

Title	II型制限酵素の開発と生産菌株の育種に関する研究
Author(s)	前川, 宣彦
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2093
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	まえ 前	かわ 川	よし 宣	ひこ 彦
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	9031	号	
学位授与の日付	平成2年3月19日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Ⅱ型制限酵素の開発と生産菌株の育種に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 弘輔			
	教授 大嶋 泰治 教授 今中 忠行			

論文内容の要旨

本論文は遺伝子操作において遺伝子の単離，物理地図の作成，DNA塩基配列の決定など種々の目的に利用されている制限酵素の検索，生産菌の育種および制限—修飾系について研究した成果をまとめたものである。

緒論では制限酵素の種類，特性，生産菌の検索と育種について概論し，本論文の制限酵素の検索，育種に関する研究の背景を説明し，本研究の位置づけを明確にしている。

第1章では，新しい特異性をもつ制限酵素，および従来の生産菌に比べ生産性のすぐれているアイソゾマー生産株を見つける目的で検索を行っている。制限酵素活性が検出された菌株より酵素を精製しその特異性を調べた結果，制限酵素 *Aat* II, *Ban* II はDNAをそれぞれ G A C G T ↓ C, G P u G C P y ↓ C を認識し切断する新特異性を有する制限酵素である。*Aat* I, *Ban* I, *Ban* III その他の酵素はアイソゾマーであることを明らかにしている。またこれらの酵素の諸性質を検討している。

第2章では *Ban* I, *Ban* II, *Ban* III を生産する *Bacillus aneurinolyticus* IAM1077 株より *Ban* I, *Ban* III 制限—修飾系遺伝子をそれぞれ大腸菌にクローニングし，発現させて生産性をそれぞれ10倍，50倍に増加させている。また両組み換えプラスミドのラムダーフェージや大腸菌に対する制限—修飾を調べ，*Ban* I と *Ban* III は制限修飾活性に大きな差があることを示している。

第3章では，*Ban* I 制限—修飾系遺伝子の全塩基配列を決定している。制限酵素遺伝子は修飾酵素遺伝子の21bp上流に位置している。電気泳動的に単一に精製した *Ban* I 制限—修飾の両酵素のN-末端アミノ酸配列，およびサブユニットの分子量は全塩基配列からの推定とよく一致する。またゲル濾過法による分子量測定の結果から *Ban* I 制限酵素はダイマーであり，修飾酵素（メチラーゼ）はモノマ

一である。両酵素間では相同性は認められないが、修飾酵素はシトシンメチラーゼと共通するアミノ酸配列が存在する。

論文の審査結果の要旨

制限酵素はDNAの塩基配列を認識して加水分解する酵素であるが、遺伝子操作において遺伝子の単離、制限酵素地図の作成、DNA塩基配列の決定、クローン化など種々の用途に必須な酵素で市販されている。本論文は新しい制限酵素の開発、アイソゾマーの高生産性株の育種および制限 — 修飾系についての研究をまとめたもので次のような重要な結果を得ている。

- 1) *Acetobacter acetii* の生産する制限酵素 *Aat* II と *Bacillus aneurinolyticus* の生産する制限酵素 *Ban* II が新しい制限酵素であり、DNAの塩基配列、GACGT↓C と GPuGCPy↓C を認識し矢印の位置で切断することを証明している。
- 2) その他の制限酵素 *Aat* I, *Ban* I と *Ban* III はアイソゾマーである。
- 3) *B. aneurinolyticus* IAM1077より *Ban* I と *Ban* III の遺伝子を大腸菌にクローン化し、大腸菌で発現させてそれぞれ10倍と50倍に向上させることに成功している。
- 4) *Ban* Iの制限 — 修飾系遺伝子の全塩基配列を決定している。制限遺伝子は修飾遺伝子の21bp上流に位置している。得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、電気泳動的に均一に精製した *Ban* I 制限、および修飾酵素のN-末端部分のアミノ酸配列、および酵素蛋白質の分子量をよく説明するものである。
- 5) *Ban* I制限酵素はダイマーであり修飾酵素はモノマーであることを明らかにしている。
- 6) 本研究の成果はすでに工業化され、制限酵素の一部は市販されている。

以上のように本論文は制限酵素ならびに修飾酵素について基礎ならびに応用に関する知見を与えており、遺伝子工学ならびに酵素工学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。