific activities (mU/mg protein).

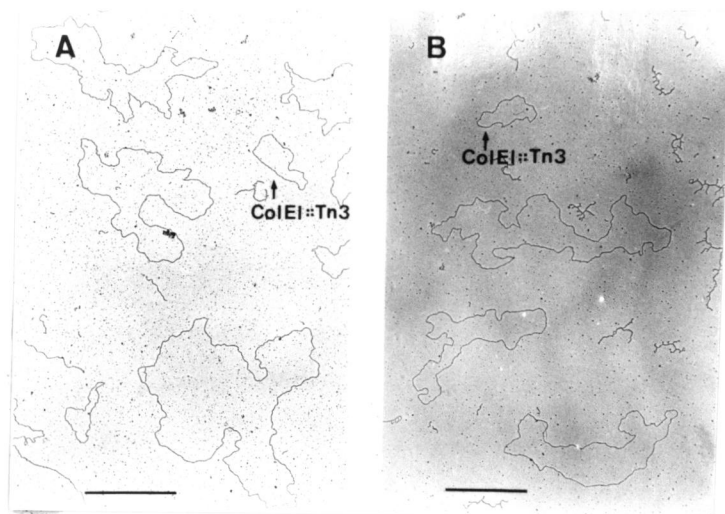


Fig. 2-5. Electron micrographs of plasmid DNA from KI72 (A) and from KI723 (B). Bar = 2 μ m.

Table 2-5. Plasmid size determination by electron microscopy

Strain	Molecular weight (Mdal)(mean $\pm$ s.d.)		
KI72	28.5 $\pm$ 1.2 (36)	37.2 $\pm$ 0.7 (13)	
KI723	23.6 $\pm$ 0.8 (29)	36.6 $\pm$ 0.9 (18)	
KI723T1	23.8 $\pm$ 0.7 (37)	28.8 $\pm$ 0.8 (29)	37.2 $\pm$ 1.1 (23)
KI722	26.1 $\pm$ 0.9 (23)	37.6 $\pm$ 0.8 (17)	
KI7212	26.3 $\pm$ 0.8 (28)	37.6 $\pm$ 1.3 (19)	
KI724	28.0 $\pm$ 1.1 (42)	37.6 $\pm$ 1.2 (20)	

The numbers in parentheses indicate the numbers of molecules measured

る。一方、小さい 29 Mdal のプラスミドは、消去処理によって分子量が殆ど変化しない場合 (KI724) と、26 Mdal (KI722, KI72/2), 23 Mdal (KI723) に縮小する場合とかある。さらに形質転換株、KI723T1 では、受容株として使用した KI723 の 2 つのプラスミド (37 Mdal と 23 Mdal) 以外に、親株由来の 29 Mdal のプラスミドが認められるので EI, EII を支配する遺伝子は、このプラスミド上に存在すると推察される。

消去処理によって親株の 29 Mdal のプラスミド区分が変動する現象には 2 つの解釈が可能である。

i) 29 Mdal のプラスミドは消去処理によって 0.5 Mdal (KI724), 3 Mdal (KI722), 或いは 6 Mdal (KI723) の欠失がおこる。この領域に両酵素を支配する遺伝子が存在すると説明する。この説明では、形質転換株中に同じ起源を持つ 23 Mdal と 29 Mdal の 2 種類のプラスミドが共存している事になり、不和合性の法則⁵⁾に反する上、KI724 株での欠失領域 0.5 Mdal では、EI, EII 構造遺伝子 (蛋白質のサブユニット分子量から、それぞれ、0.95 Mdal, 0.8 Mdal と推定される) を完全に含み得ない等、不十分な点が多い。

ii) 原株の 29 Mdal のプラスミドは、大きさからは区別できない 2 種類のプラスミドの混合であり、消去処理により、EI, EII を支配する一方のプラスミドが完全に脱落する。従って、消去株でのプラスミドの大きさの変動は、残ったもう 1 種類のプラスミドの構造変化を反映する。以下の実験結果から ii) の解釈が正しい事が判明した。

5. アガロースゲル電気泳動によるプラスミドの分画

CsCl-エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心法で調製したプラスミドを 0.5% アガロースゲル電気泳動で分画した (Fig. 2-6)。親株、消去株、形質転換株のいずれでも、大きい

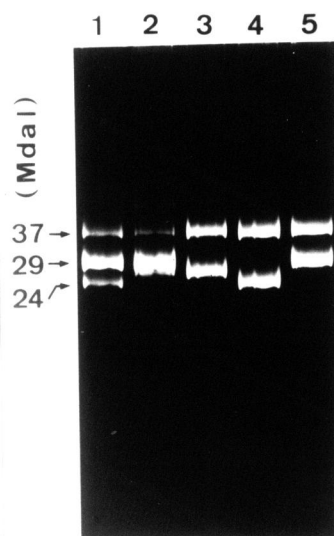


Fig. 2-6. Agarose gel (0.55%) electrophoresis of plasmid DNA (0.7 - 2 μ g) Plasmid DNA from each strain was prepared by CsCl-EtBr density gradient centrifugation. Slot 1, KI723T1; slot 2, KI72; slot 3, KI722; slot 4, KI723; slot 5, KI724.

37 Mdal プラスミドは、同じ移動度を示し、電子顕微鏡の結果と一致した。親株の小さいプラスミド区分には、非常に近接した2本のバンドが認められる。これは、電子顕微鏡では分離できず、ともに、28.5 Mdal 区分として同定したものである。消去株では、その一方のバンド (29 Mdal) は、完全に失われ、他方 (27 Mdal) は親株とは異なった移動度を示す。形質転換株では、受容株由来の2種類のプラスミド (24 Mdal と 37 Mdal) に親株由来の 29 Mdal のバンドが認められる。

6. 制限酵素解析によるプラスミドの同定

Fig. 2-6 の各バンドを切り出して DNA を回収した後、制限酵素 EcoRI, 或いは HindIII で分解し、得られた断片を再び、アガロースゲル上で電気泳動した結果を Fig. 2-7 ~ 2-9 に示した。以下に述べる結果から、親株は3種類のプラスミド、pOAD1 (26.2 Mdal), pOAD2 (28.8 Mdal), pOAD3 (37.2 Mdal) を保有するが、この中で pOAD2 が Acd の分解に関与する事を結論した。

i) pOAD2. 上述した様に親株の小さいプラスミド区分は分子量が極めて近い2種類のプラスミドの混合物であり、アガロースゲル上で別個に分離できなかったのも、まず始めに、形質転換株の 29 Mdal のプラスミド (まん中の移動度を示すバンドから回収) の解析を行った。このプラスミドを pOAD2 と呼ぶが、これが単一種である事は、HindIII 処理で得られる6本のバンド (Fig. 2-7 (B, C), T(2)), EcoRI 処理で得られる5本のバンド (Fig. 2-8 (B, C), T(2)) の分子量合計がほぼ 29 Mdal である事から明らかである (Table 2-6)。HindIII 或いは EcoRI で切断した pOAD2 の断片のすべてが、親株の小さい方のプラスミド区分にも認められるので、親株、形質転換株の間で、pOAD2 の構造に変化はない。一方、消去株 (KI722, KI723,

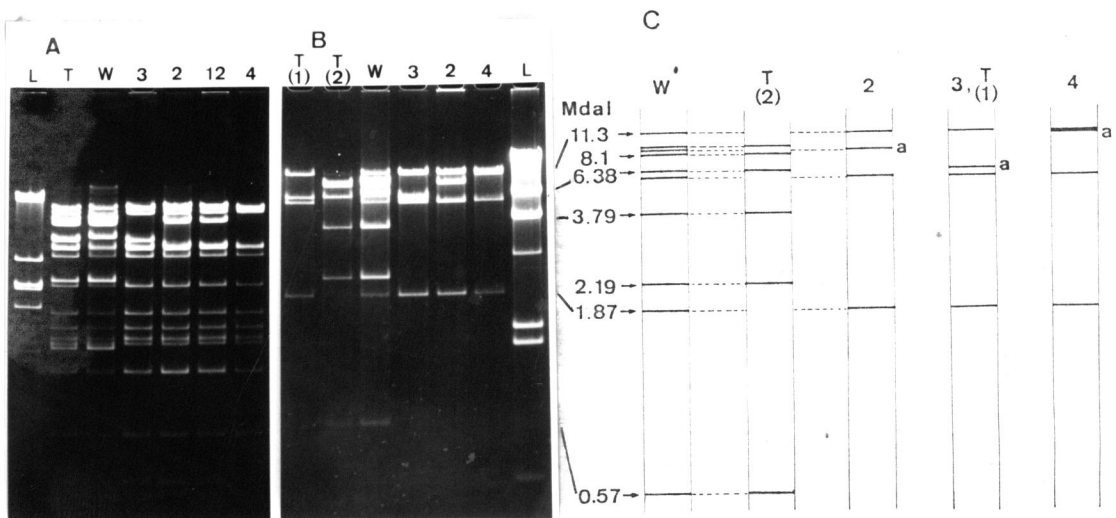


Fig. 2-7. Agarose gel (1 %) electrophoresis of plasmid DNA digested with HindIII restriction endonuclease. (A) Unfractionated plasmid samples prepared by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation were used. The fragments of the phage λ DNA digested with EcoRI were included as molecular weight standard (L). T, plasmid DNA from KI723T1; W, KI72; 3, KI723; 2, KI722; 12, KI7212; 4, KI724. (B) Plasmid samples purified by agarose gel electrophoresis were analyzed and their digestion patterns were illustrated in (C). T(1), pOAD11 of KI723T1 recovered from the fastest-migrating band of KI723T1 in slot 1 of Fig. 2-6; T(2), pOAD2 of KI723T1 recovered from the medium-sized band of KI723T1; W, the smaller plasmid fraction of KI72 (mixture of pOAD1 and pOAD2); 3, pOAD11 of KI723; 2, pOAD1 of KI722; 4, pOAD12 of KI724; L, phage λ -HindIII fragments as molecular weight markers. Subscript a indicates fragments not common for pOAD1, pOAD11 and pOAD12.

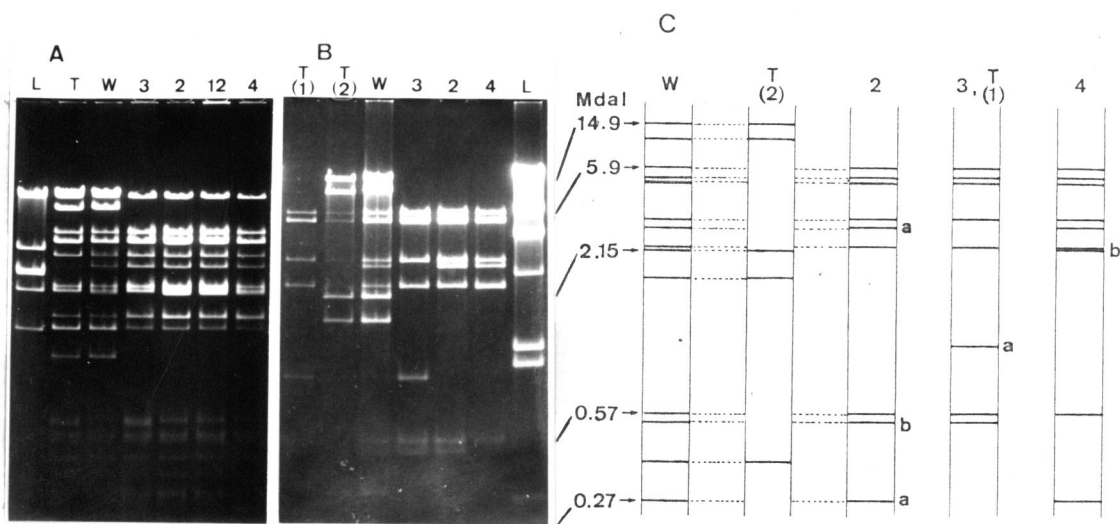


Fig. 2-8. Agarose gel (1 %) electrophoresis of plasmid DNA digested with EcoRI restriction endonuclease. (A) Unfractionated plasmid samples prepared by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation were used. The fragments of the phage λ DNA digested with EcoRI were included as molecular weight standard (L). T, plasmid DNA from KI723T1; W, KI72; 3, KI723; 2, KI722; 12, KI7212; 4, KI724. (B) Plasmid samples purified by agarose gel electrophoresis were analyzed and their digestion patterns were illustrated in (C). T(1), pOAD11 of KI723T1 recovered from the fastest-migrating band of KI723T1 in slot 1 of Fig. 2-6; T(2), pOAD2 of KI723T1 recovered from the medium-sized band of KI723T1; W, the smaller plasmid fraction of KI72 (mixture of pOAD1 and pOAD2); 3, pOAD11 of KI723; 2, pOAD1 of KI722; 4, pOAD12 of KI724; L, phage λ -HindIII fragments as molecular weight markers. Subscript a and b indicate fragments not common for pOAD1, pOAD11 and pOAD12.

Table 2-6. Molecular weights of plasmid DNA fragments produced by HindIII and EcoRI digestion.

	M. W. of <u>Hind</u> III fragments (Mdal)					M. W. of <u>Eco</u> RI fragments (Mdal)				
	pOAD1	pOAD11	pOAD12	pOAD2	pOAD3	pOAD1	pOAD11	pOAD12	pOAD2	pOAD3
	11.3	11.3	11.3	8.7	9.9	5.9	5.9	5.9	14.9	13.6
	<u>8.6</u>	<u>6.2</u>	<u>10.5</u>	8.1	5.55	5.2	5.2	5.2	9.9	4.28
	5.55	5.55	5.55	6.38	5.0	5.2	5.2	5.2	2.15	3.75
	1.87	1.87	1.87	3.79	3.65	3.1	3.1	3.1	1.75	3.05
				2.19	2.8	<u>2.95</u>	2.39	<u>2.95</u>	0.35	2.22
				0.57	2.5	2.39	<u>1.03</u>	2.39		1.07
					2.33	0.57	0.57	<u>2.39</u>		0.95
					2.25	<u>0.51</u>	<u>0.51</u>	0.57		0.91
					1.21	<u>0.27</u>		<u>0.27</u>		0.78
					0.83					0.68
					0.76					0.56
										0.56
										0.53
										0.45
Sum	27.32	24.92	29.22	29.73	36.78	26.09	23.90	27.97	29.05	33.39
M. W. determined by electron micrography	26.2	23.7	28.0	28.8	37.2	26.2	23.7	28.0	28.8	37.2

Underlining indicates fragments not common for pOAD1, pOAD11 and pOAD12.

KI724) の小さいプラスミド区分, 未分画のプラスミド標品からは, pOAD2由来の断片は全く認められなかったので, 親株の pOAD2は消去処理によって共通して失われるが, 形質転換により回復するものと結論した。

ii) pOAD1とその誘導プラスミド. 親株(KI72)の29Mdalのプラスミドは10本のHindⅢ断片を与える(Fig. 2-7)。この10本の断片は形質転換株の29Mdalのプラスミド(pOAD2)由来の6本のHindⅢ断片と, KI722(消去株)の26Mdalプラスミド(pOAD1)に由来する4本のHindⅢ断片の和として対応関係がつけられる。親株の10本の断片の分子量の総和が55Mdalになる事も矛盾である。従って, 原株の29Mdalに見えたプラスミドはpOAD1(26.2Mdal)とpOAD2(28.8Mdal)の混合物であり, KI722ではこのうちpOAD2だけが除去され, pOAD1の構造は変化しなかったものと解釈できる。一方, KI723の23.8Mdalプラスミド(pOAD11), KI724の28.8Mdalプラスミド(pOAD12)は, いずれもHindⅢで4本のバンドを与えるが, うち3本は共通であるので, pOAD1に由来したものと推定される。すなわち, pOAD1のHindⅢ-8.6Mdal断片上で, 2.2Mdalの欠失を生じたプラスミドがpOAD11, 1.8Mdalの挿入, 又は重複が起きたプラスミドがpOAD12であろう。以上の説明はEcoRIの結果(Fig. 2-8)からも矛盾しない。

iii) pOAD3. 最大のプラスミド(pOAD3)はアガロースゲル電気泳動で純粋に単離できなかったため, 混在するpOAD1又は, pOAD2由来の断片を差し引く事で, pOAD3の断片を同定した。以下述べる様に, 親株, 消去株, 形質転換株のいずれにおいても, pOAD3の構造に変化は見られない。Fig. 2-6の37Mdal区分から回収したDNAをEcoRIで切断した電気泳動図をFig. 2-9に示す。pOAD3由来のバンド(図中, 矢印で示

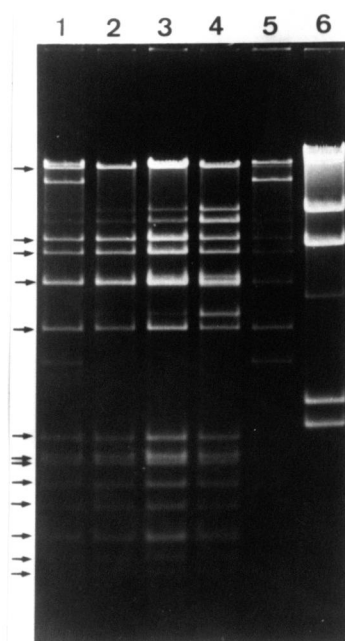


Fig. 2-9. EcoRI restriction pattern of the larger plasmid pOAD3 prepared by agarose gel (0.55 %) electrophoresis. Slot 1, KI723T1; slot 2, KI723 slot 3, KI722; slot 4, KI724 and slot 5, KI72. These preparations were always contaminated with fragments derived from smaller plasmids. The restriction fragments specific for pOAD3 are indicated by arrows. The fragments of phage λ DNA digested with HindIII were included as molecular weight standard (slot 6).

したバンド)は、すべての株で共通し、その分子量合計は 33 Mdal と計算された (Table 2-6)。この値は電子顕微鏡で決定した分子量、37.2 Mdal (Table 2-5) と比較的良く一致する。未分画のプラスミドの Hind III 断片 (Fig. 2-7A) から小さいプラスミド区分の断片を差し引いた残りが pOAD3 由来の断片と考えられるが、すべての株で同一であった。同様の結論は EcoRI 断片からも導ける。

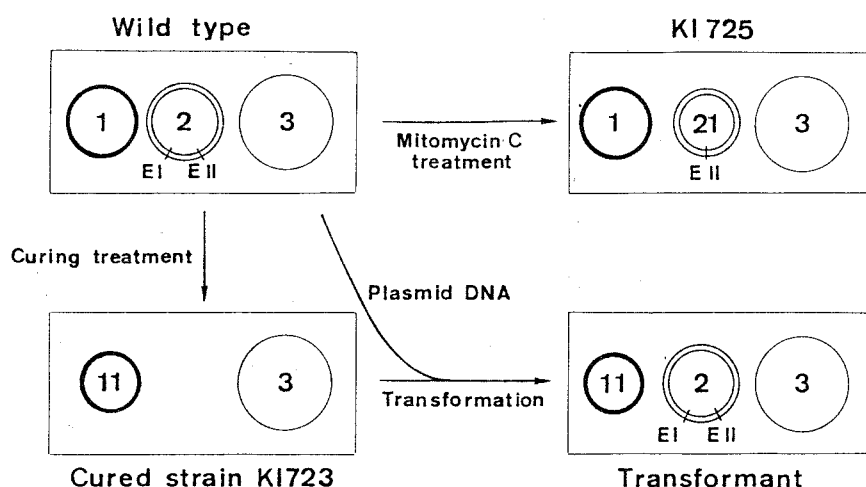


Fig. 2-10. Changes of plasmid structure by curing or transformation.

