



Title	Bacillus subtilisの α -Amylaseの生産能の研究
Author(s)	関口, 順一
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2483
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Bacillus subtilis の α -Amylase

生産能の研究

関口順一

まえがき

この研究は、大阪大学工学部醸造工学教室において恩師岡田弘輔先生の御指導のもとに行なったものである。

この20年間の分子生物学の著しい発展は、酵素合成のメカニズムの研究に急速の進歩をとげさせ、特に微生物の分野においては、分子遺伝学の奇功のもとに遺伝子の構造と機能が詳細に明らかにされた。しかしながら工業的に利用されている微生物に関する酵素合成の制御の研究は少ない。

著者がここで取り上げた *Bacillus subtilis* の生産する α -amylase はデンプン工業に用いられているものであり、この酵素の制御を考えることは工業的な意味からも重要である。この最適モデルとして *Bacillus subtilis* の Marburg 株を用いた。

本研究においては、*Bacillus subtilis* Marburg 株の生産する α -amylase の生産量支配遺伝子とその役割について解析した。

ここに省みる時なお解明せねばならない問題が多数残されており、今後もその究明に努力する所である。

この研究を行うにあたり、終始御指導賜った恩師岡田弘輔教授、大嶋泰治教授、江夏敏郎助教授、高田信男助教授、山田靖宙助教授ならびに教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

また研究の便宜を計って頂いた日本臓器 清井正好氏、中田照氏、田辺製薬 柴谷式爾氏に深謝致します。

目次	頁
緒論	1
第1章 <i>Bacillus subtilis</i> Marburg 株の 生産する α -amylase の精製と 酵素化学的、免疫化学的性質	
第1節 緒論	8
第2節 実験方法および材料	11
第3節 結果	19
(1) Marburg 株 α -amylase の精製	19
(2) 酵素化学的性質	22
(3) 免疫化学的性質	28
第4節 考察	30
第5節 要約	32
第2章 α -amylase 高生産株の分離と α -amylase 生産の速度論的解析	
第1節 緒論	35
第2節 実験方法および材料	36
第3節 結果	37
(1) α -amylase 高生産株の分離	37
(2) α -amylase 生産の速度論的解析	41
(3) 酵素化学的性質	42

第4節	考察	47
第5節	要約	48
第3章	形質転換による α -Amylase 生産量 支配遺伝子の解析	
第1節	緒論	50
第2節	実験および材料	51
第3節	結果	56
(1)	α 215株と168 <i>try⁻ amy⁻ st^r</i> 株との 形質転換	56
(2)	196株と158 <i>try⁻ amy⁻ st^r</i> 株との 形質転換	60
第4節	考察	64
第5節	要約	66
総括 および 結論		68
文献		73

緒 論

Amylase はデンプン糖化をはじめ広く工業的に用いられている酵素である。この生産菌の代表的なものに *Aspergillus oryzae*、*Bacillus subtilis* がある。*Bac. subtilis* を液体培養すると対数増殖期の後期から著しく α -*amylase* を生産し、同じ *Bac. subtilis* に属する株の間でもその生産量は1000倍以上異なっている。これら *Bacillus* 属の α -*amylase* の性質は Meyer¹⁾ により初めて結晶化がなされて以来、広く研究されてきている。

Junge²⁾ は液化型 α -*amylase* の分子量を48,700と報告し、Fukumoto³⁾、Tada⁴⁾ は糖化型 α -*amylase* の分子量を47,500、42,000と報告している。

アミノ酸組成も詳しく調べられ、Junge²⁾ により液化型 α -*amylase* がシステイン、システイン残基を含まないのに対し、Tada⁴⁾ は糖化型 α -*amylase* が1つのシステイン残基を含むことを報告した。N末端基の解析も行なわれ、液化型 α -*amylase* がバリンであるのに対し⁵⁾、糖化型 α -*amylase* がスレオニンであることが報告された³⁾。一方C末端基がリジンであることは Kojima⁶⁾ が液化型 α -*amylase* について報告している。

液化型 α -*amylase* が Ca^{++} で安定化されることは Hsiao⁷⁾、Imanishi⁸⁾ により報告されたのに対し、Fukumoto³⁾ は、糖化型 α -*amylase* は Ca^{++} により安定化されないと報告した。

一方 Bac. subtilis の遺伝解析に広く使われている Marburg 株の α -amylase の性質は、Welber⁹⁾ が W23 株と Bac. amyloliquefaciens F 株との比較を行ない免疫反応、電気泳動像が異なることを報告しているにすぎない。

酵素生産の制御の研究は、Escherichia coli を中心として行なわれた。Jacob¹⁰⁻¹¹⁾ は β -galactosidase 合成の調節に異常のある突然変異株を分析し、制御遺伝子¹⁰⁾ の突然変異を起した菌では誘導物質が存在しなくても、 β -galactosidase は合成される。しかもその性質は野生型の菌を誘導して合成させたものと同じであった。Jacob と Monod は β -galactosidase を用いた実験結果に基づき operon 説を提唱した¹⁰⁻¹¹⁾。彼らは operon の一端に存在し、operon 機能の発現に参与する部位を想定し、これを operator と名づけた。そして O^c (operator constitutive) 変異株は β -galactosidase を構成的に合成することを示した。また Jacob¹²⁾ は mRNA への転写の開始に参与する部位、すなわち、operon の読み始めに関係する部位に対し、promotor と名づけた。

このように種々の遺伝子¹³⁾ が β -galactosidase 合成を制御することが明らかになったが、これら調節機構とは別に遺伝子の量によって酵素生産量が支配されていることも報告されている。Novick,

Idoriuchi¹³⁾はテモスタート法により constitutive 株の4倍の β -galactosidase を生産する hyper strain を分離した。

Hyper strain は β -galactosidase の structural gene を重複して持つことが示された。Idarverson¹⁴⁾は Saccharomyces cerevisiae の α -glucosidase 生産量が gene dosage によって支配されていることを報告した。

一方 Bac. subtilis では E. coli の遺伝解析に使用された接合と異なり、形質転換法が利用されている。Spizizen¹⁵⁾は最初に Bac. subtilis Marburg 株を使って栄養要求性の形質転換を行ったが、後に Anagnostopoulou¹⁶⁾らは形質転換の最適条件を決定した。Saito, Miura¹⁷⁾は形質転換 DNA の精製法を改良した。すなわち lysozyme で溶菌後 pH 9.0 の sodium dodecyl sulfate (SDS) を含んだ緩衝液と7エーテルとの混液で脱蛋白することにより形質転換率の高い DNA を分離した。

Coukoulis¹⁸⁾らは Bac. amyloliquefaciens のアルギニン要求性を同種の Bac. amyloliquefaciens に形質転換することに成功したが Marburg 株には形質転換できなかった。

Bac. subtilis は細胞外酵素として protease, α -amylase を分泌する。これら細胞外酵素の生産量も突然変異や形質転換により遺伝的に解析されている。Prestidge¹⁹⁾らは Bac. subtilis 168 株の生産する3種類の proteolytic enzyme を分離し酵素的性質を調べた結果1つは ethylene diamine tetraacetate (EDTA) で阻害される metal protease であり

phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF) では阻害されなかった。2番目はカゼイン及びエステルの両基質に働く serine protease であり、3番目はカゼインを基質として時非常に低い活性しか示さないが エステルに高い活性を持つ esterase であった。後の2つは PMSF で阻害されるが EDTA では阻害されなかった。この16株より protease 生産の増加した変異株 *Apr-97 try 2* を分離し、その生産する protease は metal protease でおおよそ10倍、serine protease でおおよそ2倍増加していることを発見した。その mutation site は形質導入により *his A1* と *arg C4* の間に位置することを報告した。²⁰⁾ また、Levisohnらは制限培地でも胞子形成できる *Bac. cereus*^T の変異株 (MU-1) を分離し、この変異株が protease を高生産することを認めた。この MU-1 株よりさらに フリン要求株を mutagen 処理により分離し、栄養要求性と protease 生産への影響を追跡し、その結果代謝中間体が protease 生産量を制御していることを報告した。

