Osaka University Knowledge Archive

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	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2093
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【102】

氏名・(本籍)	前川宣彦（まえかわよしひこ）
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シ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ＧＡＣＧＴ↓Ｃ，ＧＰｕＧＣＰｙ↓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シ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 aneurinolytics* 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ァ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

ーである。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，アイソシ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 aceti* の生産する制限酵素 *Aat* Ⅱと *Bacillus aneurinolytics* 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はアイソシゾマーである。

3) B. aneuriolyticus 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。