第4節 考察

pOAD2上にEIとEIIの遺伝子が存在すると結論したが、上記の結果からは構造遺伝子かポジティブ制御遺伝子かは決定できなかった。但し、情況証拠として、i)消去株にはEIは免疫的にも検出されない。ii)消去株から Acd^+ への復帰変異は認められない。iii)両酵素とも構成的に生産される。等の点から、構造遺伝子である可能性が高い。この予測は、実際に、両酵素の遺伝子が大腸菌においてクローン化する事により証明された(第3章参照)。

形質転換の頻度が非常に低い為、 Acd 分解能の回復が、復帰変異や、親株の混入の可能性が懸念される。しかし、これらは、次の根拠から排除できる。i)形質転換の頻度は $11/6 \times 10^9$ であるが、復帰変異は 10^{-10} 以下で検出限界以下である。ii)得られた11個の形質転換株のすべてが受容菌由来の ARx^+ 表現型を示し、親株(ARx^+)とは異なっていた。iii)形質転換株の1株、KI723T1は受容菌由来のpOAD11, pOAD3以外に、親株由来のpOAD2を保持していた。

マイトマイシンCでの消去処理で、 ARx 表現型が異なる3種類の消去株 ARx^+ (KI722, KI7212), ARx^+ (KI723), ARx^- (KI724)を得た。 $Acd^-ARx^-ARx^+$ の形質を示す株が、最も高頻度で得られる。この群に属する2株(KI722, KI7212)では、pOAD2だけが脱落し、pOAD1とpOAD3は、保持されているが、 ARx 表現型の異った株では、pOAD1の構造の一部が欠失したり(KI723)、挿入や重複が起こる(KI724)。しかも、これらの変化はいずれもHindIII-8.6Mdal断片上で発生しており、この断片上に、組換えの“ホットスポット”の存在が予想される。

Acid 分解能力が接合伝達によって、消去株や、種々の *Pseudomonas* 株へ移行するかを試験したが、現在まで成功していない。EI と EII が同一プラスミド上に乗っている事は注目する。EI と EII が pOAD2 上で発生したか、他の微生物で発生した EI と EII の遺伝子が pOAD2 に繰り込まれて、KI72 株に伝播されたかは不明であるが、いずれにしても、新酵素の発生、又は伝播とプラスミドは深い関係があると思われる。

第5節 要約

1. *Flavobacterium* sp. KI72株のε-アミノカプロン酸環状二量体 (Acd) 資化性, 直鎖状二量体 (Ald) 資化性は, マイトマイシンC等の処理により同時に高頻度で除去された。しかしε-アミノカプロン酸 (Ara) 資化性は, 例外的に, 欠損株と向上株が得られた。消去株から Acd⁺ への復帰変異は 10^{-10} 以下で検出されなかった。
2. 消去株では, 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI), 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) 活性が親株の $\frac{1}{200}$ 以下 (検出限界) に低下した。さらに EI は, 免疫的にも検出されなかった。
3. 消去株 (KI723) を CaCl_2 で処理して受容菌を作り, 親株のプラスミドを用いて形質転換を行ったところ, Acd 資化性を回復した形質転換株が 6×10^9 の細胞あたり, 11個得られた。さらに Ouchterlony 試験の結果, 形質転換株の菌体抽出液の作る沈降線は, 原株抽出液の作る沈降線と融合した。
4. 電子顕微鏡観察から親株には, 29 Mdal, 37 Mdal の少なくとも2種類のプラスミドが認められる。親株, 消去株とも 37 Mdal プラスミドは不変であるが, 消去株では 29 Mdal の方が縮小する。又, 形質転換株では, 受容株由来のプラスミド (24 Mdal, 37 Mdal) の他に, 親株由来の 29 Mdal プラスミドを保持していた。
5. 制限酵素による解析から, 親株は3種類のプラスミド, pOAD1 (26.2 Mdal), pOAD2 (28.8 Mdal), pOAD3 (37.2 Mdal) を保有する事が判明した。消去処理によって, pOAD2 は共通して失われるが, pOAD1 は保持される場合 (KI722, KI7212)。

欠失プラスミド (pOAD11) を生ずる場合 (KI723), 挿入又は重複が起こる場合 (pOAD12) が認められた。形質転換株では受容菌由来のプラスミド (pOAD11, pOAD3) 以外に、親株由来の pOAD2 が認められたので、EI, EII 両酵素は、いずれも pOAD2 に支配される事を結論した。

第3章 ナイロンオリゴマー分解プラスミド pOAD2 の 構造と機能

第1節 緒言

非天然基質に対する微生物の適応現象，すなわち，新酵素の発生過程の遺伝子レベルでの解明は，単に，基礎生物科学的な興味だけでなく，将来，広範囲の情報が蓄積すれば，微生物に新しい能力を付与したり，ある能力を体系的に増強させる為の手法も論理的に構成できる筈である。この様な遺伝子レベルの変化を調べる上で，プラスミドは，i) 均一な DNA が得られる事，ii) 染色体 DNA に比べ，はるかに小さいので，構造解析が容易である事，等の理由から，良いモデルシステムとなりうる。

ナイロンオリゴマーの分解に関与する2種類の酵素，6-amino-hexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI)，6-amino-hexanoic acid oligomer hydrolase (EII) の遺伝子は，実際，プラスミド上で発生したのか。又，そうとすれば，どの様な経路で進化したのだろうか。この様な問題を実験室的に検討する為に本研究では，以下の手順をとった。

i) 両遺伝子を大腸菌においてクローニングする。これによって，配位される遺伝子が構造遺伝子か，制御遺伝子かが確定でき，又，プラスミド上での遺伝子座も正確に把握できる。さらに以下の実験は，いずれも単離した遺伝子が必要で，その第1段階として，クローニングは必須である。

ii) 両遺伝子の発現機構を調べる。

iii) EI, EII 酵素が進化によって新しく創生されたとすれば，これらに類似した配列が同じプラスミド上の他の部位に

保存されている可能性がある。そこで、この様な繰り返し配列を Southern blotting 法⁵⁾により検出する。実際、EII領域を含むDNA断片が pOAD2上の3~4箇所にはハイブリダイズする(第3節 第7項)。但し、用いたプローブがEII構造遺伝子領域よりかなり大きいので、繰り返し配列が構造遺伝子の一部を含むかどうかを結論するには至らなかった。

IV) EI又はEII遺伝子を欠失させたプラスミドを作製し、そこから、 ϵ -アミノカプロン酸環状2量体(Acd)又は、同直鎖状2量体(Ald)の分解能力を回復した復帰株(Acd⁺、或いはAld⁺)を分離する。この復帰変異の機構、ならびに、復帰株で生産される蛋白質の同定ができれば、ナイロンオリゴマー分解活性の発現に必須の遺伝子変化が見れる筈である。本章第3節第6項では、EI遺伝子領域が欠失したプラスミド、pOAD21を保持する株(表現型はAcd⁻Ald⁺)からAcd⁺復帰株を得、さらに復帰株で生産される蛋白質が、本来のEIと、免疫性、電気泳動的挙動で、異なっている事を示した。(この蛋白質をEI*と呼ぶ。)

本章では、以上の様な pOAD2の構造及び機能の解析から、EI、EII 遺伝子の進化論的考察を行った。

第2節 実験材料及び方法

使用菌株、培養 本研究に使用した *Flavobacterium* sp. KI72 株、及びその誘導株、大腸菌を Table 3-1 に整理した。第2章第2節と同様に、KI72, KI723 T1 株には、CDY 培地、消去株 (KI722, KI723, KI725, KI7250), 及び Acd^+ 復帰株 (KI725 R1, KI7250 R1, KI7250 R2) には、LB 培地を使用した。大腸菌の培養には、pH を 7.2 に調製した LB 培地を使用し、必要に応じて、アンピシリン (Ap), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, テトラサイクリン (Tc), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した。

プラスミド アンピシリン耐性 (Ap^r), テトラサイクリン耐性 (Tc^r) を支配する pBR322^{58, 59)} をクローニングのベクター DNA として使用した。lac プロモーター断片の供与源として、pKB252⁶⁰⁾ (pMB9 内へ 207 bp の UV5 プロモーター断片と入ファージの C1 遺伝子がクローン化され、 Tc^r をマーカーとして持っている) を使用した。pBR322 と pOAD2 の断片から構成された合成プラスミドの代表的なものを Table 3-2 に示した。

電気泳動 EI, EII 酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動及び、ゲル中の活性バンドの検出法は第1章第2節に、プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動は、第2章第2節に、記載されている。

プラスミド DNA の調製 大腸菌プラスミド (pBR322, pKB252, pBR322-pOAD2 断片の合成プラスミド) の調製には、プラスミド保持株を 1 ml の LB 培地 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン又は 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含む) で 37°C で 10^9 cells/ml まで培養した培養液に 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを添加し、引き続いて、16 時間、振盪した。得られた菌体から、アルカリ変性法^{61, 61)}、又は、cleared lysate 法⁶²⁾で粗プラスミド画

Table 3-1. Bacterial strains

Strain	Phenotype or genotype	Harbored plasmid	Derived from	Reference or treatment
<i>Flavobacterium</i> sp.				
KI72	Acd ⁺ , Ald ⁺ , Ahx ⁺	pOAD1, pOAD2, pOAD3	wild	(24, 25, 26)
KI722	Acd ⁻ , Ald ⁻ , Ahx ⁺	pOAD1, pOAD3	KI72	Curing with mitomycin C (1 µg/ml)
KI723	Acd ⁻ , Ald ⁻ , Ahx ⁺⁺	pOAD11, pOAD3	KI72	"
KI723T1	Acd ⁺ , Ald ⁺ , Ahx ⁺⁺	pOAD11, pOAD2, pOAD3	KI723	Transformation with KI72 plasmid
KI725	Acd ⁻ , Ald ⁺ , Ahx ⁺	pOAD1, pOAD21, pOAD3	KI72	Curing with mitomycin C (0.5 µg/ml)
KI7250	Acd ⁻ , Ald ⁺ , Ahx ⁺ Str ^r	pOAD1, pOAD21, pOAD3	KI725	Spontaneous mutation
KI725R1	Acd ⁺ , Ald ⁺ , Ahx ⁺	pOAD1, pOAD21, pOAD3	KI725	Spontaneous reversion
KI7250R1	Acd ⁺ , Ald ⁺ , Ahx ⁺ Str ^r	, pOAD21, pOAD3	KI7250	"
KI7250R2	Acd ⁺ , Ald ⁺ , Ahx ⁺ Str ^r	pOAD1, pOAD21, pOAD3	KI7250	"
<i>Escherichia coli</i>				
C600	r _K ⁻ m _K ⁻ thr-1, leu-6, thi-1 supE44, lacY1, tonA21			
294	endoI ⁻ , B ₁ ⁻ , r _K ⁻ , m _K ⁺			

Table 3-2. Typical hybrid plasmids constructed from pBR322 and pOAD2-fragments

Plasmid	Inserted fragment	Map region on pOAD2 (Mdal)	Derived from
pNDH28	A + F	0 - 8.9	pOAD2 + pBR322
pNDH29 ^a	A	0 - 8.9	"
pNDH6	B	11.1 - 19.0	"
pNDH5 ^a	C	19.0 - 25.0	"
pNDH3	D	25.0 - 28.8	"
pNDH10	E	8.9 - 11.1	"
pNDH292 ^a	A	0 - 8.4	pNDH29
pNDH2912	A1	0 - 3.3	"
pNDH2913	A1 + A2	0 - 3.3 5.4 - 8.4	"
pNDH2921	A2	5.4 - 8.4	pNDH292
pNDH53 ^a	C	19.0 - 25.0	pNDH5
pNDH501		19.0 - 20.3	"
pNDH211	pOAD21-B'		pOAD21 of KI725R1 + pBR322

a) pNDH29 and pNDH292 (or pNDH5 and pNDH53) contain inserted fragments which are connected to vector DNA by opposite direction each other.

分を得。これを CsCl -エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心分離(第2章 第2節)で精製した。合成プラスミド保持株から少量のプラスミドを簡便に調製する場合には、Birnbaimらのアルカリー-SDS法⁶¹⁾を使用した。

制限酵素による DNA の切断 プラスミド DNA の切断は Table 3-3 に示す組成の反応液中で、 37°C で 1~3 時間反応させた。但し、 SmaI は反応温度を 30°C とした。反応停止は、 65°C 、10~20 分間の熱処理で行った。2 種類以上の酵素で同時に切断する場合には、低イオン強度の反応液を持つ酵素で先に処理し、反応停止後、組成を変換し、第2段の酵素処理を行った。

合成プラスミドの構成 pOAD2 はアガロースゲル中、KI723T1 株の中央のバンド (Fig. 3-1 スロット 3) よりほぼ、純粋に得られるので、Vogelstein らの方法⁶²⁾に従って、DNA を回収した。pOAD2 ($1.5\mu\text{g}$) を 1 単位の HindIII で 37°C 、1 時間、処理後 (50 μl 系)、 65°C 、20 分間の熱処理で反応を停止させた。一方 HindIII で直鎖状にした pBR322 ($30\mu\text{g}$) を 150 μl の 25 mM トリス-HCl (pH 8.0) 緩衝液中、alkaline phosphatase (3 単位) により、 65°C 、30 分間、反応させ、5' 末端側のリン酸残基を除去した⁶³⁾。この処理で、ベクター DNA の自己環状化が抑制される。

部分分解した pOAD2 ($1.5\mu\text{g}$) と上記の処理を行った pBR322 ($0.5\mu\text{g}$) を混合後、50 μl の反応液 (組成: 77 mM トリス-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 10 mM ジチオスレイトール, pH 7.5) に 0.2 単位の T_4 リガーゼを添加して、 4°C で 16 時間反応させた。

形質転換 LB 培地で 5×10^8 cells/ml まで培養した大腸菌 $\text{C600 } r_k^- m_k^-$ (300 ml) を集菌し、100 mM MgCl_2 で洗淨後、75 ml の 100 mM CaCl_2 に懸濁し、 0°C 、20 分間、保持した。

Table 3-3. Buffer used for the digestion of plasmid DNA

Enzyme	Composition of the buffer
<u>EcoRI</u>	100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ (pH 7.5)
<u>HindIII</u>	6 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 ug/ml BSA (pH 7.5)
<u>BamI</u>	100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ (pH 7.5)
<u>SalI</u>	8 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 8 mM MgCl ₂ , 100 ug/ml BSA (pH 7.5)
<u>BglII</u>	20 mM Tris-HCl, 7 mM MgCl ₂ , 7 mM βME (pH 7.5)
<u>XhoI</u>	8 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl ₂ , 6 mM βME (pH 7.5)
<u>PvuII</u>	6 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl, 6 mM MgCl ₂ , 6 mM βME, 100 ug/ml BSA (pH 7.5)
<u>KpnI</u>	6 mM Tris-HCl, 6 mM NaCl, 6 mM MgCl ₂ , 6 mM βME (pH 7.5)
<u>PstI</u>	20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 ug/ml BSA (pH 7.5)
<u>SmaI</u>	15 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl ₂ , 15 mM KCl (pH 8.0)

BSA and βME represent bovine serum albumin and β-mercaptoethanol, respectively. We used BamI in stead of BamHI throughout this study.