α -Amylase 生産に関連する遺伝子の形質転換や形質導入もすでに試みられており次のような結果が得られている。Isono²¹⁾ は *Bac. stearothermophilus* の DVA を使って amylase 欠損株に amylase 遺伝子の形質転換に成功したのをはじめ、Iijima²²⁾ らは *Bac. subtilis* strain K の α -amylase 生産欠損株に α -amylase 遺伝子を含む SP10 ファージを感染させて α -amylase を生産する

transductantを得ている。Green²³⁾らは Bac. subtilis Marburg 株を使って α -amylase の形質転換を報告し、 α -amylase 生産を catabolite repression する遺伝子も形質転換できた。

Yuki²⁴⁻²⁷⁾らは紫外線照射により Bac. subtilis 168 株の α -amylase 欠損変異株を分離した。これらの株を recipient とした Bac. subtilis を DNA donor とした形質転換の結果これらの α -amylase 遺伝子は allelic であることを認めた。すなわち Bac. subtilis 1088 株を DNA donor に使い、生産量が 1088 株より低い 168 株を recipient とした形質転換により 1088 株の α -amylase 生産量因子が α -amylase の構造遺伝子に密接に連鎖していることを示した。その後 α -amylase 欠損株の fine mapping を行い、 α -amylase の構造遺伝子が arc_{116} , phe_{95} に連鎖していることを報告した。また Marburg 株の生産する α -amylase の電気泳動像がその構造遺伝子の一部に局在する E site により支配されていることも報告している。

Yamaguchi²⁸⁾らは Bac. subtilis Marburg 株より 5 倍多く α -amylase を生産する Bac. natto 1212 株の DNA を用いた形質転換により Marburg 株の α -amylase 生産量が著しく増加するのを認めた。そして α -amylase 生産量支配遺伝子が α -amylase の構造遺伝子に密接に連鎖していることを報告した。

α -Amylase 生産の制御に関しては Kinoshita²⁹⁻³⁰⁾らにより α -amylase に特異的に mRNA の酵素の優劣合成を制御していることも確かめ、その結果を用いて α -amylase 生産の速度式を報告している。

本論文では工業酵素である Bac. subtilis α -amylase 生産のモデルとして遺伝解析に広く用いられている Bac. subtilis Marburg 株を選んだ。この α -amylase の性質を、工業利用されている α -amylase と比較検討を行った。続いて Marburg 株より α -amylase 生産の増加した変異株を用いて、 α -amylase 生産量増加の要因を動力学、遺伝学的に追求し、 α -amylase 生産の制御の解明に努めた。

第1章では Bac. subtilis 168 株の生産する α -amylase を精製し、酵素化学的、免疫化学的性質を液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase と比較検討した。その結果 168 株の α -amylase は液化型 α -amylase とほぼまったく異なり、糖化型 α -amylase と同じ酵素でないが類似することがわかった。

第2章では Bac. subtilis 168 株より α -amylase 生産量の増加した変異株を分離し、その生産量増加が α -amylase に特異的な mRNA の longevity にも酵素蛋白の変化にも依存しないことを明らかにした。

第3章では高生産変異株と 168 株の α -amylase 欠損株の周で形質転換を行い、 α -amylase 生産量を支配する2つの遺伝子が明らかになった。これら2つの遺伝子 (hap, halp gene) はともに α -amylase の構造遺伝子に連鎖せず、hap 遺伝子は α -amylase 生産量を増加させる上に serine protease, metal protease 量を増加させる。halp 遺伝子は α -amylase 生産能を上昇させるが、逆に

2つの *protease* を減少させた。また *Marburg* 株とは由来の異なる、 α -*amylase* 生産量の低い 3215 株との形態転換により、 α -*amylase* の構造遺伝子と連鎖した *P* 遺伝子の存在が明らかになった。

本論文ではこのような構成で記述される。

第 1 章 Bacillus subtilis Marburg 株の 生産する α -amylase の精製と 酵素化学的、免疫化学的性質

第 1 節 緒論

Amylase は生物界に広く認められる酵素であるが、工業生産を目的とした α -amylase の研究は細菌や糸状菌で行なわれている。特にデンプン工業は、この酵素に依存することが大である。この酵素は簡単に精製・結晶化が可能であり、又大量に得ることが出来るため、有機化学、物理化学の研究材料に広く使われている。

Amylase の研究の歴史は古く Meyer¹⁾らは最初に Bac. subtilis の α -amylase を結晶化させた。その後 Aspergillus oryzae³¹⁻³²⁾, Bac. coagulans³³⁾, Aspergillus candidus³⁴⁾, Pseudomonas saccharophila³⁵⁾, Bac. polymyxa³⁶⁾, Bac. macerans³⁷⁾, Aspergillus niger³⁸⁻³⁹⁾, Bac. amyloliquefaciens⁴⁰⁾, Bac. stearothermophilus⁴¹⁻⁴³⁾ で結晶化が報告されている。その中でも Bac. subtilis の α -amylase は最も広く用いられており、デンプン吸着、イオン交換樹脂による脱色、硫酸塩析、アセトン沈殿の一連の操作で簡単に結晶化することが出来る。

Bac. subtilis の α -amylase のアミノ酸組成はシステイン残基を含んでいないのが特長であるが、²⁾
⁴⁴⁾ Bergey's Manual で Bac. subtilis に分類されている Bac. subtilis var. amyloliquefaciens の α -amylase は

1つのシステイン残基を含んでいることがわかって⁴⁾いる。
末端基の研究も行なわれ、2,4-dinitrofluorobenzene
(DNFB)法により Bac. subtilis の α -amylase の N末端が
バリリンであることがわかった。⁵⁾ 一方 C末端はトリチウム標識
法により、リジンと決められた。⁶⁾

Hosui⁷⁾らは、Bac. subtilis α -amylase における Ca と
酵素活性の関係を研究し、Caの除去は活性の消失をもた
らすが、金属の添加により定量的に回復させることがで
きた。そして充分な活性を発揮するためには、1モルの酵
素あたり4原子以上のCaが必要であった。Imanishi⁸⁾らは、
Bac. subtilis α -amylase と Ca との結合を、分光分散、螢
光スペクトル、紫外スペクトルで詳細に検討した結果Caの除去
により酵素の立体配置が不安定になり、この安定化のため
には1モルの酵素当り6gのCa原子が最低必要であることを報
告した。一方 Bac. subtilis 糖化型 α -amylase は EDTA
との反応によって不活性化され、Ca活性化効果が認められた。⁴⁾

Fukamoto⁴⁵⁾らは Bac. amyloliquefaciens の α -
amylase 生産に及ぼす金属イオンの効果を検討し、 $10^{-3} M$ の
 Ca^{++} 、 Sr^{++} 、 Mg^{++} の添加は α -amylase 生産を40%増加
させるが、 $1.5 \times 10^{-5} M$ の Hg^{++} 、 Co^{++} 、 Cu^{++} 、 Zn^{++} を添加
した時酵素合成が著しく阻害されることを示した。

Zn イオンの関係する Bac. subtilis α -amylase の
monomer-dimer 変換は Fischer⁴⁶⁾らにより報告されたが、他
の Amylase でこの現象が見られないことより、Bac. subtilis の

α -amylase に特異的な現象である。その分子量は monomer で 48,900, dimer で 96,900 であることが報告された。⁴⁷⁾ Bac. subtilis の糖化型 α -amylase は Yutani⁴⁸⁾ らにより 41,000 と報告されている。

Bac. subtilis α -amylase は pH 5 ~ pH 12 で安定であり、Taka-amylase と似た性質を示した。⁴⁹⁻⁵⁰⁾ 界面活性剤 sodium dodecyl sulfate (SDS) による変性に対して、Bac. subtilis の α -amylase はかなり安定であり、中性 pH においては 440 モルの過剰の界面活性剤の存在のもとでも元の構造を保っていた。⁵¹⁾

Bac. subtilis の糖化型と液化型の α -amylase の基質特異性を比較したところ糖化型 α -amylase は G_2 (G は glucose, 添字は重合度を示す) から G_{23} の鎖長を持つ matooligo saccharide まで同じような親和性を示した。しかし液化型 α -amylase の親和性は G_{23} より少ない鎖長を持つ oligo saccharide に対して著しく減少した。⁵²⁾ 基質として phenyl- α -maltoside または p-nitrophenyl- α -maltoside を使う場合、糖化型 α -amylase はこの合成基質を分解することができる。そして phenyl- α -maltoside の分解様式を詳細に検討した結果、基質濃度が低い時は phenyl- α -glucoside と glucose に分解し、基質濃度が低い時は phenol と maltose に分解すること示した。⁵³⁻⁵⁴⁾ デンプンを基質として反応したとき最終分解率は糖化型 α -amylase の方が液化型 α -amylase より高い。その分解様式は糖化型 α -amylase においては非還元末端から maltotriosyl unit で分解するのに対し、液化型 α -amylase は maltohexaosyl または maltopentao-

52)
syl unit で分解する。以上の結果は Bac. subtilis の α -
amylase は2つのタイプに分けることができ、1つが液化型 α -
amylase、他は糖化型 α -amylase である。両酵素は、酵素化
学的、物理化学的に異なった酵素であることを示している。

55)
一方 amylase を用いた免疫化学的研究も行なわれ、Bac.
subtilis の液化型 α -amylase は Taka-amylase とは免疫
学的にまったく交差を示さなかった。そして Bac. subtilis 液化
型 α -amylase, Taka-amylase のデンプンを基質として酵素
活性を測定した場合、液化型 α -amylase 抗体、Taka-amyl-
ase 抗体の添加量によって0~70%の範囲で阻害されるのに
対し、小分子の phenyl- α -maltside を基質とすると抗 Taka-
amylase 抗体は Taka-amylase の活性を15%阻害しただけ
であった。

以上のように多くの研究がなされたにもかかわらず、遺伝学に
最も広く用いられている、形質転換可能な Marburg 株の α -amyl-
ase の研究は少ない。この章では Bac. subtilis 168 (Mar-
burg 株) の α -amylase の精製方法、熱感受性、最適 pH、
電気泳動、基質特異性等の酵素化学的性質、分子量の測定、
免疫化学的性質を Bac. subtilis 液化型 α -amylase、糖
化型 α -amylase と比較検討した。

第 2 節 実験方法及び材料

使用菌株 Bac. subtilis 168 try⁻ 株を用いた。

培地組成及び培養条件 前々培養には 500ml の

三角フラスコに100 mlの nutrient brothを含んだ培地を用いた。 nutrient brothの組成は肉エキス1%、ホリベプトン1% Nacl 0.2%、pH 7.0である。培養温度は37℃で、120 rpmの振盪培養器を使い、1夜培養を行った。前々培養細胞の一部を上述と同じ培地に消泡剤を添加した2ℓ坂口フラスコ(実容1ℓ)に植菌を行った。前培養を16時間～24時間続けた後、醗酵タンクに添加した。醗酵タンクは丸菱社の100ℓ醗酵タンクで、その中に30ℓの培地を加えた。培地組成は2%肉エキス、1-5%の可溶性デンプン、0.05%の消泡剤("silicon", 信越化学製品)、pH 7.0である。前培養を終った0.5～1ℓの培養液を植菌し、37℃、1vvm、200 rpmの操作条件で培養を2日間行なった。

α-Amylaseの測定法 α-Amylase活性は⁵⁶⁾Fluwaによって記述された方法に準じた。すなわち(i)基質として1N-NaOH 4mlに200mgのアミロース(Sigma Chemical Company)を加え、1夜氷室に放置し、水で80mlに稀釈してから1Nの酢酸でpH 5.3に調整し、後全量を100mlとした。(ii)呈色試薬として10%のKIを含む1% I₂溶液(密栓保存)を使用の都度蒸留水で200倍に稀釈し、3時間以内に使用した。(iii)測定には2本の試験管AとBに(Bは対照実験)0.2%アミロース溶液1mlずつをホールヒンペットを用いて加え、0.2Mの酢酸緩衝液(pH 5.3)を0.5ml加え、40℃の恒温槽で約5分間予温してからAには酵素液0.5mlを、Bには水0.5mlを加えて反応を開始し、30分後に両試験管に5mlの0.5N酢酸を加

えて反応を停止した。この液のうち 0.5 ml をとり、5 ml の 0.005% ヨード溶液中に入れてから、700 m μ のフィルターを用いて水を対照として 1 cm のキュービットで対照実験及び反応液の吸光係数を測定した。活性度単位は 40°C、30 分間に blue value (700 m μ の吸収) を 10% 低下せしめるアミロースの mg 数 (0.1% アミロースの ml 数) で表わした。

Maltosidase 活性の測定法 Maltosidase 活性は 1 ml の α -amylase 溶液、1 ml の 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 1 ml の p-nitrophenyl- α -maltoside 溶液 (40.5 OD₃₁₀) を含む反応液を 40°C、20 分間酵素反応させた。5% の炭酸ソーダの添加により反応を停止させ 410 m μ の吸収を測定した。活性度単位として、40°C、1 分間当り 0.33×10^{-3} OD₄₁₀ の変化を主いる酵素量を任意に 1 単位と表示した。

蛋白の定量 蛋白量は標準として卵白アルブミンを使用しながら、Beckman DB 分光光度計で 280 m μ の吸収を測定した。

⁵⁷⁾ P-Nitrophenyl- α -maltoside 合成法 (PNPM)

(1) Octaacetylmaltose の合成 20g の無水マルトースに 20g の溶融した酢酸ソーダを加え、おだやかに加熱した。急激な最初の反応が終った後さらに、2 時間湯浴中 100°C で加熱後、粉碎した氷上に注ぎ、更に水を加え、生じた黄褐色のオイルを冷蔵庫に 1 夜保持した。濾過によって分離できる粗製品をクロロホルムに溶かし、水でよく洗滌した後、無水の塩化カルシウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で溜去して生じた

固形物を熱メタノールに溶かし、濾過後再結晶させた。この結晶の *m.p.* は 154°C にあった。(2) *heptaacetyl phenyl- α -maltoside* の合成 68g の *octaacetyl maltose*, 57g の γ -*ヒール* 10g の溶融 SnCl_2 を激しく振盪しながら、2時間半湯浴中 100°C で加熱した。冷却後生じた褐色のオイルを水に懸濁し、水と順々に接触させることにより、ベンゼン層に含まれる褐変物質を分離することができた。無色になった時、無水の塩化カルシウムで脱水を行い、溶媒を減圧下で溜去し、100ml のエタノールから結晶化した。結晶は10%のジエキサンを含むエタノール-ジエキサン混液から再結晶させた。この結晶の *m.p.* は 170°C にあった。

(3) *heptaacetyl- p -nitrophenyl- α -maltoside* の合成

20ml の氷酢酸に10ml の無水酢酸を加えた混合液に5g の *heptaacetyl- α -maltoside* を加え、25g の濃硫酸(95%)に25g の氷酢酸を加えて混合液を、冷却下撈拌しながらさらに加えた。次に5g の硝酸、10ml の氷酢酸の混合液を一滴ずつ加えてゆき、この際反応液は強撈拌を行った。次に室温に4時間放置し、大量の水と氷を加えた。数分後に白い粉末沈殿を生じたので分離し、水洗後無水の塩化カルシウム上で乾燥した。この物質の *m.p.* は 181°C にあった。元素分析値は測定値 炭素 50.15%、水素 4.93%、窒素 1.87% にあった。 $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_{20}\text{N}_1$ とする理論値は炭素 50.7%、水素 5.16%、窒素 1.85% である。(4) *p-Nitrophenyl- α -maltoside* (pNPM) の合成 *heptaacetyl- p -nitrophenyl- α -maltoside* 10g を γ -*ヒール*-700 γ -*ヒール* (1:1)

に溶解し、アンモニアガスを導入して飽和させた。室温で4時間放置し、アンモニアと溶媒を減圧下で溜めさせた。シロップ状の残渣を少量の無水アルコールに溶解し、無水エーテルを加えて沈殿を生じさせた。この操作をくりかえし精製した。最後にクロホルム-メタノールの段階的溶出法を用いて、シリカゲルのカラムフロートグラフィにより精製した。*p*-Nitrophenyl- α -malto-sideのエタノール-ジオキサン(9:1)による結晶化は成功しなかった。又 CH_3ONa による脱アセチル化は黄緑色が反応液に顕著に生じ、脱色及び結晶化が困難であった。ここではアンモニアによる脱アセチル化方法を使用した。最終物質は水溶液310 μm に吸収極大値を持ち、*Bac. subtilis* 糖化型 α -amylase に作用させた時、 pH 7.6 以上で410 μm に極大値を持つ *p*-nitrophenol を遊離した。この *p*NPM の赤外吸収パターンを Fig. 1-1 に示す。