遠心分離後、15 ml の 100 mM CaCl_2 - 15 % グリセロール に懸濁した細胞を受容菌として使用した。この受容菌 150 μl とリガーゼ処理した DNA 20 μl を混合後、0 °C で 1 時間、保持後、42 °C、3 分間、保温した。さらに、1.5 ml の LB 培地を添加して 37 °C で 2 時間、振盪培養を行ったものを選択培地 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む LB 寒天平板) へまいた。

形質転換株中の酵素活性 $\text{Ap}^r \text{ Tc}^s$ 形質転換株を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 40 ml の LB 培地で培養後、集菌洗浄し、2.5 ml の緩衝液 A (第 1 章 第 2 節) に懸濁した。超音波破砕 (20 kHz, 2 分間処理) 後、20,000 $\times g$, 20 分間、遠心分離し、得られた上澄画分を粗酵素液とした。粗酵素液 0.2 ml と基質 (20 mM の Acd 又は、Ald) 0.2 ml を混合後、30 °C で 16 時間反応させ、反応液 5 μl をペーパークロマトグラムで分析した (第 2 章 第 2 節)。

欠失プラスミドの作製 得られた合成プラスミド (pNDH5, pNDH29 等) から EI 又は EII の発現に不要の領域を除去する為、以下の 3 種の方法で欠失プラスミドを作製した。

i) EcoRI , BamI 等で部分分解した pNDH5 (或いは、pNDH29) を上述の条件で、リガーゼ処理後、 Ap^r を指標として形質転換を行った。

ii) 異なった制限酵素 (例えば EcoRI と HindIII) の切断部位の間を欠失させる為には、両酵素で完全分解した DNA (1 μg) を 25 mM CH_3COONa , 300 mM NaCl , 1 mM ZnCl_2 (pH 4.5), *nucleases* (30 単位) の反応液 50 μl 中で 25 °C、30 分間処理し、平滑末端とした。次に、前述のリガーゼ反応液へ組成を変換し、これに 1 単位の T_4 リガーゼを添加して 20 °C で 40 時間反応させた。

iii) 第 3 節、第 4 項 (D) では、*exonuclease III* 処理による欠

失プラスミドを作製した。⁶⁴⁾ XhoIで直鎖状にしたプラスミド pNDH501 (20 µg/ml) を 300 µl の 6.6 mM トリス-HCl, 6.6 mM MgCl₂, 60 mM NaCl, 6.6 mM β-メルカプトエタノール (pH 7.5) の緩衝液中で 60 単位の exonuclease III を添加し、22.5 °C にて反応させた。反応開始後、10, 20, 30, 40, 50, 60 分の各時間にそれぞれ、50 µl ずつ分取し、各試料を ii) の条件で nuclease S1 処理を行った。これを PvuII で完全分解後、半量をアガロースゲル電気泳動にかけ、欠失の程度を確認した。残り半量は、ii) の条件でリガーゼ処理を行った。

ニクトランスレーションと Southern トランスファー

1.5 µg の DNA (pNDH2912 又は pNDH501) を Rigby らの方法⁶⁵⁾ に従って、ニクトランスレーションでラベルを入れた。反応液の組成は、以下のとおりである。50 mM トリス-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM β-メルカプトエタノール, 15 µM dATP, 15 µM dGTP, 15 µM TTP, 15 µM α-[³²P] dCTP (38 Ci/mmol), 1.5 µg DNA, 14 ng/ml pancreatic DNase I, 7 単位の DNA polymerase I (反応液量: 50 µl 15 °C で 4 時間反応)。アガロースゲルからの DNA のニトロセルロースフィルターへの移行は、Southern の方法⁵⁶⁾ に従った。

第3節 結果

1. 欠失プラスミド pOAD21 保持株の分離

親株の Acd 及び Ald 資化性は、pOAD2 の欠損により同時に消去される。しかし、マイトマイシン C ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 処理で得た 1000 個の Acd⁻株の中の 1 株 (KI725) は、例外的に、Ald 寒天平板 (第2章、第2節) 上では、親株と同程度の生育能を示した。KI725 株から平衡密度勾配遠心法でプラスミド DNA を調製し、0.55 % アガロースゲル上で電気泳動を行った結果を Fig. 3-1 スロット 1 に示す。3 本のバンドの中で最大のプラスミド (37 Mdal) は、親株 (KI72), 形質転換株 (KI723 T1) とともに共通に見られるが、小さいプラスミド区分が変動している。そこで、ゲル中から DNA を回収し、制限酵素による解析を行った。

Fig. 3-2A に示す様に、KI725 株の最小のプラスミド pOAD21 (分子量 23 Mdal) は、Hind III で 5 箇所切断されるが、得られる断片 (8.4 Mdal (A), 7.9 Mdal (B'), 3.8 Mdal (D'), 2.2 Mdal (E), 0.55 Mdal (F)) のすべてが、pOAD2 の断片と共通していた。ところが、pOAD2 の 6.0 Mdal (C) 断片は、pOAD21 には認められなかった事から、pOAD21 が pOAD2 由来の欠失プラスミドである事が判明した。この結果は EcoRI の切断像 (Fig. 3-2B) やデータは示さないが、Bam I の切断とも矛盾しない。又、KI725 株の 26 Mdal, 37 Mdal のプラスミドの EcoRI 断片は、それぞれ親株の pOAD1, pOAD3 の断片と一致した。従って、KI725 株での Acd 分解能の消去は pOAD2 上の 6 Mdal の欠失に起因する。この過程で pOAD1, pOAD3 の構造変化は起こらない (Fig. 2-10)。

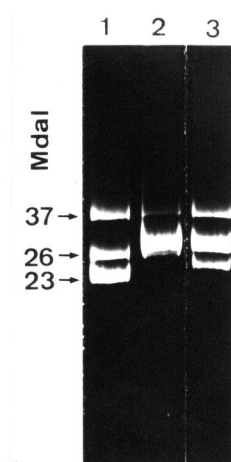


Fig. 3-1. Agarose gel electrophoresis of plasmids harbored in *Flavo-*
bacterium sp, KI725, KI72 and KI723T1. Plasmid DNAs from KI725(slot 1),
KI72(slot 2) and KI723T1(slot 3) were prepared by CsCl-ethidium
bromide density gradient centrifugation and about 1 μ g portions were
analyzed by electrophoresis on a 0.55% agarose slab gel.

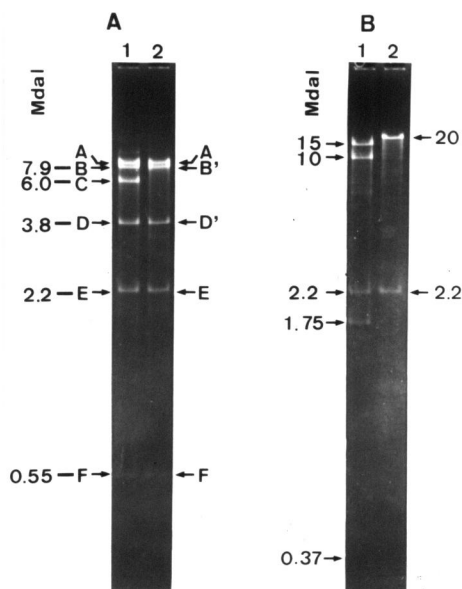


Fig. 3-2. Agarose gel electrophoresis of HindIII(A) and EcoRI(B) fragments of pOAD2 and pOAD21. Plasmid samples were prepared from strains KI723T1 and KI725 by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation followed by electrophoresis on a 0.55% agarose slab gel. DNA bands corresponding to 23 Mdal of KI725(pOAD21) and 29 Mdal of KI723T1 (pOAD2) were recovered from the gel and cleaved by HindIII or by EcoRI and then subjected to electrophoreses on a 1% agarose slab gel. Slot 1;pOAD2, and slot 2;pOAD21.

2. pOAD2 と pOAD21 の制限酵素切断地図

pOAD21 を HindIII で部分分解すると、E+F 断片 (3.0 Mdal) が検出されるので (Fig. 3-3), E+F の隣接関係が確立する。D' 断片が E 又は F のいずれかに隣接していると仮定すると、D'+E (6.0 Mdal), 又は、D'+F (4.35 Mdal) の中間体断片が予想されるが、異なる3種の分解条件 (Fig. 3-3 スロット 2~4) でも、これらの断片は検出されない。D' 断片は A 断片と B' 断片の間に存在する。従って全体の配列順序は、A-D'-B'-F-E 又は、A-D'-B'-E-F のいずれかである。Fig. 3-4 に示す様に、pOAD21 を EcoRI + HindIII で2重切断を行うと、HindIII 断片の中で、B', D', E, F 断片は変化しないが、A 断片が、3個のサブ断片、A₁ (3.3 Mdal), A₂ (3.0 Mdal), A₃ (2.2 Mdal) に分割される。この中で最小の A₃ 断片は、EcoRI 分解だけで得られる事から、A 断片内でのサブ断片の順序は、A₁-A₃-A₂ である。pOAD21 を EcoRI で完全分解後、HindIII で部分分解すると、A₂+F (3.55 Mdal), 及び、A₁+D' (7.0 Mdal) の中間体が検出された (Fig. 3-4 B)。従って、A 断片は D' と F 断片に隣接し、全配列順序 A₂-A₃-A₁-D'-B'-E-F を結論した。

pOAD2 の切断地図は、6.0 Mdal の欠失領域の位置を pOAD21 上で決定すれば作成できる。pOAD21, pOAD2 の EcoRI 部位は、それぞれ、2箇所、5箇所であるから、3箇所の EcoRI 部位は欠失領域、他の2箇所が、A断片内に存在する。pOAD2 の EcoRI-15 Mdal, -10 Mdal 断片 (Fig. 3-2 B, スロット 1) を、ゲルから回収し、HindIII で切断した結果を Fig. 3-5 に示す。EcoRI-15 Mdal 断片からは、B, A₂, E, F 断片以外に、欠失領域に位置する 1.42 Mdal (C₃) 断片が得られた。一方、EcoRI-10 Mdal 断片からは、D, A₁ 断片以外に、欠失領域上の 2.35

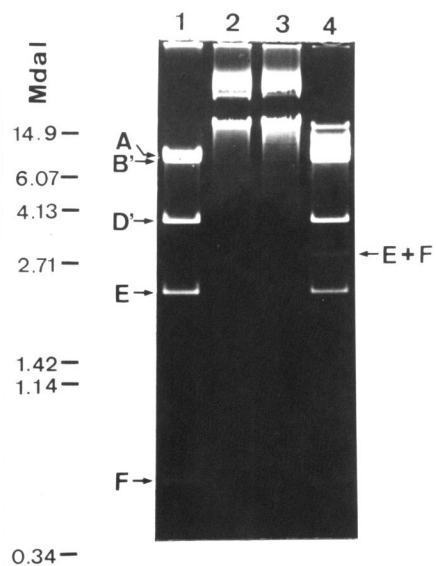


Fig. 3-3. Agarose gel electrophoresis of pOAD21 fragments generated by partial HindIII digestion. pOAD21 (1 μ g) prepared as in Fig. 3-1 was digested with 5 units (slot 1), 0.1 units (slot 2), 0.3 units (slot 3) or 1 unit (slot 4) of HindIII for 1 h and analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose slab gel.

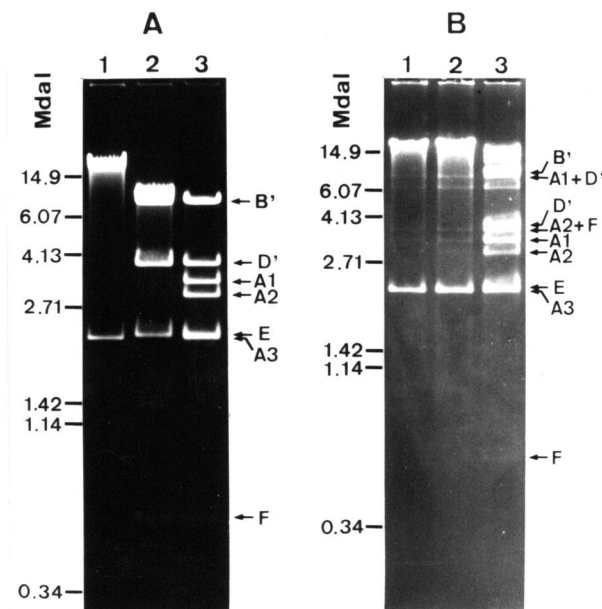


Fig. 3-4. Agarose gel electrophoresis of fragments of pOAD21 generated by complete (A) and partial (B) digestion with *EcoRI*, *HindIII* or their combination. (A): pOAD21 DNA (1 μ g) prepared as described in Fig. 3-1. was completely digested with 5 units each of *EcoRI* (slot 1), *HindIII* (slot 2) and *EcoRI* + *HindIII* (slot 3) for 1 h. (B): pOAD21 DNA (1 μ g) was completely digested with 5 units of *EcoRI* for 1 h then digested with 0.1 units (slot 1), 0.3 units (slot 2) or 1 unit (slot 3) of *HindIII* for 1 h. The resulted fragments were analyzed electrophoretically on a 1 % agarose slab gel.

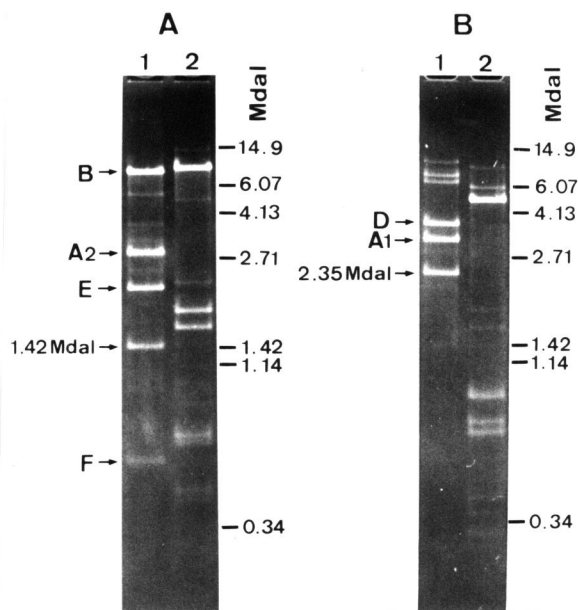


Fig. 3-5. Agarose gel electrophoresis of subfragments generated from 15-Mdal and 10-Mdal *Eco*RI fragments of pOAD2 by *Hind*III and *Bam*I. (A) *Eco*RI-15 Mdal fragment of pOAD2 recovered from the gel shown in Fig. 3-2B was cleaved with *Hind*III (5 units) (slot 1) or with *Bam*I (5 units) (slot 2) for 2 h, followed by electrophoresis on a 1 % agarose slab gel. (B) same as (A) except *Eco*RI-10 Mdal fragment of pOAD2 was examined. Minor bands show contaminants derived from pOAD1 or pOAD3.

Mdal (C₁)断片が得られた。従って、pOAD2のC断片はB, D断片の間に存在し、A-D-C-B-E-Fの位置関係が決定できた。この配置は、EcoRI-15 Mdal, -10 Mdal断片のBamI切断像 (Fig. 3-5), ヤデータは提示しないが pOAD21の2重切断 (BamI + EcoRI, BamI + HindIII)の結果からも確認される。次に、C断片上の3箇所のEcoRI部位を決定した。C断片はEcoRI処理で4個のサブ断片、2.35 Mdal (C₁), 1.75 Mdal (C₂) 1.42 Mdal (C₃), 0.37 Mdal (C₄)を生ずるが、上述した様に、C₁, C₃断片は、それぞれEcoRI-10 Mdal, -15 Mdal断片のHindIII処理で得られる事、C₂, C₄断片は、pOAD2のEcoRI単独分解で得られる事から、C₁-(C₂, C₄)-C₃の位置関係が求まる。又、C断片をEcoRIで部分分解すると、1.88 Mdal (C₃ + C₄), 4.1 Mdal (C₁ + C₂)の中間体が検出できたので、配列 C₁-C₂-C₄-C₃を結論した。pOAD2, pOAD21の制限地図を Fig. 3-6に示す。

3. EI, EII 遺伝子のクローニング

pOAD2をHindIIIで部分分解した断片をHindIIIで切断したpBR322をalkaline phosphatase処理したものに加えた後、T4 DNA リガーゼで連結させ大腸菌 C600 $r_k^- m_k^-$ を形質転換した。約10,000株のAp^r形質転換株が得られたが、この中の80%がテトラサイクリン感受性(Tc^s)であった。この中から独立に得た36株のAp^rTc^s形質転換株について、EI, EIIの生産性と合成プラスミド中に挿入されたDNA断片を調べた。形質転換株の細胞抽出液を粗酵素液として、Accl又は、Alclを基質として16時間反応させ、反応生産物をペーパークロマトグラフで解析した結果を Fig. 3-7に示す。6個のクローン(クローン番号 5, 18, 23, 27, 33, 34)の細胞抽出液では、AcclからAlclを生産し、EI活性の発現が認められた (Fig. 3-7A)。

又、5個のクローン（クローン番号 14, 16, 28, 29, 41）には、 Δx から ΔR_x への転換活性が検出され（Fig. 3-7B）、EII 遺伝子のクローン化が示唆された。但し、EI と EII を同時に生産する株は存在せず、pOAD2 上で両遺伝子座が離れていると推定された。

合成プラスミドを保有する大腸菌から、プラスミド DNA を分離して、Hind III で切断後、アガロースゲル電気泳動で分析すると pBR322 に由来する断片と、pOAD2 由来の断片を与えるので、その合成プラスミドが pOAD2 上のどの部分を組み込んでいるかが決定できる（Fig. 3-8）。EI を生産する5個のクローン（クローン番号 5, 18, 23, 27, 33）は 6.0 Mdal の挿入断片からなる合成プラスミドを保有するが、この挿入断片が pOAD2 の Hind III - C 断片である事は、Eco RI + Hind III の2重分解（Fig. 3-9）で4個のサブ断片、2.35 Mdal (C_1)、1.75 Mdal (C_2)、1.42 Mdal (C_3)、0.35 Mdal (C_4) を生ずる事から明らかである。

一方、EII 酵素を生産する5個のクローンの中で、2個（クローン番号 14, 29）は 8.4 Mdal (A) 断片が、他の2個（クローン番号 28, 41）は A + F 断片が、1個（クローン番号 16）は A + D + F 断片が pBR322 へ挿入した合成プラスミドを保有する事を Hind III（Fig. 3-8）、Hind III + Eco RI（Fig. 3-9）分解から証明した。さらに B 断片（クローン番号 6）、B + E 断片（クローン番号 56）、D 断片（クローン番号 3, 54, 57）、E 断片（クローン番号 9, 10）を組み込んだ合成プラスミドは、EI や EII 活性を発現させなかった。この結果、EI の構造遺伝子は、C 断片上（マップ上 19.0 ~ 25.0 Mdal の間）に、EII の構造遺伝子は A 断片上（マップ上 0 ~ 8.4 Mdal の間）に存在すると結論できる。

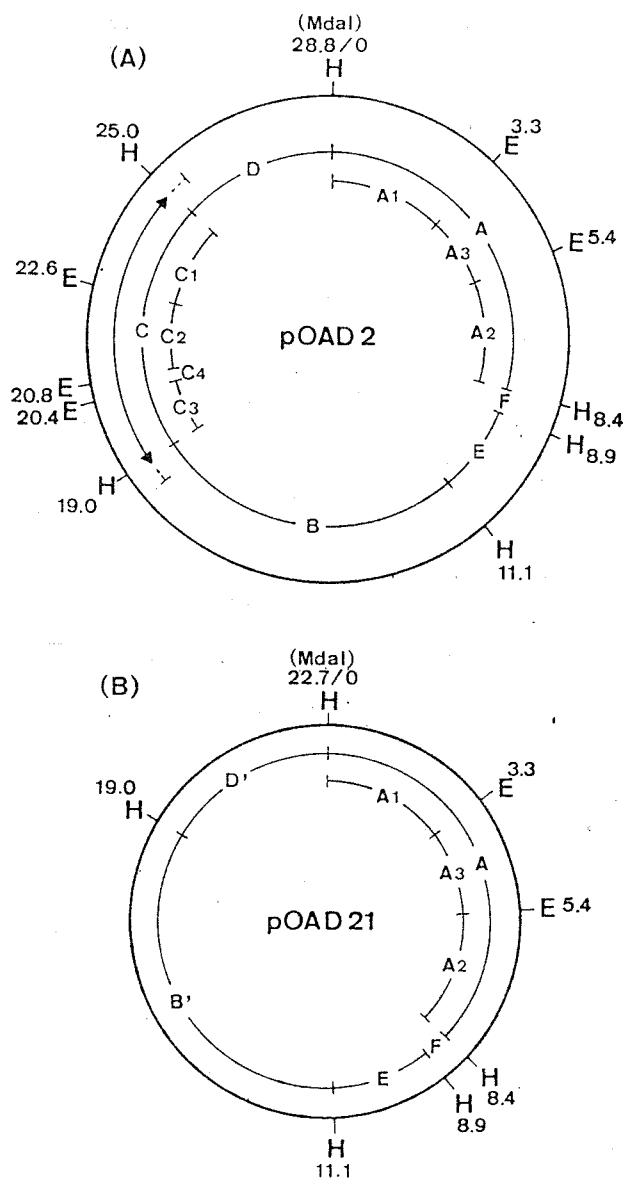


Fig. 3-6. Restriction maps of pOAD2 (A) and pOAD21 (B). E and H indicate EcoRI and HindIII sites, respectively. The DNA region deleted in pOAD21 is shown by an arrow.