α -Amylase の精製方法 醗酵タンクで培養した培養液はシャープレス、ローターにより 10,000 rpm で連続遠心分離を行った。上澄液はデンプン吸着を行うために4°C に冷却し、可溶性デンプンを 10g/l の濃度で加えた。生じた沈殿はシャープレス遠心分離機により遠心分離した。このペレットを少量の0.1M 酢酸緩衝液(pH 7.0)に溶解させ、酵素反応をさせるために37°C、1時間保温した。生じた沈殿はサバル社製遠心分離機(10,000 rpm)により除いた。

粗酵素液は80%飽和に硫酸を加えることにより、硫酸塩析を行った。生じた沈殿は5mM 酢酸緩衝液(pH 7.0)に溶解

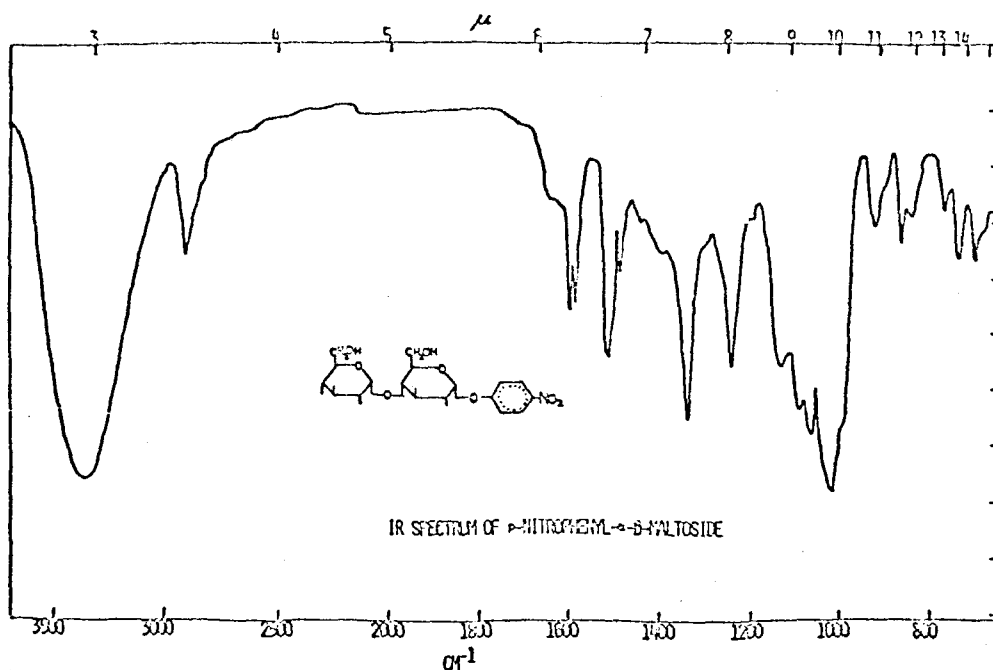


Fig. 1-1 IR spectrum of p-nitrophenyl- α -D-maltoside

させ、同じ緩衝液に対して透析膜を用いて、4℃、1夜透析を行なった。透析した酵素液は凍結乾燥し、4℃にデシケーター中で保存した。

カラムクロマトグラフィー 凍結乾燥した酵素の一部は2mlの0.1M 酢酸緩衝液(pH7.0)に溶解させ、Sephadex G-200のカラム(12mm中×500mm)にchargeし、蒸留水で流出させた。活性のあるフラクションは集めて凍結乾燥した。この酵素はさらにDEAE-Sephadex カラムにより分画した。この

カラムは前もって $0.02M$ Tris-塩酸緩衝液で平衡化しておき、流出は食塩の直線勾配濃度 ($0-1.0M$) を含む上述の緩衝液で行なった。酵素活性部分のフラクションを集め、透析後再度凍結乾燥させた。酵素液は Sephadex G-100 のカラム72マトグラフィーにより純粋なまでに精製した。

寒天ゲル電気泳動 寒天ゲル電気泳動は Ogita⁵⁸⁾ の記述した方法に準じて行なった。すなわち $0.7g$ のアガロースと $0.7g$ の polyvinyl pyrrolidone と $0.0125M$ の酢酸緩衝液 ($pH 6.3$) $100ml$ に加熱溶解させた。Polyvinyl pyrrolidone は electro-endosmotic flow を少なくする為に用いた。溶解した寒天液はプラスチック製の泳動槽に流し入れた。酵素標品としては、精製酵素又は nutrient broth で1夜培養した培養上澄液を用いた。酵素サンプルは濾紙に吸着させ (濾紙 $1 \times 10mm^2$) その濾紙を陽極から $6.5cm$ の距離に静かにのせ、 $4^\circ C$ 、30分間寒天ゲルへ酵素を浸透させた。濾紙を注意深くはぎとった後泳動を開始した。電圧は $200V$ 一定で行い、2時間の泳動後寒天ゲルは1%のデンファン溶液に数分間浸した後、 $37^\circ C$ で1時間から2時間保温した。それから $0.1N$ ヨード溶液をゲル表面に流した。この操作により α -amylase が存在する部分は、他の青色の部分に対し透明であった。

ディスクゲル電気泳動 Davis⁵⁹⁾ の方法により行なった。ゲルは standard gel をもちい、 $pH 9.5$ の Tris-Glycine 緩衝液中で泳動した。泳動時間は $30 \sim 40$ 分 電圧はゲルカラム1本当り $5mA$ を用いた。泳動の終了にゲルは、アミノブラックを含む

酢酸中で1時間染色した。染色の終わったゲルは7%の酢酸を満たした泳動槽を使って、電気泳動による脱染色を行なった。

pH効果及び熱安定性 pH感受性はpH4.5~pH5.5に0.1M酢酸緩衝液、pH5.5からpH8.0に0.1M磷酸緩衝液を使用した。熱安定性は65℃、0.2M酢酸緩衝液(pH5.3)中で求めた。5分間隔で酵素液を冷却して試験管中にサンプルリングし、 α -amylase活性を測定した。

分子量の測定 Sephadex G-200でのゲル濾過法により分子量を求めた。ゲルカラム(2.6×86cm)に標準サンプルとして cytochrome C (分子量12,400)、chymotrypsinogen A (分子量25,000)、ovalbumin (分子量45,000)、albumin (分子量67,000)、hexokinase (分子量96,600)、 γ -globulin (分子量160,000)、apoferritin (分子量480,000)を加えて0.1M磷酸緩衝液(pH6.8)で流出させた。

α -amylase抗体 Matsuoka⁵⁵⁾の方法に従って α -amylase抗体を得た。すなわち兔に抗原を注射した。初回の免疫には7mgの酵素を0.3%のフェーブルを含む生理食塩水に溶かし、続いて Freund の incomplete adjuvant (DIFCO社製)を滴下しながら注射器でよく混合した。2時間程度充分混合したのち、このエマルジョンを兔の後肢、背部、頸部5~6ヶ所に分割して投与した。5週間後 incomplete adjuvant とともに背部皮下2ヶ所に投与した。さらに4週間後同様の免疫操作をくりかえし。その後10日目に全採血した。全採血以前に血清をサンプリングし、試験管内で沈降反応を行い、抗体が充分つくられているか確かめた。

試験管内での沈降反応は村田式試験管に約1cmの高さまで、 α -5%のアラビアゴム-生理食塩水で稀釈された抗体を加え、続いて α -amylase溶液(1mg/ml)を約1cm高くなるように抗体の上に静かにのせる。室温で30分間、60分間、120分間放置し、界面に沈殿がまじっているかを確かめたのち、原血清からうっ稀釈液で沈殿をまじる最高稀釈度を抗体の活性単位とすると、2匹の兔のうち1匹は32単位、他は16単位であった。全採血を終った血清はおよそ30分間、 37°C に保温し、血液凝固を促進させた後血漿を管壁よりはがし Separade (Hutco International, USA社製品)を分離補助剤として加えて3,000rpmで遠心分離を行い、血清を得た。血清は保存に際してNaN₃を0.1%になるように加え、 4°C で保存した。

抗原抗体反応 抗原抗体反応は Luchterlony plate⁶⁰⁾上で行なった。スライドガラス上に、アگار-ス1%とNaN₃0.1%を0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.0)に溶かした溶液を厚さ1mmになるように静かに注ぐ。固まった後、スターレパンチで穴をあけた。

第3節 結果

(1) Marburg株 α -amylaseの精製 Bac. subtilis
168 try⁻株によって生産される α -amylaseの精製方法は第2節の実験方法に従って行なった。デンプン吸着、硫酸塩析、透析により部分精製した酵素は凍結乾燥を行い次に Sephadex G-200のカラムクロマトグラフィーで精製した (Fig. 1-2)。

蛋白のピークはフラクション13、34、45に認められたが酵素活性のピークはフラクション34に相当した。その活性を持つフラクションを集めて凍結乾燥を行なった。続いてDEAE-Sephadex A-50のカラムクロマトグラフィーを行なった。蛋白酵素

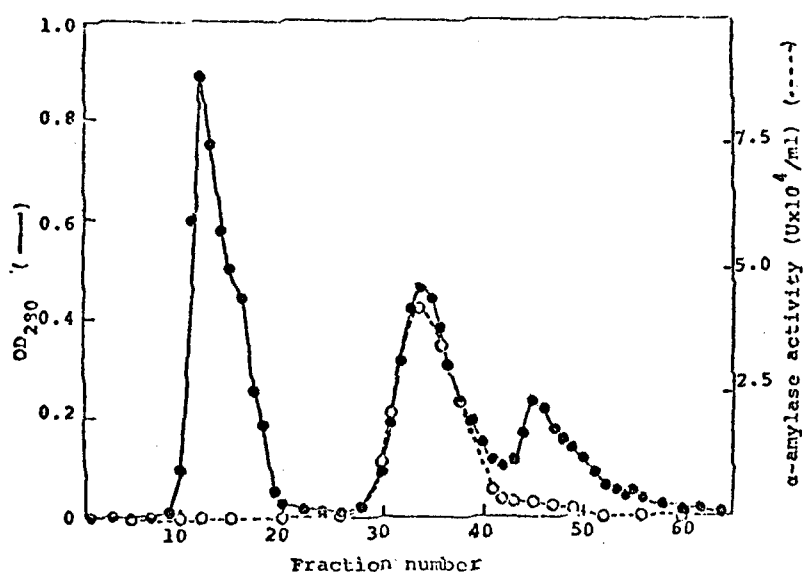


Fig.1-2 Chromatography of α -amylase produced by 168 strain on a column of Sephadex G-200.

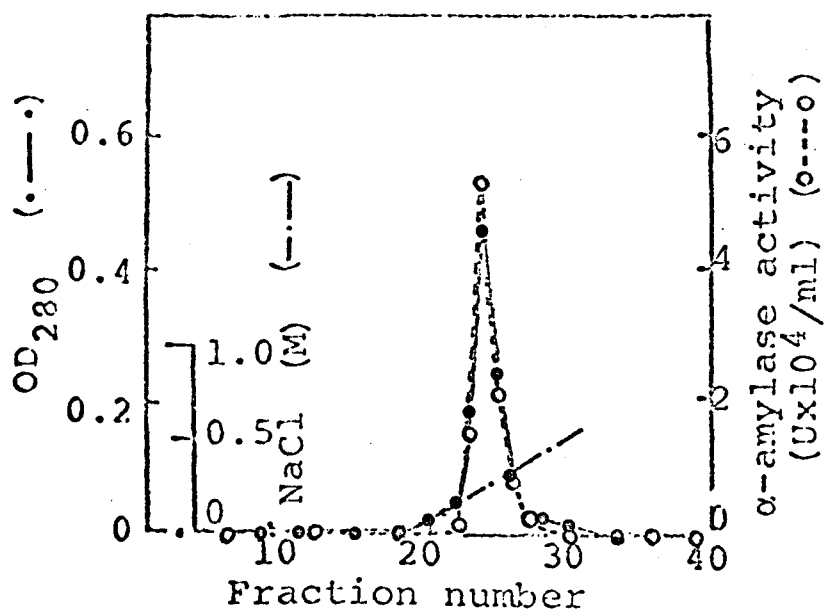


Fig. 1-3 Chromatography of α -amylase produced by 168 strain on a column of DEAE-Sephadex A-50

活性とも食塩濃度の25Mで流出した。比活性はほとんど一定値を与えた (Fig. 1-3)。以上の精製過程をまとめたのが Table 1-1 である。そして精製酵素の比活性は $OD_{280m\mu}$ 当り 120,000 単位であった。

Table 1-1 Purification procedure of α -amylase

Step	Volume (ml)	Protein (OD ₂₈₀ /ml)	Enzyme activity (units/ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/OD ₂₈₀)
Crude extract	3×10^4		1830	5.4×10^7	
Starch adsorption	1780	4.5	10200	1.8×10^7	2.3×10^3
Ammonium sulfate precipitation	75	17.3	1.5×10^5	1.2×10^7	8.5×10^3
Dialysis	95	12.2	1.2×10^5	1.1×10^7	9.2×10^3
Sephadex G-200 gel filtration		0.25	2.3×10^5		9.0×10^4
DEAE-Sephadex ion- exchange gel filtration		0.46	5.3×10^5		1.2×10^5

A typical purification data with the 168 strain.

(2) 酵素化学的性質

精製酵素は Davis の方法⁵⁹⁾に従ってホリアクリル アミド・デイズ
ゲル電気泳動を行なった。Fig. 1-4 に電気泳動像を示し
た。

次に酵素活性に及ぼす pH の効果を検討した。pH 4.5
から pH 7.5 までプロットしたところ、最適 pH は 5.5 であった
(Fig. 1-5)。

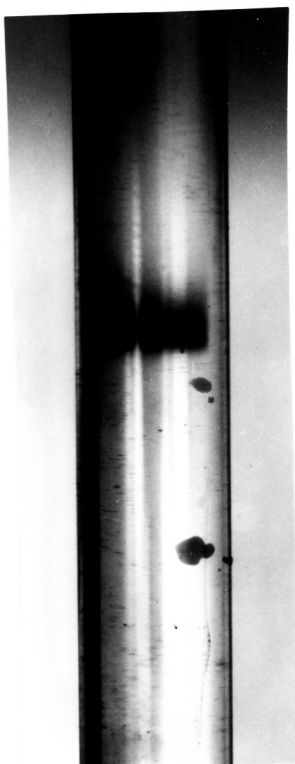


Fig. 1-4 Disc gel
electrophoretic
pattern of 168 α -
amylase

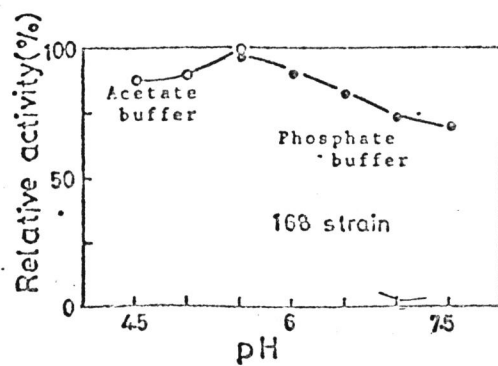


Fig. 1-5 pH activity
curve of α -amylase
produced by strain
168

精製した168株 α -amylaseの65°Cでの熱変性時間経過を示したのがFig.1-6である。比較対照として液化型 α -amylase(大和化成工業製品)、糖化型 α -amylase(生化学工業製品)を用いた。液化型 α -amylaseは40分間の熱処理で10%しか活性を失わないのに対し、Marburg株の α -amylaseは20分間で85%失活した。糖化型 α -amylaseはMarburg株の α -amylaseより熱感受性で20分間で96%失活した。

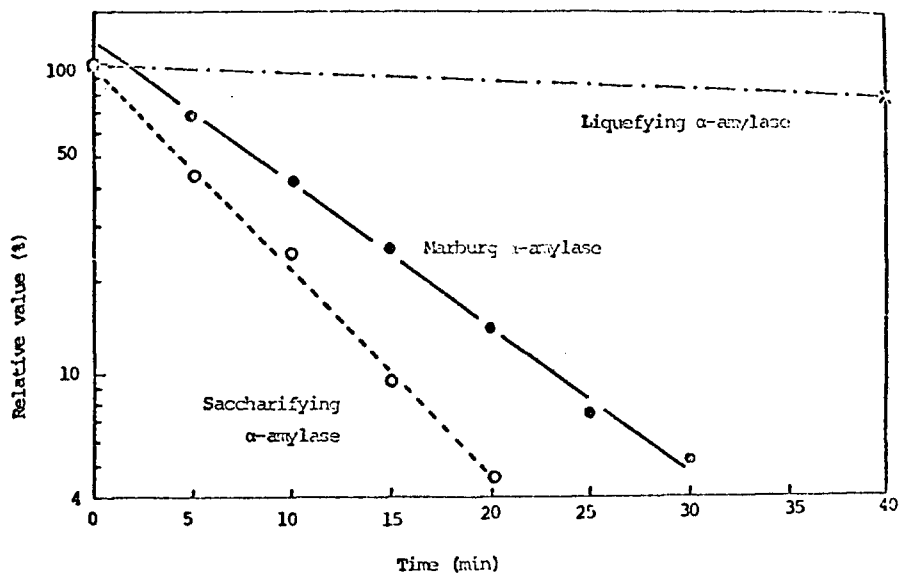


Fig.1-6 Heat stability of Marburg α -amylase, saccharifying α -amylase, and liquefying α -amylase at 65°C.