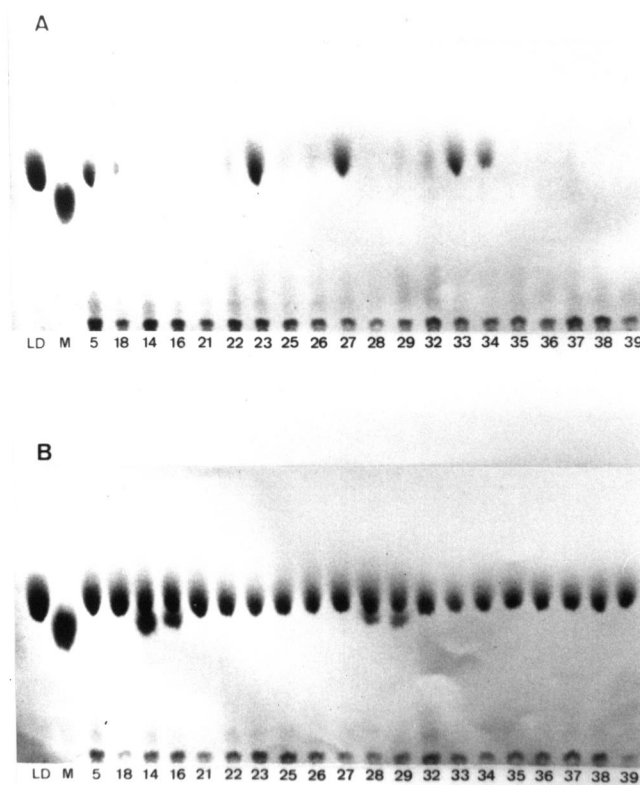


Fig. 3-7. Paper chromatography of degradation products from Acd (A) and Ald (B) by cell extract of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring the hybrid plasmid. Cell extract was incubated with Acd or Ald for 16 h and 5 μ l portions were spotted on filter paper (Toyo No. 50) and developed. LD, M and numbers under the paper chromatograms indicate authentic Ald, Ahx and reaction product of the cell extract of the numbered clone. Cell extracts of recipient strain could not produce Ald from Acd, Ahx from Ald, respectively.

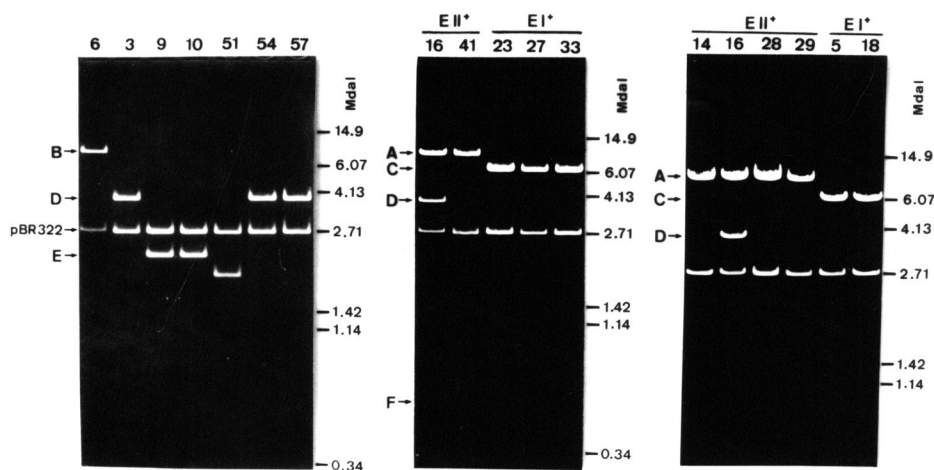


Fig. 3-8. Analysis of DNAs constituting the hybrid plasmids by agarose gel electrophoresis after HindIII digestion. Plasmid DNAs(each 1 μ g) prepared from independently selected $\text{Ap}^{\text{r}}\text{Tc}^{\text{s}}$ transformants were digested with 5 units of HindIII for 1 h and analyzed by electrophoresis on a 1% agarose slab gel. Numbers on slots show the clone number, EI^{+} and EII^{+} show the clones that produced EI and EII enzyme, respectively.

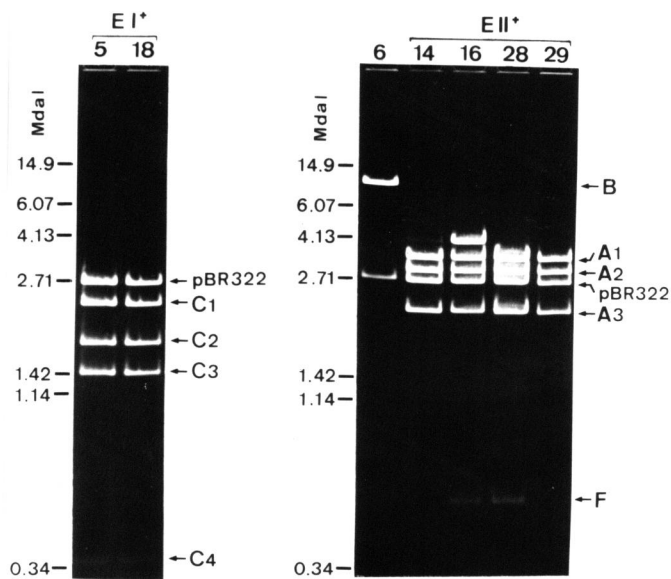


Fig. 3-9. Agarose gel electrophoresis of subfragments of the hybrid plasmids generated by double digestion with HindIII + EcoRI. Numbers above the slots show the clone numbers. EI^+ and EII^+ indicate the clones below that produced EI or EII enzyme, respectively.

4. EI 遺伝子の発現機構

A) pNDH5 の制限酵素切断地図

EI の遺伝子座を正確に決定する為、クローン番号 5 に保持され、EI 活性を発現できる合成プラスミドを pNDH5 と命名して、その制限地図を作成した。pNDH5 を EcoRI, HindIII, BamI, SalI 又は、その2重切断によって得られる断片を、Table 3-4 に示す。さらに、HindIII + EcoRI の2重切断によって得られた pNDH5 の断片 (C₁ (2.35 Mdal), C₂ (1.75 Mdal), C₃ (1.42 Mdal), C₄ (0.37 Mdal)) をゲルから回収後、BamI、又は、SalI で切断し、各サブ断片内の切断部位を調べた (Table 3-5)。以上の結果から決定した pNDH5 上の EcoRI, HindIII, BamI, SalI の切断部位を Fig. 3-10 に示す。

B) 欠失プラスミドの作製

pNDH5 は pOAD2 の HindIII - C 断片 (6.0 Mdal) を組み込んでおり、この大きさは、EI の構造遺伝子の推定分子量 0.95 Mdal より、はるかに大きい。余剰部分を省略する為、pNDH5 から欠損プラスミドを作製した。pNDH5 を適当な制限酵素 (C 断片上に2箇所以上の切断点を持つもの) で完全又は、部分分解し、再結合させると欠損部位を持つ pNDH5 プラスミドが得られる。SalI の完全分解で pNDH501, BamI の部分分解で、4 種類 (pNDH511, pNDH512, pNDH513, pNDH514), EcoRI 部分分解で2種類 (pNDH521, pNDH522) のプラスミドを取得した。制限酵素解析 (Fig. 3-11) により決定した欠失領域と、EI 活性の発現の関係をまとめると、Fig. 3-12 の様になる。ここでは、欠失領域を破線で示した。pNDH501 と pNDH511 では、EI 活性が発現したが他では発現しなかった事から、EI 遺伝子の位置は、pOAD2 の C 断片上で B 断片に隣接した 1.25 Mdal 上 (HindIII - SalI 断片) にある事になる。この大きさは、そ

Table 3-4. Restriction endonuclease fragments generated from pNDH5

Enzyme	Size of fragment (Mdal)	Sum of fragments (Mdal)
<u>Eco</u> RI	5.05, 1.75, 1.42, 0.36	8.58
<u>Hind</u> III	5.9, 2.7,	8.6
<u>Bam</u> I	3.05, 1.58, 1.55, 1.42, 0.69, 0.24	8.53
<u>Sal</u> I	3.85, 2.55, 0.57, 0.57, 0.485, 0.425	8.45
<u>Eco</u> RI+ <u>Hind</u> III	2.7, 2.35, 1.75, 1.42, 0.36	8.58
<u>Eco</u> RI+ <u>Bam</u> I	2.55, 1.42, 1.22, 0.67, 0.66, 0.48, 0.42, 0.36, 0.28, 0.24	8.3
<u>Eco</u> RI+ <u>Sal</u> I	2.4, 1.57, 1.3, 0.79, 0.57, 0.49, 0.43, 0.36	7.91
<u>Hind</u> III+ <u>Bam</u> I	2.55, 1.58, 1.53, 1.43, 0.48, 0.45, 0.24, 0.22	8.48
<u>Hind</u> III+ <u>Sal</u> I	2.5, 2.3, 1.27, 0.58, 0.58, 0.48, 0.35	8.06
<u>Bam</u> I+ <u>Sal</u> I	2.85, 1.55, 0.58, 0.57, 0.56, 0.55, 0.33, 0.30, 0.24, 0.2	7.73

Table 3-5. Sub-subfragments generated from C-subfragments
(C1 - C4) with restriction endonuclease,
BamI or SalI.

C-subfragment	Size of fragment (Mdal)	
	(by <u>Bam</u> I digestion)	(by <u>Sal</u> I digestion)
C1 (2.35 Mdal)	1.42, 0.48, 0.28,	0.80, 0.57, 0.49
C2 (1.75 Mdal)	1.22, 0.42	1.57
C3 (1.42 Mdal)	0.66, 0.48, 0.24	1.29
C4 (0.37 Mdal)	0.37	0.37

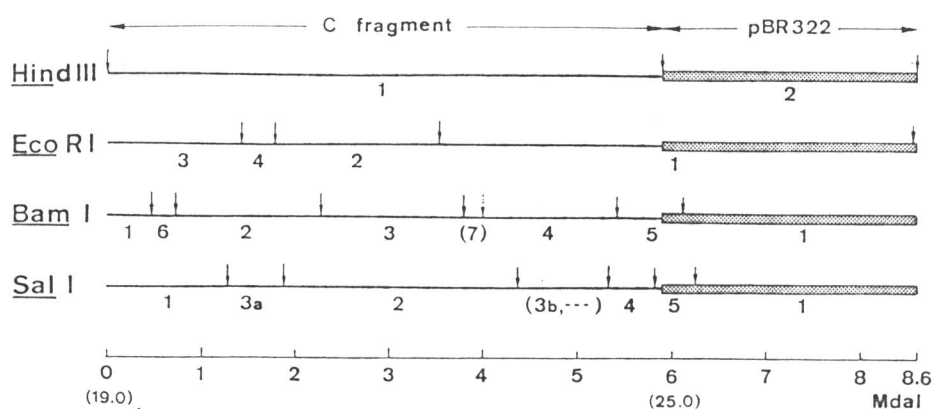


Fig. 3-10. Restriction map of pNDH5. Fragments obtained by digestion of each enzyme were named in order of decreasing molecular size.

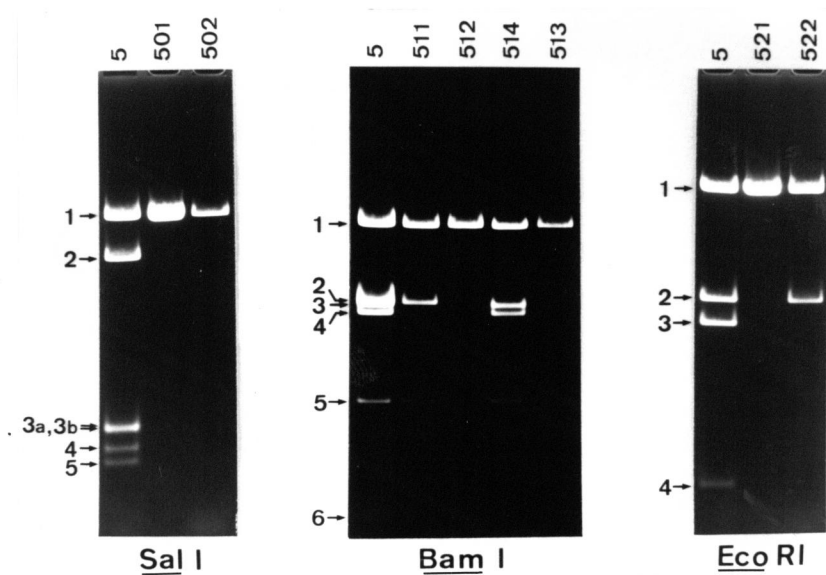


Fig. 3-11. Restriction endonuclease analyses of miniplasmids derived from pNDH5. Plasmid DNAs were digested with SalI, BamI and EcoRI and subjected to electrophoresis on 1 % agarose gel plates. 5, pNDH5; 501, pNDH501; 502, pNDH502; 511, pNDH511; 512, pNDH512; 513, pNDH513; 514, pNDH514; 521, pNDH521; 522, pNDH522.

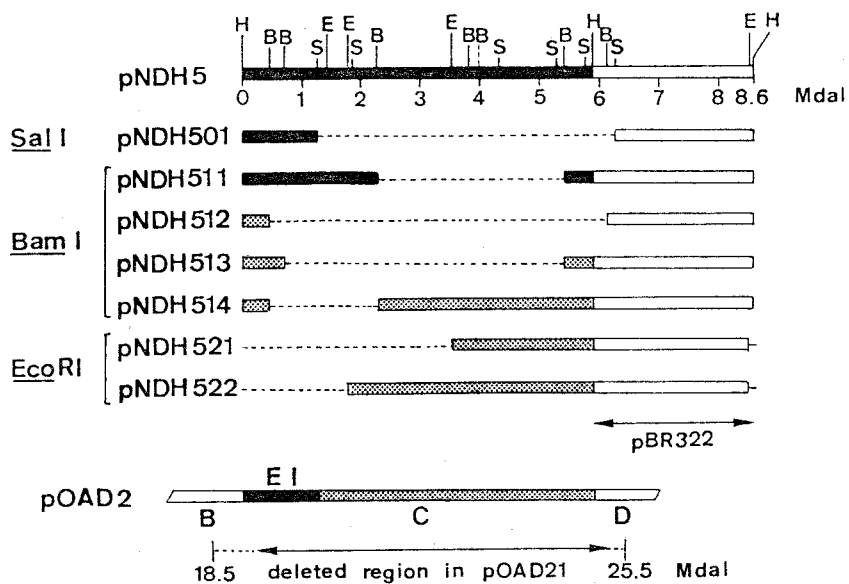


Fig. 3-12. Restriction maps of pNDH5 and miniplasmids derived from it. Restriction endonucleases used to derive the miniplasmids are shown in the left column. The restriction maps are shown in linear form by opening the circular at the HindIII site in Tc^r gene. E, H, B and S indicate restriction sites for EcoRI, HindIII, BamI and SalI respectively. Open bar designates pBR322 DNA, and fraction of DNA derived from HindIII-C fragment of pOAD2 are shown as solid bar (in EI positive miniplasmids) or by shaded bar (in EI negative miniplasmids). Broken lines indicate deleted regions.

の構造遺伝子の推定分子量 0.95 Mdal に較べて、それほど大きいものではない。

c) 大腸菌で生産される EI 蛋白質

pNDH5、又は pNDH501 のプラスミドに支配されて大腸菌内で生産される EI 酵素は、原株 *Flavobacterium* sp. KI72 が生産する EI 酵素と免疫的に同一である。すなわち、Fig. 3-13 に示す様に、Ouchterlony 試験で pNDH5 (穴 3) 又は pNDH501 (穴 2) を保有する大腸菌の細胞抽出液で抗 EI 血清と作る沈降線は、KI72 株抽出液 (穴 1, 4) の作る沈降線と融合する。この場合、受容株 (穴 6) や pNDH29 保持株 (EI 生産性、EI 非生産性) (穴 5) では沈降線は認められない。

以上の結果は、大腸菌で生産される EI が DEAE-Sephadex A50 カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で KI72 株と同じ挙動をとる事からも支持される。pNDH501 保持株の細胞抽出液を DEAE-Sephadex カラムに負荷した溶出像を Fig. 3-14 に示す。KI72 株と同様、EI 活性は、食塩濃度 0.25 M で溶出されたので、活性区分 (分画番号 37~47) を濃縮後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (pH 8.0) で分析した。ゲル (長さ 6.5 cm) を 2 mm ずつ切断し、これに Ald を基質として添加して、30 °C で 16 時間、反応させ、ペーパークロマトグラフにより解析すると、相対移動度 0.40 付近に、Ald への転換活性が認められた (Fig. 3-15)。これは、精製 EI の移動度とも一致する。

従って、pNDH501 は EI 遺伝子の開始点、終了点を含む完全な遺伝子がクローニングされていると結論できる。大腸菌抽出液中の EI 活性は、TNBS 法では、反応の内在水準が高い為、定量できなかったが、KI72 株より 50 倍濃い大腸菌 (pNDH501 保持株) の抽出液を用いた場合に、Ouchterlony 寒

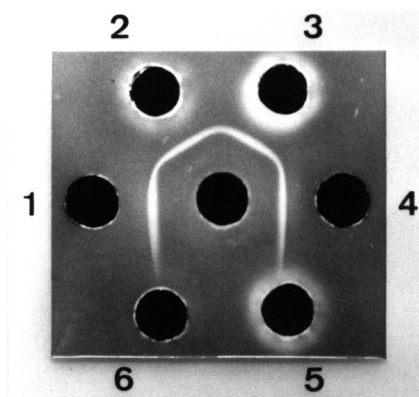


Fig. 3-13. Double diffusion test between anti-EI(*Flavobacterium* sp. KI72) and cell extracts of *E. coli* C600 $r_k^-m_k^-$ with or without harboring of the hybrid plasmid or cell extract of *Flavobacterium* sp. KI72. Contents of wells were: center well; anti-EI serum, wells 1 and 4; cell extracts from KI72(0.052 mg protein per well), well 2; C600 $r_k^-m_k^-$ harboring pNDH501 (3.6 mg protein per well), well 3; C600 $r_k^-m_k^-$ harboring pNDH5(2.9 mg protein per well), well 5; C600 $r_k^-m_k^-$ harboring pNDH29(a hybrid plasmid consisting of pBR322 and HindIII-A fragment DNAs, EI^-EI^+)(3.5 mg protein per well), and well 6; C600 $r_k^-m_k^-$ (3.5 mg protein per well).