それゆえ糖化型 α -amylase と Marburg 株の α -amylase はかなり熱感受性が類似し、一方液化型 α -amylase とは非常に異なることが示された。

基質として可溶性デンプンを使った時と、*p*-nitro-phenyl- α -maltoside を使った時の活性を比較したところ、Table 1-2 に示すように、Marburg 株の α -amylase は糖化型 α -amylase と非常によく似た値を与えた。液化型 α -amylase は PNPM に対する親和性が著しく低かった。

Table 1-2 Comparison of amylolytic and maltosidic activities of bacterial α -amylases

α -amylase	Enzyme conc. (mg/ml)	Maltosidic activity (U/ml)	Amylolytic activity (U/ml)	Ratio*
Liquefying type	1	2.22	2.07×10^5	1.07×10^{-5}
Saccharifying type	1	2.50×10^4	1.51×10^5	1.65×10^{-1}
<i>Bac. subtilis</i> 168		78.6	468	1.68×10^{-1}

* maltosidic activity per amylolytic activity

次に Marburg 株の α -amylase、液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase の寒天ゲルでの電気泳動像を示したのが Fig. 1-7 である。pH 6.3 では Marburg 株の α -amylase

は液化型 α -amylase よりも陰極に速く移動するが、糖化型 α -amylase は逆に陽極に移動した。

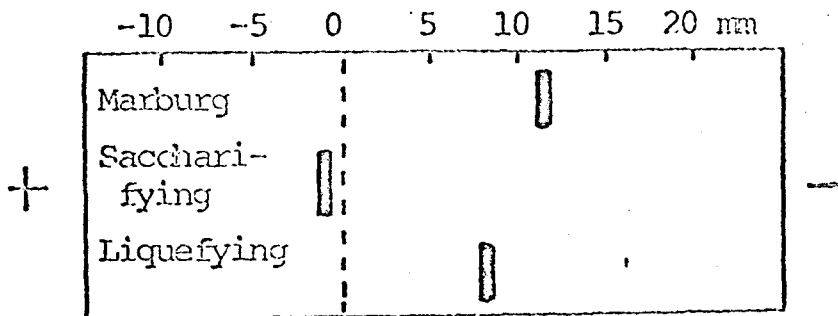


Fig. 1-7 Agar gel electrophoretic pattern of Marburg α -amylase; saccharifying and liquefying α -amylases.

さらに Marburg 株の α -amylase の分子量を Sephadex G-200 のゲル濾過法で測定した。 α -amylase はカラムフラクション 45 番目にピークを持った (Fig. 1-8)。別々に charge した 7 つの標準蛋白の流出フラクション番号より各々の V_e/V_0 を求め、これを分子量の対数に対してプロットしたのが Fig. 1-9 である。Chymotrypsinogen A (分子量 25,000) から hexokinase (分子量 96,500) の間で、直線性が得られた。Marburg 株の α -amylase の V_e/V_0 値もこの直線に対応させると、

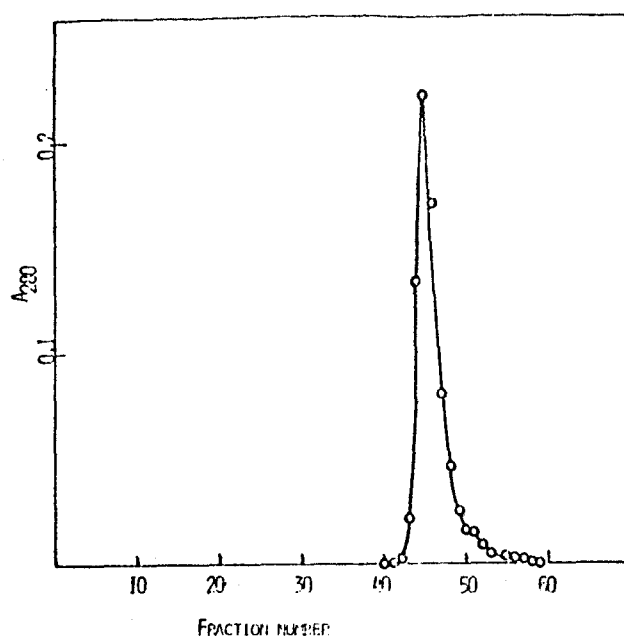


Fig. 1-8 Chromatography of α -amylase produced by 168 strain on a column of Sephadex G-200

ovalbumin(分子量 45,000) と albumin(分子量 67,000) にはさまれ Marburg 株の α -amylase の分子量は 53,000 と推定された。

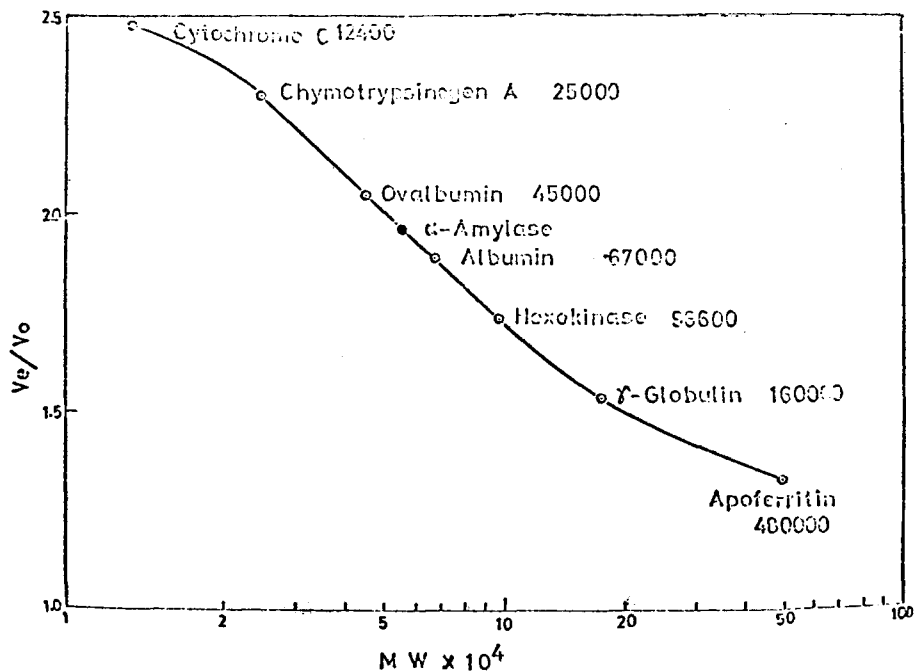


Fig. 1-9 Estimation of the molecular weight of purified α -amylase from a Marburg strain by Sephadex G-200 gel filtration

(3) 免疫化学的性質

Marburg 株の α -amylase、液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase の免疫化学的性質を比較したのが Fig. 1-10 である。Marburg 株の α -amylase の抗体は原血清のまま中央の溝に 10 μ l 加えた。Marburg 株の α -amylase

は溝1及び4におのおの $1000\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えた。糖化型 α -amylaseは溝2及び5に $1000\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ 液化型 α -amylaseは溝3及び6に $1000\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ 加えた。各 α -amylaseはおのおの $10\mu\text{l}$ 使用し、 4°C 16時間後にOuchterlony plate⁶⁰⁾に現われに沈降線は、液化型 α -

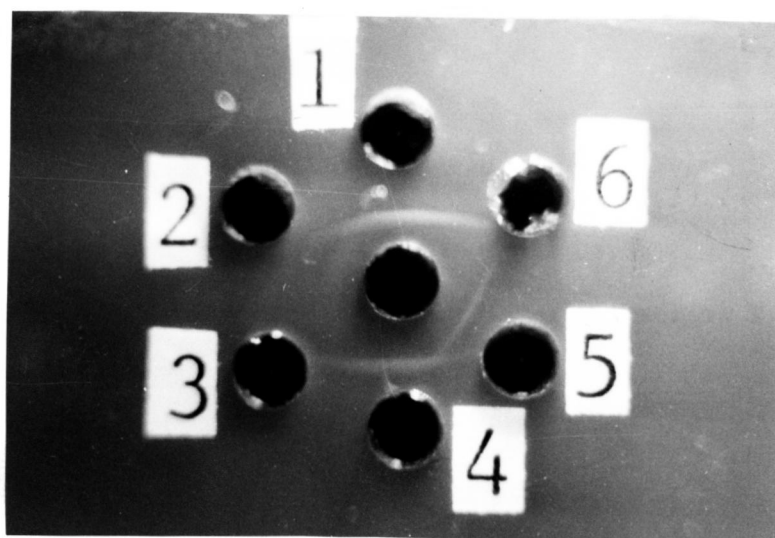


Fig. 1-10 Immunological comparison of Marburg α -amylase and saccharifying and liquefying α -amylases

amylase には認められず、糖化型 α -amylase と Marburg 株の α -amylase に認められた。そして Marburg 株 α -amylase と糖化型 α -amylase の沈降線の交差点に spur 形式が認められることより、Marburg 株の α -amylase と糖化型 α -amylase には共通する抗原決定基が存在するがその他に Marburg 株の α -amylase 独自の抗原決定基が存在することがわかった。

以上の結果より Marburg 株の α -amylase は液化型 α -amylase とは非常に異なり、糖化型 α -amylase とは類似するが同一の酵素でないことがわかった。

第 4 節 考 察

Bac. subtilis 168 (Marburg 株) の生産する α -amylase の分子量をゲル濾過法により 53,000 と決定した。この値は液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase の分子量と異なっている。すなわち液化型 α -amylase の分子量は Junge⁵¹⁾ により 48,700 と報告されており、一方糖化型 α -amylase の分子量は Fokumoto⁵²⁾、Toda⁵³⁾ によりそれぞれ 47,500、42,000 と報告されている。

Marburg 株の α -amylase の最適 pH が 5.5 に対し Yoshida⁶¹⁾ らは糖化型 α -amylase の最適 pH を 5.4、Hagihara⁶²⁾ は液化型 α -amylase の最適 pH を 5.9 と報告した。このことより pH の影響に関して Marburg 株の α -amylase は糖化型 α -amylase と類似した性質を示すと思われる。

熱安定性を調べた結果、液化型 α -amylase は Marburg

株の α -amylase に較べ著しく安定であり、一方糖化型 α -amylase は Marburg 株の α -amylase よりやや不安定であつた。

Marburg 株の α -amylase が糖化型 α -amylase に類似しているもっとも顕著な根拠は p -nitrophenyl- α -maltoside 及び可溶性デンプンを基質とした際に得られる活性の比である。Marburg 株の α -amylase と糖化型 α -amylase は p -nitrophenyl maltoside に対し、同じような高い親和性を示したのに対し、液化型 α -amylase は 10,000 倍も低い親和性を示した。

このように類似している Marburg 株の α -amylase と糖化型 α -amylase も寒天ゲルでの電気泳動 (pH 6.3) ではまったく異なり、Marburg 株の α -amylase が陰極方向に液化型 α -amylase より速く移動したのに対し、糖化型 α -amylase は陰極に移動した。

さらに Marburg 株 α -amylase を兔に注射して得られた抗体を使って、Marburg 株 α -amylase、糖化型 α -amylase、液化型 α -amylase と Ouchterlony plate⁶⁰⁾ 上で抗原抗体反応をさせたと、液化型 α -amylase はこの抗体とは何ら交差反応を示さなかったのに対し、糖化型 α -amylase は明瞭な沈降線を示した。この糖化型 α -amylase と Marburg 株 α -amylase を隣接した溝に入れると、両酵素が同じ抗原決定基を持つならば沈降線は融合し、両酵素がまったく異なるならば沈降線は交差するはずである、その結果 Marburg 株の α -amylase の沈降線のみが糖化型 α -

amylaseの沈降線を横切る spur を形成した。これは Marburg 株の α -amylase が糖化型 α -amylase と類似した抗原決定基とともに Marburg 株 α -amylase 独自の抗原決定基が存在することを示唆している。

以上の結果 Marburg 株の α -amylase は液化型 α -amylase とはまったく異なり、糖化型 α -amylase とは同じではないけれども類似すると考えられる。

この結論は Bac. subtilis の α -amylase の遺伝学的データによっても支持される。Marburg 株の形質転換は Marburg 株同志又は糖化型 α -amylase 生産株に対して可能であり液化型 α -amylase 生産株に対しては成功していない。これは酵素の異性による構造遺伝子の違いにより、recombination が不可能なのかもしれない。

第 5 節 要 約

Bac. subtilis Marburg 株中代表的 1 株である 168 try の生産する α -amylase を、DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー、アクリルアミド・ディスクゲル電気泳動で単なピークを与えるまでに精製した。そして Marburg 株の α -amylase を液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase と比較して次のような結果を得た。

- (1) Marburg 株 α -amylase の分子量は糖化型 α -amylase で報告されている $47,500^{3)}$ 及び $42,000^{4)}$ 、液化型 α -amylase で報告されている

48,700²⁾より大きく、53,000であった。

- (2) pH 6.3での冬天ゲル電気泳動ではMarburg株の α -amylaseは液化型 α -amylaseより速く陰極側へ移動したのに対し、糖化型 α -amylaseは陽極に移動した。
- (3) 熱感受性ではMarburg株の α -amylaseは液化型 α -amylaseより極めて不安定であるが糖化型 α -amylaseよりやや安定であった。
- (4) Marburg株の α -amylaseの最適pHは5.5でこれは液化型 α -amylaseで報告されている最適pH 5.4に近い値を示した。
- (5) 可溶性デンプンの加水分解活性に対するp-nitrophenyl- α -maltosideの加水分解活性の比は糖化型 α -amylaseと液化型 α -amylaseとでは 10^4 倍違うがMarburg株の α -amylaseは糖化型 α -amylaseとよく一致を示した。
- (6) 抗原抗体反応では、液化型 α -amylaseはMarburg株の α -amylaseの抗体と交差反応を生じないのに対し、糖化型 α -amylaseは明瞭な沈降線を現わした。Marburg株の α -amylaseの沈降線は糖化型 α -amylaseの沈降線を横切りopurを形成した。

これらの結果より Marburg 株の α -amylase は液化型
 α -amylase とはまったく異なり、糖化型 α -amylase と
はかなり類似している。

第 2 章

α -Amylase 高生産株の分離と α -Amylase 生産の速度論的解析

第 1 節 緒 論

微生物は種々のレベルで細胞内、細胞外酵素を生産する。そして酵素生産量が遺伝的支配を受けていることは Jacob と Monod⁽¹⁰⁻¹¹⁾ による *Escherichia coli* の β -galactosidase を用いた実験結果に基づき オペロン説を提唱した。その後 Jacob⁽¹²⁾ はこの理論をさらに発展させて mRNA 合成の開始点である promoter gene を仮定した。一方 Novick⁽¹³⁾ は *E. coli* の β -galactosidase 生産量の増加した変異株をケモスタットを使って分離し、hyper strain と名づけた。この株は β -galactosidase の構造遺伝子を重複して持ち、遺伝子の重複の数により支配を受けていることを示した。

Halvorson⁽¹⁴⁾ は酵母の α -glucosidase 生産が gene dosage により支配されていることを報告した。

酵素生産量を増加させることは工業的な意味からも重要である。しかしながら分子生物学に基づいてこの分野の研究は少ない。この章では *Bac. subtilis* Marburg 株より α -amylase 生産の増加した変異株を分離し、この増加が α -amylase に特異的な mRNA の長寿命に依存するものかを Kinoshita⁽²⁹⁻³⁰⁾ らの生産速度式を用いて検討した。すなわち長時間後の酵素生産量は次式で表わすことができる。

$$E = k \int_{t-\theta}^t X \cdot dt \quad \text{----- (1)}$$

X : t 時間の菌体量 θ : 特異的な mRNA の平均
寿命

k : productiveness constant

(1) 式が成立する仮定として (i) 単位菌体が 1 世代に一定量の mRNA を生産する。 (ii) 酵素生産は特異的な mRNA 量に比例する。 (iii) α -amylase 生産は Kinoschita²⁹⁻³⁰⁾ の報告している長寿命 mRNA 量に依存することである。 θ が充分安定であれば E と $\int_0^t X \cdot dt$ のプロットは $t - \theta > 0$ になるまで直線を与える。