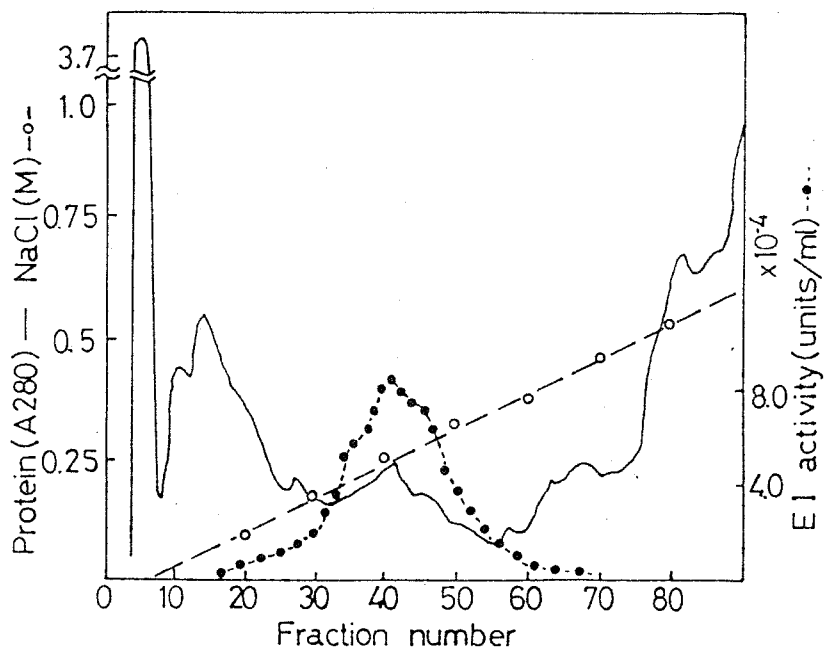


Fig. 3-14. DEAE-Sephadex column chromatography of cell extracts of *Escherichia coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring pNDH501. The cell extracts (5.8 mg protein/ml, 25ml) were applied to DEAE-Sephadex A50 column ($\phi 2.2 \times 30$ cm) equilibrated with 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10 % glycerol (bufferA). After washing with 25 ml of the buffer, 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase activity was eluted with buffer A containing a linear gradient of NaCl from 0 - 0.8 M in a total volume of 800 ml at a flow rate of 50 ml/h.

Origin of the enzyme	Total fraction (a)	EI ⁺ fraction (b)	Mobility (b/a)
C600(pNDH501)	31	12,13	0.40
KI72	33	12,13	0.38
C600 + KI72	29	11,12,13	0.41

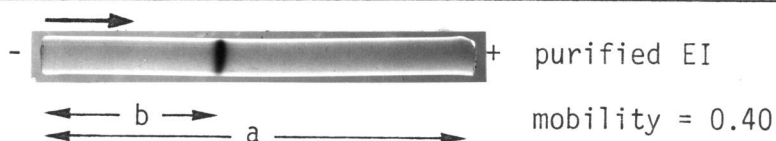


Fig. 3-15. Polyacrylamide gel electrophoresis of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase produced by *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$. DEAE-Sephadex eluate (50 μ l, protein concentration of 9.08 mg/ml) was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (pH 8.0). The gel was sliced into 2 mm length to give total fraction of about 30, and each slice was kept at 30 °C for 16 h in a test tube containing 70 μ l of 20 mM 6-aminohexanoic acid cyclic dimer solution. Hydrolyzing activity was shown by a spot of 6-aminohexanoic acid linear dimer after paper chromatography.

天平板上で同程度の沈降線を形成したので、大腸菌内での発現量は、親株の2%程度と推察される (Fig. 3-13)。

D) EI プロモーターの同定

EI-mRNAの合成が、クローン化されたDNA内部から開始しているのか、pBR322上のプロモーターからの連続転写かを検討する為、pNDH5をHindⅢで完全分解後、リガーゼ処理し、HindⅢ-C断片がベクターDNAと逆方向に連結したプラスミドを作製しEIの生産性を比較した。pNDH53の挿入の方向性がpNDH5と逆になっている事はEcoRI単独分解でわかる。すなわち、HindⅢ-C断片中央に位置するC₂ (1.75 Mdal), C₄ (0.37 Mdal)断片は、両プラスミドで共通に認められるが、端に位置するC₁ (2.35 Mdal), C₃ (1.42 Mdal)断片は、pBR322と連結したものが得られる (Fig. 3-16)。この様にして得られた両方向性のプラスミド (pNDH5, pNDH53)とも免疫的に同一の蛋白質を同量生産するので (Fig. 3-16), 発現開始部位は、挿入断片内に存在すると推察される。

pNDH501の挿入断片 (1.25 Mdal)の中に、RNA合成開始部位があれば、Tc^rプロモーター領域⁶⁶⁾を欠失させても発現に影響しない筈である。そこでpNDH501をEcoRI+HindⅢで完全分解後、nuclease S1で付着末端の一本鎖部分を消化し、T₄-DNAリガーゼで連結した。得られたプラスミドがTc^rプロモーター領域 (HindⅢ-EcoRI断片)を欠失しているかどうかは、EcoRIとHindⅢで同時に切断されない事から確認できる。得られたプラスミドpNDH501ΔEHはEI活性及び免疫性で、pNDH501と差が認められない (Fig. 3-17)。さらに、pNDH501のPvuⅡ-SalⅠ断片、XhoⅠ-SalⅠ断片、HindⅢ-KpnⅠ断片を欠失したプラスミド (ΔPS, ΔXS, ΔHK)でもpNDH501と同程度に発現する事から、これらの領域は発現に不要である。BamⅠ-

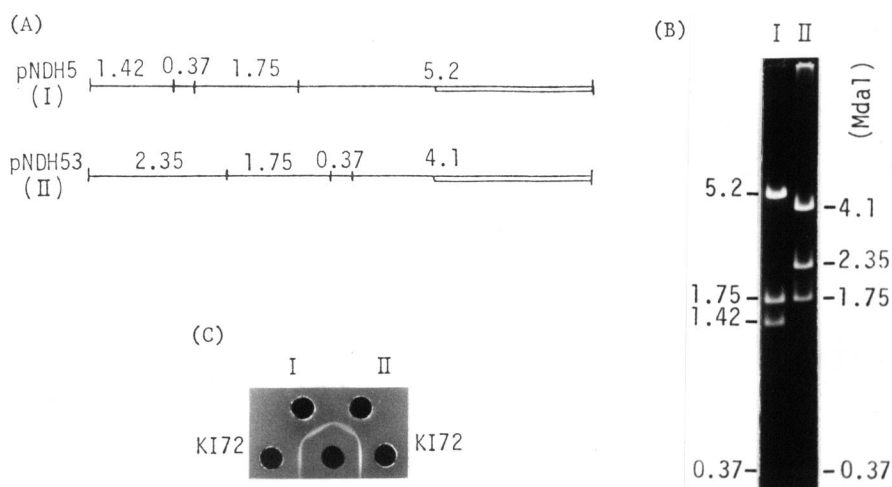


Fig. 3-16. Relationship between the orientation of the inserted fragment and the 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI) production. The orientation of the HindIII-C fragment inserted into pBR322 was determined by EcoRI digestion of hybrid plasmids as shown in (A) and (B). Since pNDH5 and pNDH53 contained pOAD2-HindIII-C fragment which was connected to vector DNA by opposite direction each other, EI production in *E. coli* harboring these plasmids were tested by double diffusion test (C). Central well, anti-EI serum; KI72, cell extracts of *Flavobacterium* sp. KI72 (0.052 mg protein per well); I, cell extract of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring pNDH5 (2.9 mg protein per well); II, cell extract of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring pNDH53 (3.6 mg protein per well).

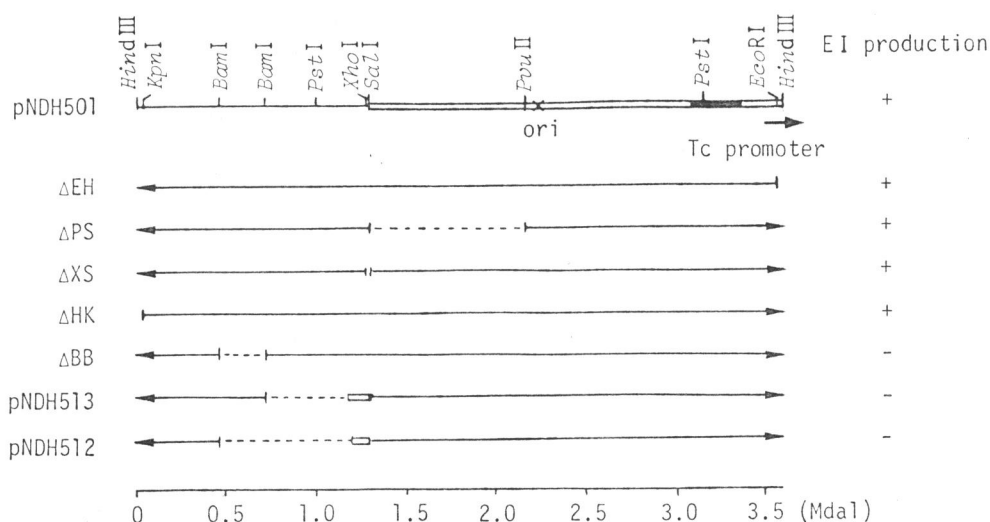


Fig. 3-17. Deletion plasmids derived from pNDH501. Deleted regions were indicated by broken line. ΔEH, ΔPS, ΔXS, ΔHK and ΔBB indicates deletion plasmids obtained from pNDH501 by EcoRI + HindIII, PvuII + SalI, XhoI + SalI, HindIII + KpnI and BamI digestions, respectively. EI production was tested by the enzyme activity and double diffusion test using anti-EI serum.

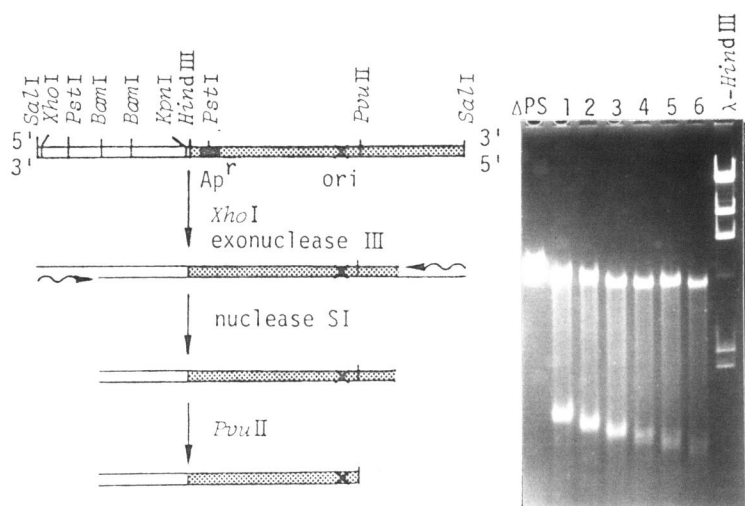


Fig. 3-18. Construction of deletion plasmids derived from pNDH501.

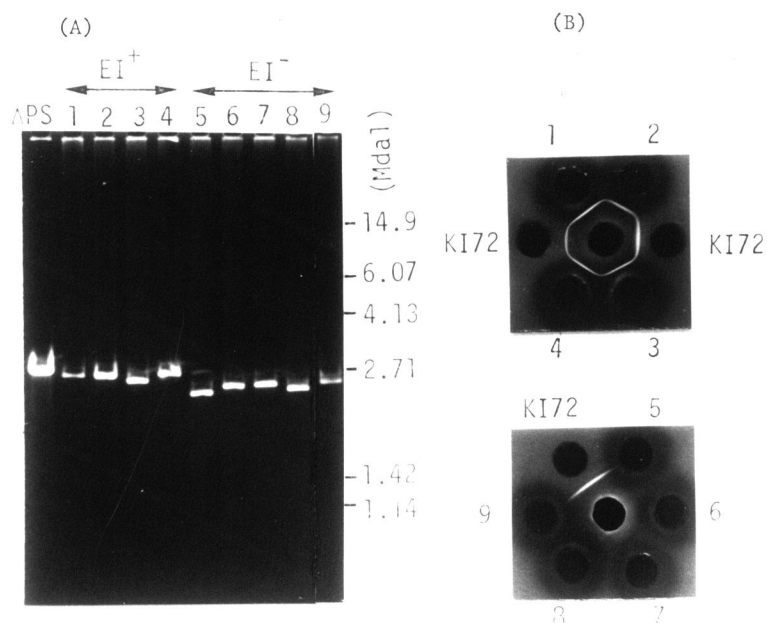


Fig. 3-19. Size of the deletion plasmids and EI production. (A) Agarose (1 %) gel electrophoresis of deletion plasmids digested with EcoRI. ΔPS represents deletion plasmid which lacked PvuII - SalI fragment of pNDH501. Slot 1 - 4, plasmids prepared from *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ which did not produce EI. (B) Double diffusion test between cell extracts of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring the hybrid plasmids and anti-EI serum. Central well, anti-EI serum; well 1 - 9, cell extracts of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring the plasmids shown in (A), respectively. (ca. 3 mg protein per well); KI72, cell extracts of *Flavobacterium* sp. KI72 (0.19 mg protein per well).

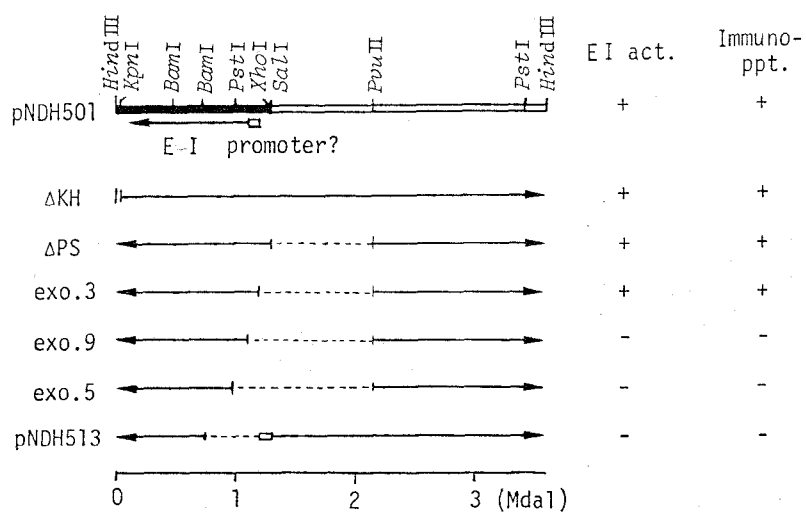


Fig. 3- 20. Relationship between the deleted region in pNDH501 and EI production. Deleted regions were shown by broken lines. exo.3, exo.5 and exo.9 are the plasmids which were obtained by exonuclease treatments of pNDH501 and are same with the plasmids of slot 3, 5 and 9 of Fig. 3-19 (A)

0.24 Mdal 断片の欠失 ($\Delta 88$) で活性が消失するのは、構造遺伝子内での欠損による。

EI 遺伝子の発現の方向性と、EI プロモーターの位置を検討する目的で Fig. 3-18 の方法で欠失プラスミドを作製した。XhoI で直鎖状にした pNDH501 を exonuclease III で 3' $\rightarrow$ 5' 方向に分解後、nuclease S1 で一本鎖部分を消化し、平滑末端とした。ベクター DNA 側の末端を一定にする為、PvuII で切断後リガーゼ処理し、Ap^r 形質転換株を得た。形質転換株中のプラスミドは、exonuclease III の分解条件に依存した種々の大きさの欠失がある。又、リガーゼ処理の前に、欠失の程度を確認する為、PvuII 処理後の DNA 試料をアガロースゲル電気泳動で分析した結果も Fig. 3-18 に示した。EI 活性保持株 (1~4)、欠損株 (5~9) からプラスミド DNA を調製し、EcoRI 処理後、アガロースゲル電気泳動で分子量を調べた (Fig. 3-19A)。これと同時に、各株の細胞抽出液を用いて Ouchterlony 法による免疫試験を行った (Fig. 3-19B)。exo.3 は pBR322 内の PvuII - SalI 断片と、挿入断片内で 0.1 Mdal を欠失しているが、活性、免疫性とも、pNDH501 との間で差が認められない。挿入断片内で、0.2 Mdal を欠失した exo.9、0.25 Mdal を欠失した exo.6、exo.7 の各クローンでは EI 生産性が全く認められなかった。従って Fig. 3-20 に示す様に、EI プロモーターがマップ上 1.1 Mdal 付近に存在し、左向きに発現していると考えるのが妥当である。

5. EI 遺伝子の発現機構

A) 欠失プラスミドの作製

クローン番号 29 (Fig. 3-7, Fig. 3-8) に保持され EI 活性を発現できるプラスミドを pNDH29 と命名した。pNDH29 保持株で生産される EI は Ouchterlony 寒天平板上で KI72 株の精製 EI

と融合し、免疫的に同一の蛋白質であった (Fig. 3-21)。又、挿入された *Hind* III-A 断片が相互に逆方向に連結している *pNDH* 29 と *pNDH* 292 の何れにおいても、EII 酵素が生産された。従って構造遺伝子、プロモーターを含む発現に必須の領域は、A 断片上にあると結論できる。発現必須領域の解析の為に、種々の欠失プラスミドを作製した。*pNDH* 29 を *Eco* RI 又は *Bgl* II で部分分解後、リガーゼ処理し、大腸菌 C600 *r_k⁻m_k⁻* を形質転換した。この様にして得られたプラスミドの欠失部分と、EII 活性の有無の相関関係をまとめると Fig. 3-22 の様になる。*pNDH* 2913 において、A₃ 断片 (3.3 ~ 5.4 Mdal) が欠失しても EII 活性が保持される事から、A₃ 断片は発現に不要である。一方、A₃ 断片と A₂ 断片 (5.4 ~ 8.4 Mdal) を欠失した *pNDH* 2912 では活性が検出されないので、A₂ 断片の必要性がわかる。さらに、*pNDH* 292 の *Eco* RI 完全分解により、A₁ (0 ~ 3.3 Mdal)、A₃ の両断片を欠失したミニプラスミド *pNDH* 2921 は EII 生産性を与えないので、発現には A₁ 断片が必須である。この結果は、*pNDH* 2903 で 1.4 Mdal の *Bgl* II 断片 (2.3 ~ 3.7 Mdal) の欠失により EII 活性が消失する事からも支持される。以上の結果から、EII 遺伝子の発現には、約 2 Mdal 離れた 2 つの領域 A₁ と A₂ が必要であると結論できる。

B) *lac* UV5 プロモーター支配下での EII 遺伝子の発現
 離れた 2 つの領域が EII 活性の発現に必要な機構として、
 i) 1 つの領域にプロモーター部位が、他方に構造遺伝子が存在する。 ii) 一方の領域で生産されるポジティブ制御遺伝子が構造遺伝子の発現を制御する。 iii) EII 酵素は同一の分子量 (42000) のヘテロサブユニットから構成され、それぞれの領域に支配される。等が挙げられる。いずれの場合でも、中央領域 (A₃ 断片) が不要である事から、リボゾーム結合部位等

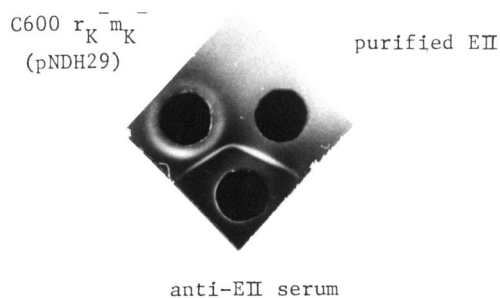


Fig. 3-21. Double diffusion test between cell extracts of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring pNDH29 (4.41 mg protein per well) and anti-serum against 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) obtained from *Flavobacterium* sp. KI72. Protein amount of purified EII in well were 2.4 μ g.

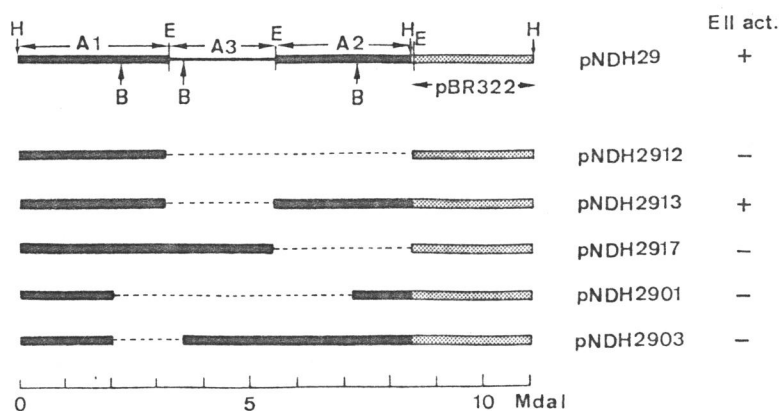


Fig. 3-22. Plasmids derived by deletion from pNDH29. Deleted regions were shown by broken lines. H, B and E represent HindIII, BglII and EcoRI, respectively.

の翻訳に必須の領域は、各断片内に保存されていると期待される。本研究では、特に i) の可能性を検討する為、A₁断片のみを含む pNDH2912 と A₂断片のみを含む pNDH2921 を用いてその EcoRI 部位に Fig. 3-23 の手順で lac UV5 プロモーターを挿入し、EII 活性の回復を調べた。pK8252 (Tc^r) は、Fig. 3-24 に示した 207 bp の EcoRI 断片内に、lac プロモーター⁶⁷⁾を有するので、EcoRI で切断した pNDH2912 又は、pNDH2921 と同様に、EcoRI で切断した pK8252 を混合後、lac⁺ の大腸菌 (294 株) を形質転換した。pK8252 と pNDH プラスミドは、いずれも ColE1 系のレプリコンである為、アンピシリン耐性、β-galactosidase 構成性を指標として形質転換株を選抜すると、各 pNDH プラスミドの EcoRI 部位へプロモーター断片が挿入されたプラスミドだけが選抜され、両プラスミドが同時に、導入された株は得られない。

pNDH2912 由来のアンピシリン耐性、β-galactosidase 構成性の形質転換株、60 株中 26 株に、pNDH29 保持株の約 10 倍の EII 活性が検出された (Fig. 3-25)。更に、EII 活性の回復した 3 株 (pNDH2912 L1, pNDH2912 L2, pNDH2912 L3 保持株)、回復しなかった 1 株 (pNDH2912 L4 保持株) のプラスミドにプロモーター断片が相互に逆方向に挿入されている事を制限酵素解析 (PstI, PvuII, PstI + SmaI) から明らかにした。又、pNDH2921 にプロモーターが挿入した株では、30 株すべてに EII 活性が検出されなかった。以上の結果から、pNDH29 由来の誘導プラスミドと EII 活性の対応をまとめると Fig. 3-25 の様になり、EII 構造遺伝子は A₁断片上に存在すると結論した。少なくとも iii) の可能性は排除 (うるが i), ii) のいずれかを決定する為には、① 1 つの細胞中に A₁, A₂断片をトランス位に導入して発現が見られるか ② A₂断片内にプロモーターが同定されるか等

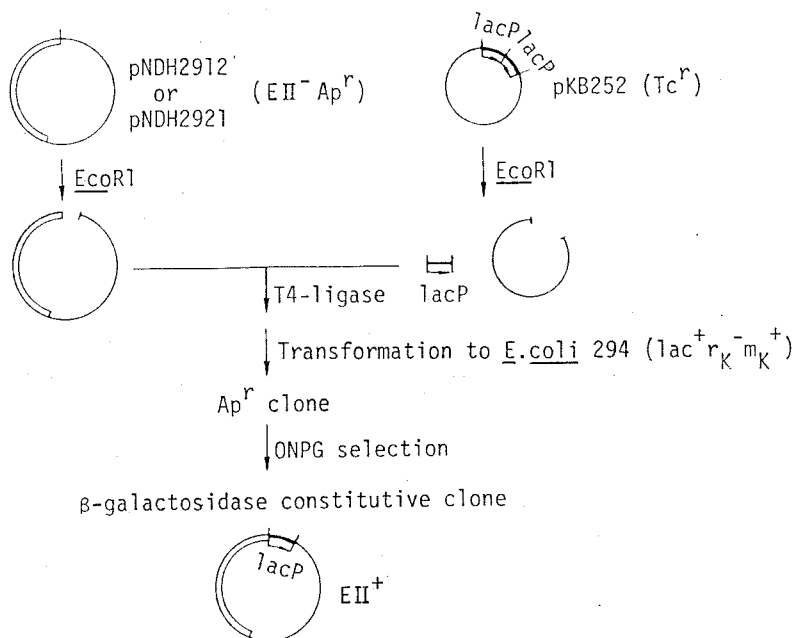


Fig. 3-23. Scheme for the construction of hybrid plasmids containing
* lac uv5 promoter fragment.

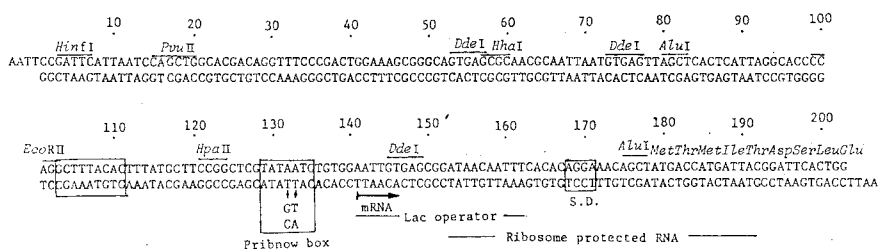


Fig. 3-24. Nucleotide sequence of lac uv5 promoter fragment.

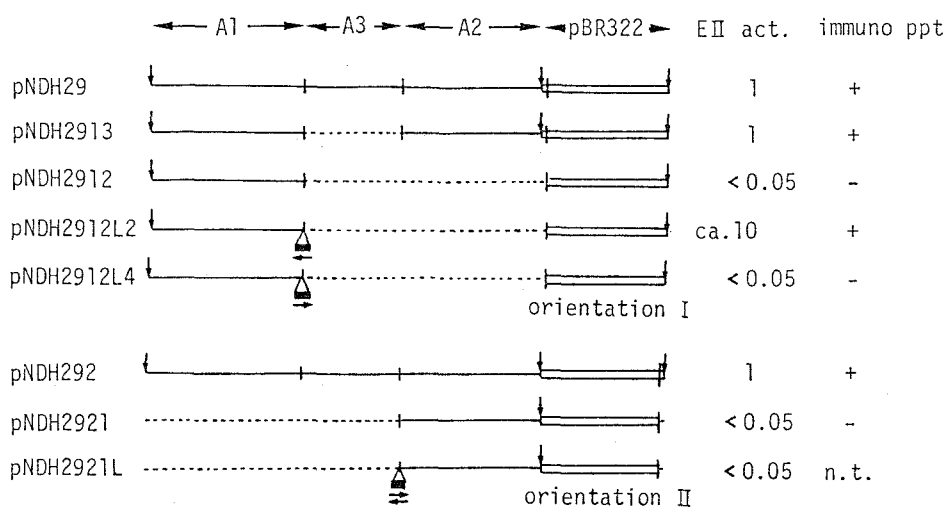


Fig. 3-25. Plasmid structure of pNDH29 and its derivatives, and their productivity of 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase. Deleted regions were shown by broken lines. Heavy bar indicates the lac promoter fragment. Enzyme activities were determined by densitometric analyses of a spot of 6-aminohexanoic acid produced from 6-aminohexanoic acid linear dimer after paper chromatography. Enzyme activities were expressed as the ratio toward the activity of *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ harboring pNDH29.

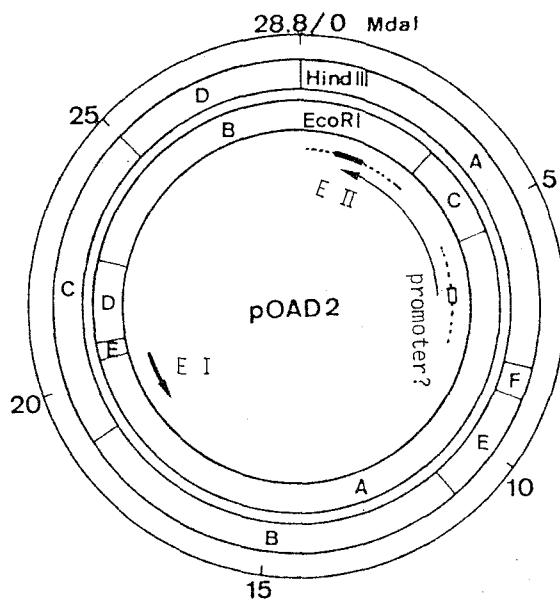


Fig. 3-26. Position of the EI and EII loci on pOAD2. Expected transcriptional directions of the genes were represented by arrows

の検討を要する。但し、EI酵素では、発現にポジティブ制御遺伝子は不要である事や、たとえEII遺伝子の発現にポジティブ制御蛋白質を仮定しても、大腸菌内でのその蛋白質含量、RNAポリメラーゼと制御蛋白質の相互認識における異種間障害等から、i)の可能性が最も妥当と考えられる。EI、EII遺伝子の解析結果をpOAD2に戻すとFig. 3-26の様になる。

6. EI*酵素のプラスミド(pOAD21)依存性

第2章で述べた様に、pOAD2欠損株($Acd^- Ald^-$)では、EI、EII両活性とも親株の $1/200$ 以下で復帰変異も検出されない。しかし、欠失プラスミドpOAD21を保持するKI725株($Acd^- Ald^+$)やそのストレプトマイシン耐性株(KI7250)では、親株の約7%のEI活性が認められ(Fig. 3-27)、 Acd 資化性は 10^{-6} の頻度で回復した。KI725由来の Acd^+ 復帰変異株の中の1株、KI725R1は親株の約30%のEI活性が認められるが、親株のEIとは、免疫的に異なる事をOuchterlony法により証明した(Fig. 3-28)。すなわち、親株、又はKI725R1株の細胞抽出液を順次2倍ずつ希釈し、親株の精製EIに対して得られたウサギ抗血清(中央の穴)に対する沈降線形成の有無を調べた。親株では、原液(相対活性を100とする)の6%希釈液まで沈降線が確認されたが、KI725R1株では、親株の50%の活性を有する細胞抽出液を用いても沈降線は認められない(Fig. 3-28)。さらに、KI725R1株の細胞抽出液をDEAE-セフデックスカラムに負荷した場合、EI活性の溶出位置が親株とは異なる(溶出食塩濃度、親株: 0.25 M, KI725R1株: 0.35 M)。さらにSephadex G200カラムクロマトグラフィーで精製後、SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、分子量30,000付近の蛋白質が主要バンドとなり、親株のEI(分子量55,000)に相当するバンドは検出されない。そこでKI725R1株で生産されるEI

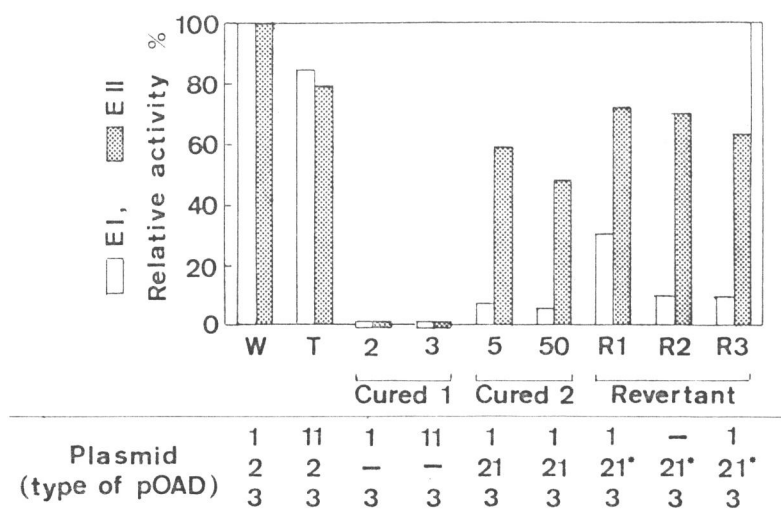


Fig. 3-27. Enzyme activities and plasmids of wild, cured, transformant and revertant strains. EI and EII activities of cell extracts were determined by TNBS method described by Kinoshita et al^{25,26)} and were expressed as percentage of the specific activity in wild (KI72) strain (EI; 2.13×10^{-2} units/mg protein; EII; 3.6×10^{-3} units/mg protein). W, KI72; T, KI723T1 (transformant); 2, KI722; 3, KI723; 5, KI725; 50, KI7250; R1, KI725R1; R2, KI725OR1; R3, KI725OR2.

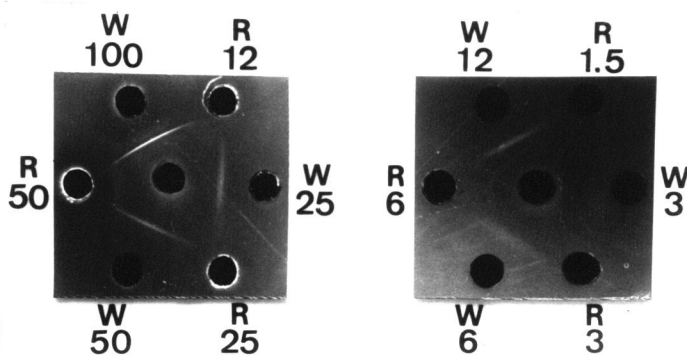


Fig. 3-28. Double diffusion test between cell extracts of KI725R1 (revertant) strain and anti-EI serum. Central well contained rabbit anti-serum against purified EI from KI72. W and R represent KI72 and KI725R1, respectively. Enzyme amounts contained in each well were represented as percentage of the activity of undiluted cell extract of wild strain (1.1×10^{-2} units).

を親株の EI と区別する為、EI* と命名した。

Accl⁺ 復帰変異の機構や、EI, EI* 蛋白質間の比較研究は、実験室レベルでの酵素進化を研究する良い系となる。そこで復帰変異の座位がプラスミド上、染色体 DNA 上のいずれにあるのかを検討する為、KI723 を受容株とし、KI725 (Accl⁻), KI725 R1 (Accl⁺) のプラスミドを供与 DNA として形質転換を行った。得られた形質転換株の Accl 表現型は、供与菌の形質を発現する事から、復帰変異の座位は pOAD21 上にあると推察される。しかし、KI725, KI725 R1 株より調製した pOAD21 の EcoRI, BamI または HindIII 切断像に顕著な差は見られなかった。点突然変異等のわずかの遺伝子変化と予想される。

EI* の生成過程として i) pOAD2 上の 6 Mdal の欠失により EI 構造遺伝子の一部（おそらく C 末端側）が失われる。
ii) pOAD2 上で EI とは全く異なった位置に EI* 遺伝子が存在し、復帰変異の過程でそれが活性化される。両者のいずれかを定める為には、EI 遺伝子座と欠失領域の位置関係を決定すれば良い。EI 遺伝子は pOAD2 のマップ上 19.1 Mdal の KpnI 部位と、20.3 Mdal の SallI 部位の間に存在するが (Fig. 3-12, 3-17, 3-26.), KpnI 部位 (19.1 Mdal), BamI 部位 (24.5 Mdal) は、いずれも pOAD21 では失われるので、6 Mdal の欠失領域は、18.5 - 25.1 Mdal の間に存在する (Fig. 3-6)。従って、pOAD2 上の EI 遺伝子座は 6 Mdal の欠失により失われると結論できる。EI* 構造遺伝子は、EI とは全く異なった領域に存在するのであろう。

7. pOAD2 上の繰り返し配列

EI、或いは EI に類似した塩基配列を KI72 株の保持する 3 種類のプラスミド pOAD1, pOAD2, pOAD3 或いは染色体 DNA から Southern blotting 法により検索した。Fig. 3-29 (スロット

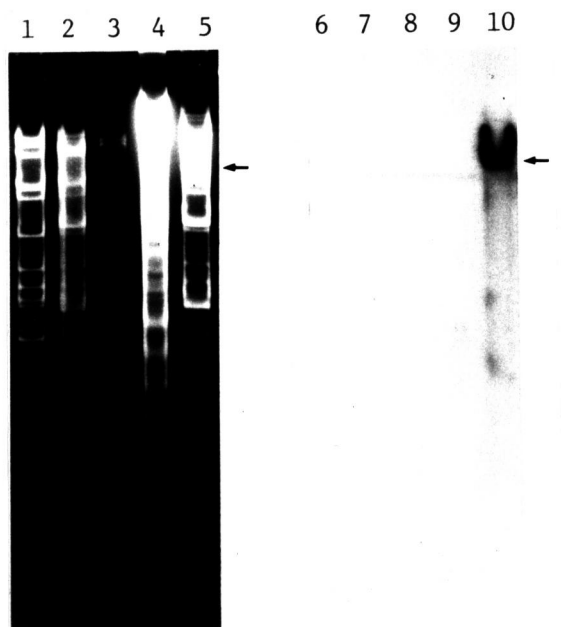


Fig. 3-29. Southern blot hybridization of restriction fragments of pOAD1, pOAD2, pOAD3 or chromosomal DNA with ³²P-labeled pNDH501 DNA. After plasmids of KI722 (mixture of pOAD1 and pOAD3) [slot 1], plasmids of KI725R1 (mixture of pOAD1, pOAD21 and pOAD3) [slot 2], purified pOAD21 from KI725R1 (slot 3), chromosomal DNA of KI722 (slot 4), and plasmids of KI72 (mixture of pOAD1, pOAD2 and pOAD3) [slot 5] were digested with HindIII, the DNA were fractionated by agarose (1%) gel electrophoresis followed by staining with ethidium bromide. DNA fragments which contained the nucleotide sequence analogous to EI structural gene were detected by Southern blotting and hybridization with nick-translated pNDH501 as probe (slot 6 - 10, respectively). Arrows indicate hybridized fragment, which corresponds to pOAD2-HindIII-C (6 Mdal) fragment.

1~5)は HindⅢ で切断した pOAD1, pOAD2, pOAD3 及び染色体 DNA をアガロースゲル電気泳動で分析したものである。これを Southern 法によりニトロセルロースフィルターへ移行させた。一方、プラスミド pNDH501 (EI遺伝子の存在する 19.0 ~ 20.3 Mdal の間の断片と pBR322 との合成プラスミド) 或いは pNDH2912 (EII遺伝子の存在する 0 ~ 3.3 Mdal の間の断片と pBR322 との合成プラスミド) をニックトランスレーションでラベルし、上記のフィルターへハイブリダイズさせた。Fig. 3-29 (スロット 6 ~ 10) に示す様に、pNDH501 は KI722 株のプラスミド (pOAD1, pOAD3) や染色体 DNA とはハイブリダイズしないが、pOAD2 の HindⅢ - C 断片 (スロット 10) にハイブリダイズした。この領域は EcoRI + HindⅢ の 2重切断により C₃断片に限定できるので EI遺伝子に類似した繰り返し配列は認められない。

一方、pNDH2912 は pOAD1, pOAD3, 染色体 DNA とはハイブリダイズしないが (データ未提出) pOAD2 の C, E 断片, pOAD21 の B'断片とハイブリダイズし (Fig. 3-30, スロット 21, 5, 10), A₁断片に類似した塩基配列が pOAD2 上の少なくとも 2箇所 に存在する事が示された。この位置を決める為に、組換えプラスミド pNDH5 (C断片), pNDH10 (E断片), pNDH211 (B'断片) (Table 3-2) を種々の制限酵素で処理後、電気泳動を行い、pNDH2912 をプローブとしてハイブリッド形成を行った。Fig. 3-31 はその例で、pNDH5 を HindⅢ + EcoRI (スロット 1), HindⅢ + BamI (スロット 2), HindⅢ + SalI (スロット 3) で切断して得られた断片の中で、それぞれ矢印で示した 2.35 Mdal (C₁), 0.48 Mdal, 0.48 Mdal の断片がハイブリダイズした。その結果、Fig. 3-32 に示す様に、pOAD2 のマップ上で 24.5 ~ 25.0 Mdal に繰り返し配列 4 (RS4) が同定された。又、E断片, B'断片を含む組換えプラスミドについて同様の実験を

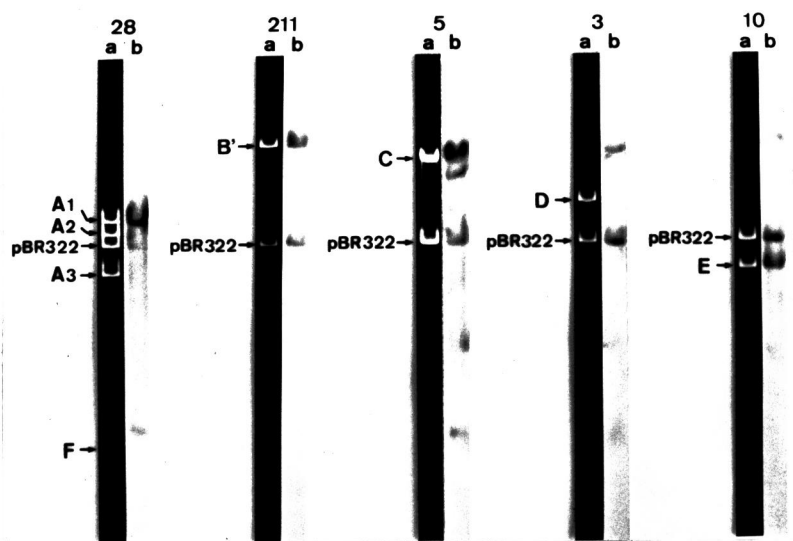


Fig. 3-30. Identification of restriction fragments which contain the nucleotide sequence analogous to EII structural gene. Plasmids pNDH28 (28), pNDH211 (211), pNDH5 (5), pNDH3 (3) and pNDH10 (10) were digested with HindIII and were electrophoresed in agarose (1 %) gel. a, ethidium bromide stain of restriction fragments; b, Southern blot of the gel hybridized with ³²P-labeled pNDH2912.

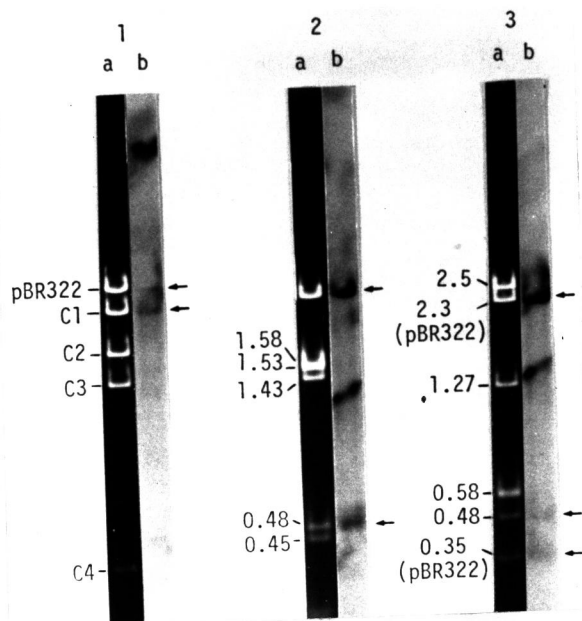


Fig. 3-31. Fine locus of the repeated sequence on pOAD2-HindIII-C fragment. Plasmid pNDH5 was digested with HindIII + EcoRI (slot 1), HindIII + BamI (slot 2) or HindIII + SalI (slot 3), and electrophoresed in agarose (1%) gel. a, ethidiumbromide stain of restriction fragments; b, Southern blot of the gel hybridized with ³²P-labeled pNDH2912. Arrows indicate the hybridized fragments.

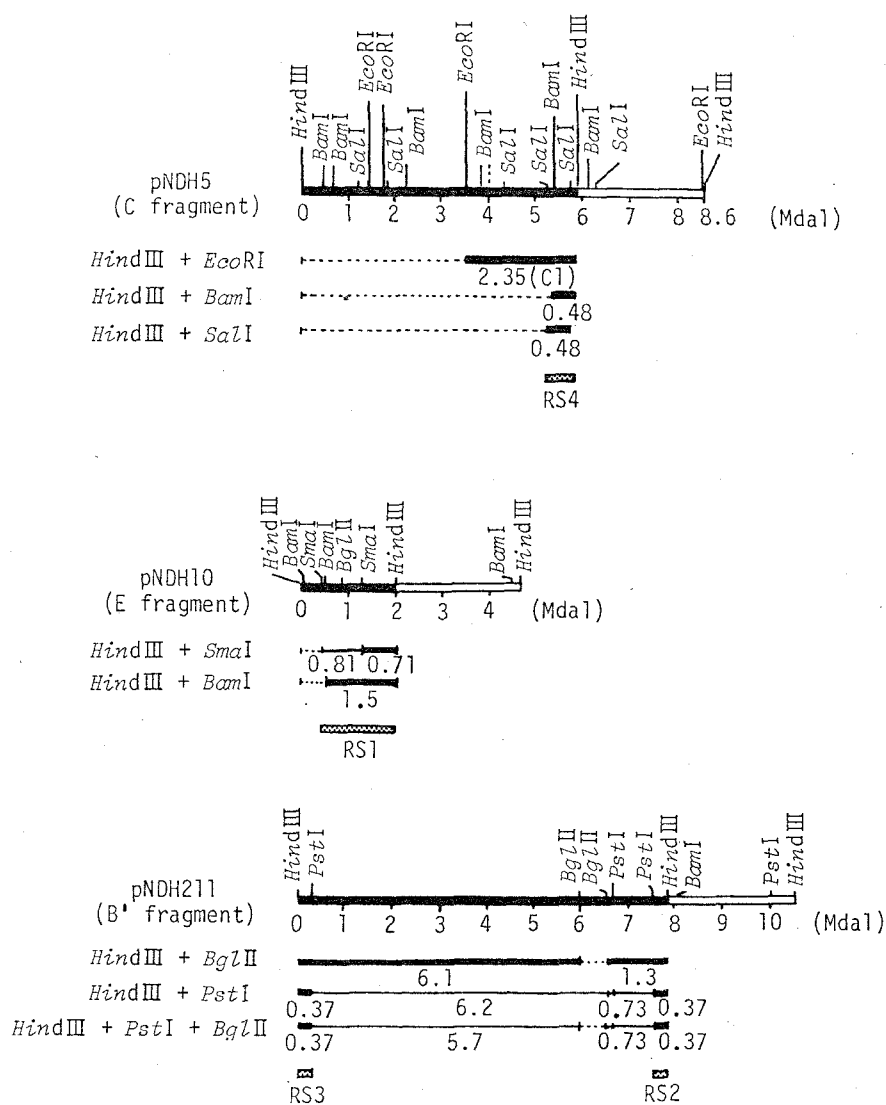


Fig. 3-32. Restriction fragments which hybridized to pNDH2912 containing EII structural gene. Heavy bar and broken line represent hybridized and non-hybridized fragment, respectively.

行った結果も Fig. 3-32 に示した。図中、バーの太さはハイブリダイズするバンドの強度を、破線は、バンドが検出されなかった領域を示す。以上の結果、Fig. 3-33 に示す様に、A1 断片に類似した繰り返し配列が pOAD2 上に少なくとも 4 箇所存在する事を結論した。但し、マップ上 11.1 ~ 19.0 Mdal の領域は、pNDH211 (挿入断片として pOAD21-HindIII-B' 断片を含む) (Table 3-2) を用いて解析したので pOAD2 が RS3 を含まない可能性は排除できない。

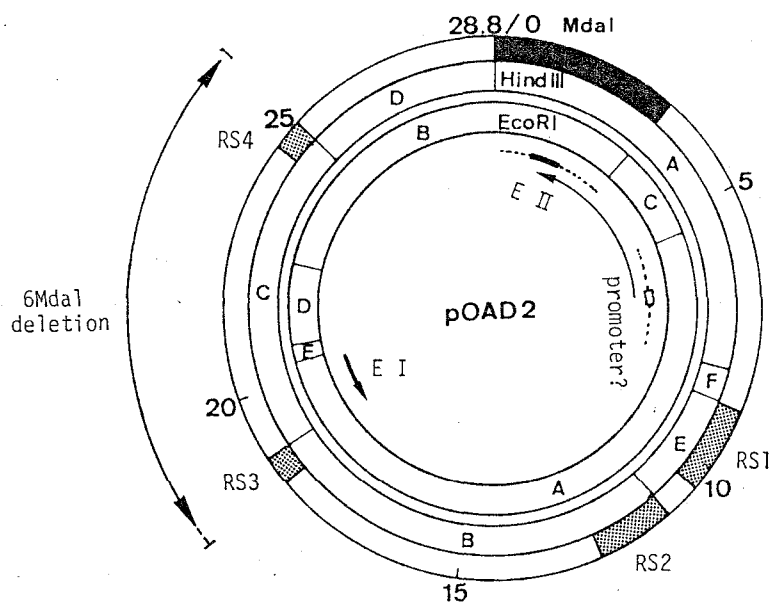


Fig. 3-33. Physical and functional map of pOAD2. EI gene is located in a region between 19.0 and 20.3 (Mdal) on pOAD2 and may be expressed counterclockwise. Structural gene of EII is located between 0 and 3.3 (Mdal) (A1 fragment). A1 fragment (shown by heavy bar) hybridized to four repeated sequence (RS1, RS2, RS3 and RS4) (shown by shaded bar) but homology among the repeated sequences was not checked. Deleted region (6 Mdal) in pOAD21 is located between 18.5 and 25.1 (Mdal).

第4節 考察

EI, EII の様な合成化合物のみを基質とする特殊酵素の遺伝子構造及び機能の研究は、微生物が非天然基質の分解能力を獲得する過程を解析する良い系となる。微生物内に、1つの新しい機能が発生し、それが安定に発現し定着される為には i) 既存の DNA 配列から非天然基質の分解が可能な新しい構造遺伝子が創生される、ii) これが効率良く発現される様にプロモーター領域へ連結される2つの過程が必須である。

Flavobacterium sp. KI72 株は、EI, EII 両酵素を構成的に生産する。新しく進化した酵素が必然的に構成酵素であるのは、誘導酵素では、i), ii) の過程に加えて、リプレッサー等の制御蛋白質や、オペレーター領域も旧基質から新基質に適合させる様な変異が同時に起こる必要があり、その様な事は殆ど、期待できないからである。EI や EII 遺伝子の発現機構を解析する為には、プロモーター領域を同定し、さらにプロモーターの塩基配列を EI, EII、或いは既存の(天然基質に作用する酵素の)遺伝子間で比較検討する必要がある。

発現機構の研究に用いた系は、EI, EII 間で異なる。pNDH501 は大腸菌内で EI 活性を発現できる最小のプラスミドであるが、以下の結果よりこの中にプロモーターが存ると考えられる。i) pNDH5 とは HindIII - C 断片が逆に挿入されたプラスミド pNDH53 でも EI 活性が発現する。ii) pNDH5 の Ta^{I} プロモーター領域を欠失させても EI 遺伝子の発現は影響されない。iii) pNDH501 保持株は KI72 株と免疫的、電気泳動的に同一の EI 蛋白質を生産する。

pNDH501 は挿入された断片 (1.25 Mdal) が構造遺伝子 (0.95 Mdal) よりわずかに大きいだけなので exonuclease III 処理によ

り挿入断片末端より欠失させ、EI活性、免疫性が急に消失する様な限界領域が同定できれば、これがプロモーターと考えられる。実際に、pOAD2のマップ上で20.1 Mdal 付近にこの様な領域が同定できた。しかし蛋白質のC末端側、約40個までにすべての抗原決定基が存在し、欠失にともなって、免疫性がなくなるという可能性も排除できない。従って pNDH501 の挿入断片の逆の末端 (Hind III) 側から欠失させたプラスミドを作製し、そのプラスミド保持株の蛋白質を解析する必要がある。

一方、EII 遺伝子の発現に、離れた2つの領域 (A₁ 断片 (0~3.3 Mdal), A₂ 断片 (5.4~8.4 Mdal)) が必要であり A₁ 断片に構造遺伝子が配位されている事を lac UV5 プロモーターを用いた解析から明らかにした。特にプロモーターの存在が予想される A₂ 領域から EII-mRNA が合成されると仮定すればその間には複数の蛋白質が支配される大きさがあり、この領域の機能には興味がある。大腸菌内では *Flavobacterium* 内とは異なったプロモーターを利用している可能性も否定できないので、以上の結果は、KI72 株の系で再検討する必要がある。

以下の実験事実から EI と EII は独立に起った酵素進化と考えるのが妥当である。i) 両構造遺伝子は pOAD2 の地図上で少なくとも 8.5 Mdal 離れ、それぞれ独立のプロモーターを有する。ii) 抗 EI 血清、抗 EII 血清は、それぞれ EII 蛋白質、EI 蛋白質とは反応しない。iii) EI 領域がクローン化された pNDH501 は EII 領域にハイブリダイズしない。逆に、EII 構造遺伝子を含む pNDH2912 は EI 領域との間でハイブリドを形成しない。

EI と EII の遺伝子が同じプラスミド上に存在する事や、他

の ϵ -アミノカプロン酸環状二量体 (Acd) 分解菌⁶⁸⁻⁷¹⁾の細胞抽出液が抗 EI 血清と反応しない事から、酵素の進化現象は想像より高い頻度で起こっていると考えられる。特に EI、EI^{*} 以外にナイロンオリゴマーの分解を支配する遺伝子 (EI^{*}) が pOAD2 上に存在し、EI 領域だけを欠失させた株から Acd⁺ に復帰する過程で、この遺伝子が活性化する現象は、実験室で酵素進化を調べる良い系となる。EI、EI^{*} 蛋白質間の塩基配列の類似性は検討していないが、EI 構造遺伝子が存在する A1 断片に類似した配列が pOAD2 上の少なくとも 4 箇所が存在する事実と考えあわせると、原始型酵素の活性中心部分と他のペプチドの融合によりナイロンオリゴマー分解酵素が発生した様に思われる。このような融合を引き起こす DNA の欠失、挿入、重複等は高頻度に見られる。例えば、マイトマイシン C を用いたプラスミド消去実験で、pOAD1 の Hind III-8.6 Mdal 断片内の一部が欠失したり (KI723)、その断片内に挿入、又は重複が起こる場合 (KI724) がある (第 2 章参照)。さらに、pOAD2 上の 6 Mdal の欠失では、欠失領域末端が RS3、RS4 内部に在るか、極めて隣接している (Fig. 3-33)。従って、このような欠失には、プラスミド内の繰り返し配列が関与している可能性が極めて高い。天然には、以上の様な遺伝子変化を通じてペプチド単位での張り替えが容易に起っており、ペプチド部分の変化により、酵素の基質特異性が変化し、それが定着するのは自然の淘汰力が意味をもつものと思われる。

第5節 要約

1. 親株 (KI72) のマイトマイシンC処理で、 $AccI^-Ala^+Ara^+$ の株 KI725 が得られたが、この株は pOAD2 上で 6 Mdal 欠失したプラスミド pOAD21 (22.7 Mdal) を保持していた。両プラスミドの制限酵素 ($EcoRI$, $HindIII$) 切断地図の比較から欠失領域は pOAD2 の地図上で 16.6 ~ 26.4 Mdal の間に存在し、この領域内に EI 遺伝子が存在すると推察された。
2. pOAD2 の $HindIII$ 断片 [A (8.4 Mdal), B (7.9 Mdal), C (6.0 Mdal), D (3.8 Mdal), E (2.2 Mdal), F (0.57 Mdal)] と pBR322 とからハイブリッドプラスミドを構成し、形質転換で大腸菌へ導入した。得られたアンピシリン耐性テトラサイクリン感受性の形質転換株の菌体抽出液中 EI 活性が見られた 6 株は共通してベクター DNA 内へ $HindIII$ -C 断片が挿入されていた。一方、EI 活性の発現する 5 株は、いずれも、 $HindIII$ -A 断片を共通に含んでいた。この結果、EI 構造遺伝子は C 断片上に、EI 構造遺伝子は A 断片上に離れて位置するものと結論した。
3. pNDH5 (pBR322 と pOAD2 - $HindIII$ -C 断片との合成プラスミド) から $SalI$ 処理で EI 活性を発現できる最小の欠失プラスミド pNDH501 を得た。pNDH501 は、B 断片に隣接する 1.25 Mdal の領域を挿入断片として含むので EI 遺伝子座は 19.0 ~ 20.3 Mdal の間に存在する。この大きさは、EI 構造遺伝子の推定値 0.95 Mdal に較べてそれほど大きいものではない。又、pNDH501 保持株で生産される EI は免疫的にも、電気泳動的にも KI72 株のものと同一挙動を示した。従って pNDH501 は EI 遺伝子の開始点、終了点を含んでいる。 $HindIII$ -C 断片が pNDH5 とは逆方向に挿入された

pNDH53 でも、EI活性が認められる事から、大腸菌内での発現は、挿入断片内に位置するEIプロモーターから開始すると考えられる。さらに pOAD2 の地図上で 20.1 ~ 20.3 Mdal に相当する領域を pNDH501 から欠失させると、EI 活性、免疫性が失われるので、この部位に EI プロモーターが存在すると推察される。

4. pNDH29 (pBR322 と pOAD2-HindIII-A 断片との組換えプラスミド) から EcoRI, 或いは BglII 処理で欠失プラスミドを作製した。その結果、EII 遺伝子の発現には、pOAD2 の地図上で 0 ~ 3.3 Mdal (A₁断片) と 5.4 ~ 8.4 Mdal (A₂断片) の2つの領域が必要であった。A₁断片を含む pNDH29/2 (EII 非生産性) の EcoRI 部位へ λ c UV5 プロモーター断片を挿入すると、EII 活性は、pNDH29 保持株の約 10 倍に上昇した。一方、A₂断片を含む pNDH29/21 では、プロモーターを挿入しても活性が回復しない事から、EII 構造遺伝子は、A₁断片内に在ると結論した。

5. KI725 株 (Acd⁻ Acd⁺) の Acd 資化性は 10^{-6} の頻度で回復した。復帰変異株の1つの KI725 R1 は親株の 30% の EI 活性が認められるが、免疫性、分子量、イオン交換クロマトグラフィーでの挙動で、親株とは異なる蛋白質 (EI*) を生産する。EI* が pOAD21 に支配される事は、KI723 を受容菌とした形質転換から明らかにした。さらに、pOAD2 上での 6Mdal の欠失領域と、EI 遺伝子座の比較検討から、EI* は EI とは離れた位置に存在する。

6. ニックトランスレーションでラベルした pNDH501, 又は pNDH29/2 をプローブとして、EI, 或いは EII 領域に類似した塩基配列を、KI72 株のプラスミド pOAD1, pOAD2, pOAD3 及び染色体 DNA から Southern blotting 法により検索した。

pNDH501 は pOAD2-C₃断片 (19.0~20.4 Mdal) のみとハイブリッドを形成し、pOAD2上の他の領域や、pOAD1, pOAD3, 染色体DNAとはハイブリダイズしない。従って、E1に類似した繰り返し配列は認められない。一方、pNDH29/2をプローブとしたハイブリッド形成実験から、A₁断片に類似した繰り返し配列はpOAD2上に少なくとも4箇所存在するが、pOAD1, pOAD3, 染色体DNAには認められなかった。

総括 (結論)

一般に微生物は多種多様な能力を有し、環境条件に高度に適応しうる能力を持っていると考えられている。特に、特殊な合成有機化合物を唯一の炭素源、窒素源として生育可能な微生物も適切な選択法さえ用いれば、比較的容易に分離が可能である。従って、微生物内に新しい分解代謝系が発生し、それが定着する頻度も想像以上に高い様に思われる。しかしながら、従来の応用微生物学で取り扱う特殊化合物への研究例では、スクリーニングの方法、分解代謝経路等の現象面の記載に留まるものが多く、この様な微生物の適応がいかなる過程で進行するかを解明しようとする研究は殆どなされていない。本研究では、ナイロン工場廃液の汚染地区で起った微生物の適応過程の一断面を解析する為、6-ナイロン工場廃液中に含まれる ϵ -アミノカプロン酸環状二量体 (Acd) を単一の炭素源、窒素源として生育可能な微生物 *Flavobacterium* sp. KI 72 株について、酵素学的、遺伝学的に検討を加えた。その結果、Acd の分解に関与する2種類の酵素の諸性質、両酵素のプラスミド依存性、及びこのプラスミドの構造と機能を明らかにしたのが本論文であり、ここで得られた結果は、次の様に総括結論される。

第1章では、Acd の分解に関与する2種類の酵素、6-amino-hexanoic acid cyclic dimer hydrolase (EI), 6-amino-hexanoic acid oligomer hydrolase (EII) の中から、特に EI を電気泳動的、超遠心的に均一まで精製し、その一般性質、分子量、基質特異性、アミノ酸組成等を検討した。その結果、本酵素は分子量 50,000 のホモダイマーである、ii) PCMB で活性が顕著に阻害される事から、SH 基が活性中心に存在する、

iii) Acd のみを基質とし、天然に存在する 100 種類以上のアミド化合物やペプチドに対する作用力を持たない極めて特異性の高い酵素である事等が明らかとなった。

第2章では、EI、EII 両酵素がプラスミド支配にある事を以下の実験結果から証明した。すなわち、KI72 株は、3 種類のプラスミド、pOAD1 (26.2 Mdal), pOAD2 (28.8 Mdal), pOAD3 (37.2 Mdal) を有する。これらのプラスミド含量の総計は、全 DNA の約 4% を占める。親株の ϵ -アミノカプロン酸の環状 2 量体、直鎖状 2 量体資化性は、マイトマイシン C 処理等により同時に消去され、しかも消去株には、両酵素が活性、免疫性とも検出されない。又、消去株からは復帰変異株が認められない。pOAD2 は独立に得た 5 株の消去株すべてに欠失しており、形質転換株では回復している。形質転換株では、両酵素活性が原株水準まで回復しており、しかも親株 (KI72) の酵素と免疫的に同一の蛋白質である。親株、消去株、形質転換株とも pOAD3 を共通に保有するが、親株の pOAD1 は消去処理によっても変化しない場合と、欠失、挿入、置換等によりその構造の一部が改変される場合もある。以上の結果から両酵素とも遺伝子座が pOAD2 上に在る事を結論した。しかし、構造遺伝子か、制御遺伝子かは不明である。EI、EII の様な特殊酵素が保存性の悪いプラスミド上に位置する事から、両酵素とも進化により新しく出現した酵素と考えるのが妥当であろう。しかし、これらの問題の検討には遺伝子の単離と構造解析が必須である。

第3章では、以上の問題を分子レベルで考察する為に、まず pOAD2 と、これに由来し EI 領域が欠失したプラスミド pOAD21 について制限地図を作成した。この結果を下に、pOAD2 の HindIII 断片 (A~F) を大腸菌ベクター pBR322 へクローン化し、

活性の発現するクローンを検索した。さらに大腸菌内で生産される蛋白質とベクター内への挿入DNAの同定の結果、EI、EII 構造遺伝子が、それぞれ pOAD2 の HindIII - C, HindIII - A 断片上に離れて存在する事を明らかにした。次に、両遺伝子の地図上の位置を決定し、大腸菌内での発現機構を調べる目的で、組換えプラスミド、pNDH5 (HindIII - C 断片と pBR322 から構成) より欠失プラスミドを作製した。pNDH5 の SalI 処理で得た pNDH501 が EI 活性を発現できるので、その遺伝子座は、pOAD2 上の 19.0 ~ 20.3 Mdal に存在する。又、pNDH501 を exonuclease III と nuclease SI 処理で得た種々の誘導プラスミドの欠失領域の比較から、EI プロモーターの位置が決定できた。一方、pNDH29 由来の欠失プラスミドの比較から、EII 遺伝子の発現には pOAD2 上の 0 ~ 3.3 Mdal (A₁ 断片) と 5.4 ~ 8.4 Mdal (A₂ 断片) の2つの領域が必要であった。さらに pNDH29/2 (EII 非生産性) の EcoRI 部位へ lac プロモーター断片を挿入すると EII 活性が回復した事から、その構造遺伝子座が A₁ 断片内にあると結論した。又、欠失プラスミド pOAD2 上には、EI 活性を保持しながら、親株の EI とは免疫性、分子量が異なる蛋白質 (EI*) が存在する事を Ouchterlony 試験、形質転換、欠失領域の解析から明らかにした。最後に、pNDH29/2 をプローブとしたハイブリッド形成実験 (Southern 法) から A₁ 断片類似の繰り返し配列は pOAD2 上に少なくとも4箇所存在するが、pOAD1、pOAD3、染色体 DNA には認められなかった。

EI、EII 酵素が新しくプラスミド上で創生された事を決定付ける直接証拠は得られなかったが、i) EI、EII 以外にナイロンオリゴマー分解を支配する遺伝子 (EI*) が存在し、EI 領域だけを欠失させた株から Acd⁺ へ復帰する過程で、これが活性化される。ii) pOAD2 上に複数個の繰り返し配列が存在する等

の事実から、この可能性は極めて高いと思われる。この様な
酵素進化で分解できる非天然基質の範囲や、進化の過程につ
いて一般的結論を下すには、より広範囲の研究が必要である。

引用文献

- 1) F. Jacob and J. Monod, J. Mol. Biol., 3, 318 (1961)
- 2) J. R. Beckwith and D. Zipser, "The lactose operon," Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1970, pp. 1 - 448.
- 3) J. H. Miller and W. S. Reznikoff, " The operon, 2nd ed.," Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1979, pp. 1 - 450.
- 4) T. Yamanaka and Y. Fukumori, " Evolution of protein molecules," ed. by H. Matsubara and T. Yamanaka, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1978, pp. 387
- 5) H. Jornvall, Eur. J. Biochem., 72, 443 (1977)
- 6) E. L. Smith, M. Landon, D. Piszkievicz, W. J. Brattin, T. J. Langley and M. D. Melamed, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 67, 724 (1970)
- 7) W. K. Yeh, G. Davis, P. Fletcher and L. N. Ornston, J. Biol. Chem., 253, 4920 (1978)
- 8) L. N. Ornston and W. K. Yeh, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 3996 (1979)
- 9) S. Ohno, " Evolution by gene duplication," Springer-Verlag New York Inc, 1970, pp. 1 - 239.
- 10) W. J. Peacock, A. R. Lohe, W. L. Gerlach, P. Dunsmuir, E. S. Dennis and R. Appels, Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin, Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 42, 1121 (1978)
- 11) 水野, 蛋白質·核酸·酵素, 26, 678 (1981)
- 12) J. H. Campbell, J. A. Lengyel and J. Langridge, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 70, 1841 (1973)
- 13) B. G. Hall and T. Zugel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

- 77, 3529 (1980)
- 14) H. E. Redetzki and W. W. Nowinski, *Nature*, 179, 1018 (1975)
 - 15) S. Falkow, " Infectious multiple drug resistance," Pion Limited, London, 1975, pp. 1 - 330.
 - 16) 松原, 「プラスミド」講談社, 1976, pp 5-7
 - 17) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 3240 (1973)
 - 18) J. Tomizawa, Y. Sakakibara and T. Kakefuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1050 (1975)
 - 19) P. Gustafsson, H. Dreisig, S. Molin, K. Nordstrom and B. Uhlin, DNA replication control, studies of R1, Cold Spring Harbor Symposium, *Quant. Biol.*, 43, 419 (1979)
 - 20) P. Starlinger, " DNA insertion elements, plasmids and episomes," ed. by A. I. Bukhari, J. A. Shapiro and S. L. Adhya, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977, pp. 25 - 30.
 - 21) M. P. Calos and J. H. Miller, *Cell*, 20, 579 (1980)
 - 22) R. E. Gill, F. Heffron and S. Falkow, *Nature*, 282, 797 (1979)
 - 23) 原田, 醗酵工学会誌, 56, 455 (1978)
 - 24) S. Kinoshita, S. Kageyama, K. Iba, Y. Yamada and H. Okada *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1219 (1975)
 - 25) S. Kinoshita, S. Negoro, M. Muramatsu, V. S. Bisaria, S. Sawada and H. Okada, *Eur. J. Biochem.*, 80, 489 (1977)
 - 26) S. Kinoshita, T. Terada, T. Taniguchi, Y. Takene, S. Masuda, N. Matsunaga and H. Okada, *Eur. J. Biochem.*, 116, 547 (1981)
 - 27) O. B. Weeks, " Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed.," ed. by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 357 - 364.
 - 28) R. Field, *Biochem. J.* 124, 581 (1971)

- 29) 青村, 神原, 木村, 永山, 西村, 佐藤, 「分析化学実験」
化学同人, 1971, pp 149-150.
- 30) K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969)
- 31) B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1965)
- 32) N. Citri, "The Enzyme," Vol. 4. ed. by P. E. Boyer,
Academic Press, New York (1971)
- 33) J. Lederberg and E. L. Tatum, Nature, 158, 558 (1946)
- 34) T. Watanabe and T. Fukasawa, Biochem. Biophys. Res. Comm.,
3, 660 (1960)
- 35) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang and L. Hsu, Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972)
- 36) M. Bazaral and D. R. Helinski, J. Mol. Biol., 36, 185 (1968)
- 37) A. M. Chakrabarty, Ann. Rev. Genet., 10, 7 (1976)
- 38) S. Benson, M. Fennwald, J. Shapiro and C. Huettner,
J. Bacteriol., 132, 614 (1977)
- 39) P. A. Williams and K. Murray, J. Bacteriol., 120, 416 (1974)
- 40) A. M. Chakrabarty, G. Chou and I. C. Gunsalus, Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A., 70, 1137 (1973)
- 41) J. M. Pemberton and P. R. Fisher, Nature, 268, 732 (1977)
- 42) P. R. Fisher, J. Appleton and J. M. Pemberton,
J. Bacteriol., 135, 798 (1978)
- 43) H. Kawasaki, N. Tone and K. Tonomura, Agric. Biol. Chem.,
45, 29 (1981)
- 44) H. Kawasaki, N. Tone and K. Tonomura, Agric. Biol. Chem.,
45, 35 (1981)
- 45) H. Kawasaki, H. Yahara and K. Tonomura, Agric. Biol.
Chem., 45, 1477 (1981)
- 46) 浄原, 長尾, 矢野 (1980) 日本農芸化学会大会
講演要旨集. pp 404
- 47) S. Palchaudhuri and A. M. Chakrabarty, J. Bacteriol.,
126, 410 (1976)

- 48) R. B. Inman, J. Mol. Biol., 25, 209 (1967)
- 49) F. Heffron, C. Rubens and S. Falkow, "DNA insertion elements, plasmids and episomes," ed. by A. I. Bukhari, J. A. Shapiro and S. L. Adhya, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977, pp. 151 - 160.
- 50) T. Tanaka and B. Weisblum, J. Bacteriol., 121, 354 (1975)
- 51) S. Gottesman and S. Adhya, "DNA insertion elements, plasmids and episomes," ed. by A. I. Bukhari, J. A. Shapiro and S. L. Adhya, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977, pp. 713 - 715.
- 52) B. Vogelstein and D. Gillespie, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 615 (1979)
- 53) A. J. Crowle, "Immunodiffusion," Academic Press Inc., New York, 1973, pp. 507 - 508.
- 54) Ö. Ouchterlony, Acta Pathol. Microbiol., 26, 507 (1949)
- 55) T. Hashimoto-Gotoh and K. N. Timmis, Cell, 23, 229 (1981)
- 56) E. M. Southern, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)
- 57) B. J. Bachmann, Bacteriol. Rev., 36, 525 (1972)
- 58) J. G. Sutcliffe, Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322, Cold Spring Harbor Symposium, Quant Biol., 43, 77 (1979)
- 59) F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Green, M. C. Betlach, H. L. Heynecker H. W. Boyer, J. H. Crosa and S. Falkow, Gene, 2, 95 (1977)
- 60) K. Backman, M. Ptashne and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4174 (1976)
- 61) H. C. Birnboim and J. Doly, Nucleic Acids Research, 7, 1519 (1979)
- 62) Y. Kuperstoch and Y. Helinski, Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1451 (1973)

- 63) A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter and H. M. Goodman, Science, 196, 1313 (1977)
- 64) T. M. Roberts, R. Kacich and M. Ptashne, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 760 (1979)
- 65) P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg, J. Mol. Biol., 113, 237 (1977)
- 66) D. Stuber and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 167 (1981)
- 67) R. C. Dickson, J. Abelson, P. Johnson, W. S. Reznikoff and J. Barnes, J. Mol. Biol., 111, 65 (1977)
- 68) T. Fukumura, J. Bacteriol., 59, 537 (1959)
- 69) T. Fukumura, Plant Cell Physiol., 7, 93 (1966)
- 70) H. Iizuka, I. Tanabe, T. Fukumura and K. Kato, J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 125 (1967)
- 71) T. Tosa and I. Chibata, J. Bacteriol., 89, 919 (1965)

本論文に関係のある報告

1. 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase. A new cyclic amide hydrolase produced by *Achromobacter guttatus* KI72.
Eur. J. Biochem., 80, 489 (1977)
2. Plasmid control of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer degradation enzymes of *Flavobacterium* sp. KI72
J. Bacteriol., 143, 238 (1980)
3. Physical map of nylon oligomer degradative plasmid, pOAD2, harbored in *Flavobacterium* sp. KI72
Agric. Biol. Chem., in press

謝辞

この研究を行うにあたり、終始御指導を賜わりました恩師
岡田弘輔教授を始め、合葉修一教授、大嶋泰治教授、原田篤也
教授、田口久治教授、芝崎 勲教授、市川邦介教授、山田靖宙
助教授、木下晋一助教授、新名惇彦博士、ト部 格博士、
関 達治博士、ならびに教室員の方々に、心から感謝致し
ます。又、有益な助言を賜わりました川俣順一教授、中田篤男
助教授、品川日出夫博士、菌株の同定を御指導下さった
高田信男助教授、組換えDNAの安全度評価の動物感染試験を
御教授下さった山之内孝尚教授、抗E工血清調製に御指導を
賜わった宮本博行教授、アミノ酸組成を分析下さった崎山文夫
助教授、超遠心分析を行って下さった垣内欣二博士に深謝
致します。さらに本研究に御協力いただいた金岡昌治氏、
谷口友康氏、鳩崎知哉氏、箕田正史氏、木村宏之氏、河本高伸
氏に厚く御礼申し上げます。