この理論をつかって生産量増加の現象を式に示さねば θ , k によって表現した。 k が変化する場合に以下のような要因が考えられる。 (i) 酵素の比活性に影響するような酵素の α 1 酸配列の変化 (ii) 単位菌体が単位時間に生産する α -amylase に特異的な mRNA 量の増加 (iii) 特異的な mRNA の translation 効率の変化などである。

第 2 節 実験方法および材料

使用菌株 Bac. subtilis 168 try⁻ 株を原株とした。原株より α -amylase 生産量の増加した変異株を逐次分離し最初の変異株を 128、次の変異株を 196 と名づけた。

培養条件 前培養に nutrient broth (肉エキス 1%、ホリペプトン 1%、食塩 0.2%、pH 7.0) 5ml を含んだ試

試験管(18mm中)を使った。37°C、18時間の振盪培養後、
nutrient broth 50mlを含む500ml三角フラスコに接種
した。接種菌体量は新しい培養液で660mμの吸収が
0.05になるように調整した。37°C、120rpmで振盪培養を行い、
適時サンプルを取り、菌体量、α-amylase活性を測定した。

α-Amylase 測定法 ⁵⁶⁾ α-Amylase 活性は Finza
の手法に準じた。(前章参照)

寒天ゲル電気泳動 Ogita の記述した ⁵⁸⁾ 手法に準
じて行った。(前章参照)

ディスク・ゲル電気泳動 Davis の ⁵⁹⁾ 手法に従った(前章参照)

pH 効果及び熱安定性 α-Amylase に及ぼす pH
の効果は pH 4.5 ~ pH 5.5 に 0.1M 酢酸緩衝液を pH 5.5 ~
pH 8.0 に 0.1M 磷酸緩衝液を用いた。熱安定性は 65°C、
0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 中で行った。

抗原抗体反応 スライドガラス上にアگارースゲルを
作成し、パンチーで溝をつけた Ouchterlony plate をつか
った。

第 3 節 結果

(1) α-Amylase 高生産株の分離

Bac. subtilis 168 try⁻ 株を nutrient broth に 1.2%
寒天を添加した固体培地で 1 週間培養し、胞子を得た。
胞子はガラス棒で ^{1.5)} かき取り、Spizizen の最少塩培地 (
K₂HPO₄ 14g, KH₂PO₄ 6g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, (NH₄)₂SO₄
2g, Na-Citrate 1g in 1000ml of H₂O) に懸濁し、

充分洗條を行なった。次に最小塩培地に 10^8 の菌濃度になるように懸濁し、懸濁液をシャーレに移し紫外線ランプにより 10^{-3} の死滅率を与えるような光量も照射した。この胞子懸濁液は加熱活性化処理を行わず、適当に稀釈し nutrient agar と 0.2% 可溶性デンプンを含む培地に平板培養した。1夜培養後 colony の周囲に 0.14% のヨードを流し

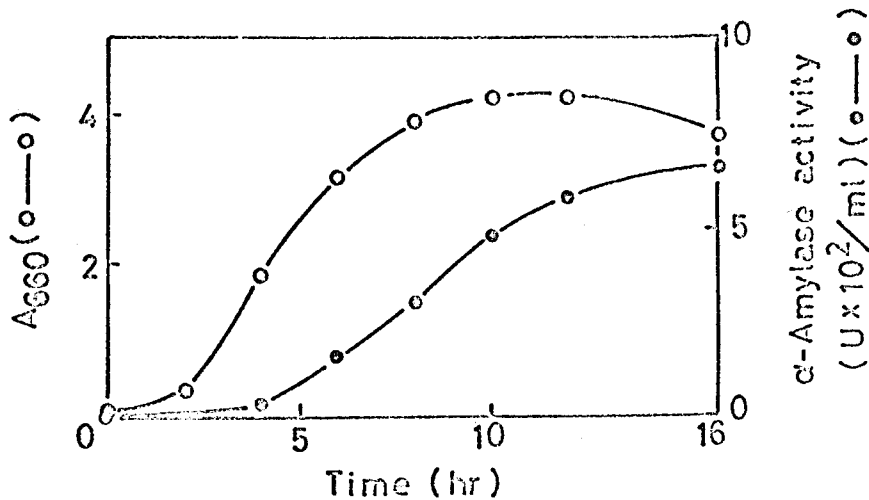


Fig.2-1 Time course of α -amylase production by Bac. subtilis 168.

hallo (ヨードデンプン反応による青色に較べて colony の周囲に円形に広がった呈色されない部分) の大きな colony を分離し、単細胞分離を行なった後 スラント で保存した。分離した数株を nutrient broth で液体培養を行い、生産量の高い 128 株を得た。次に 128 株の胞子を使い 上と同じ

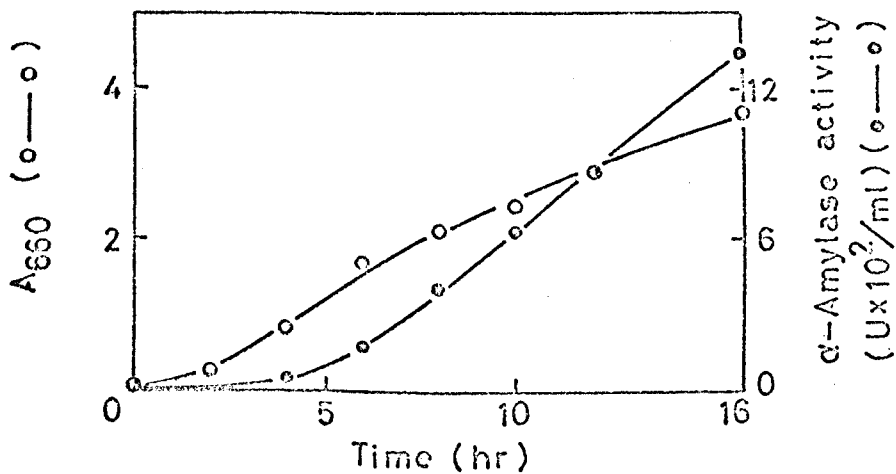


Fig. 2-2 Time course of α-amylase production by Bac. subtilis 128.

処理を行ない α-amylase 生産量の増加した 196 株を得た。128 株は原株の 168 株と比較して およそ 2 倍の生産量を示し、一方 196 株は原 168 株の 3~4 倍の生産量を示した。Fig. 2-1, Fig. 2-2, Fig. 2-3 に 168 株、最初の変異株である 128 株、128 株からの変異株を

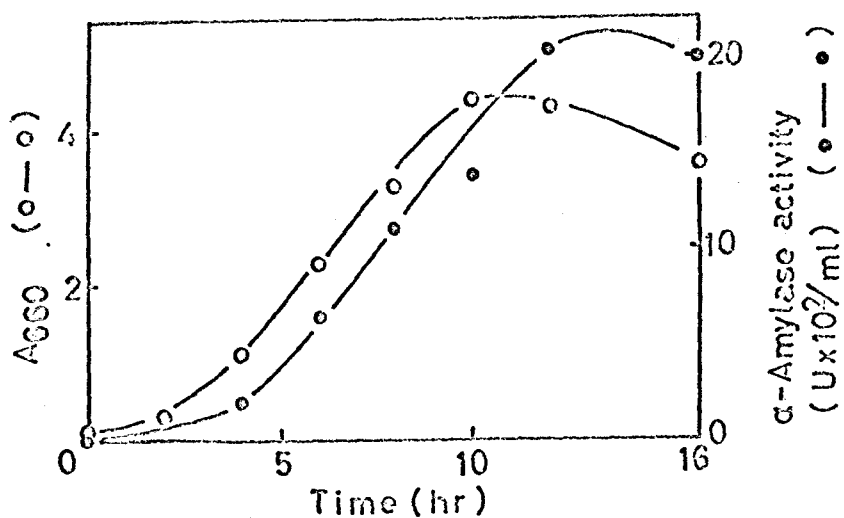


Fig.2-3 Time course of α -amylase production by Bac. subtilis 196.

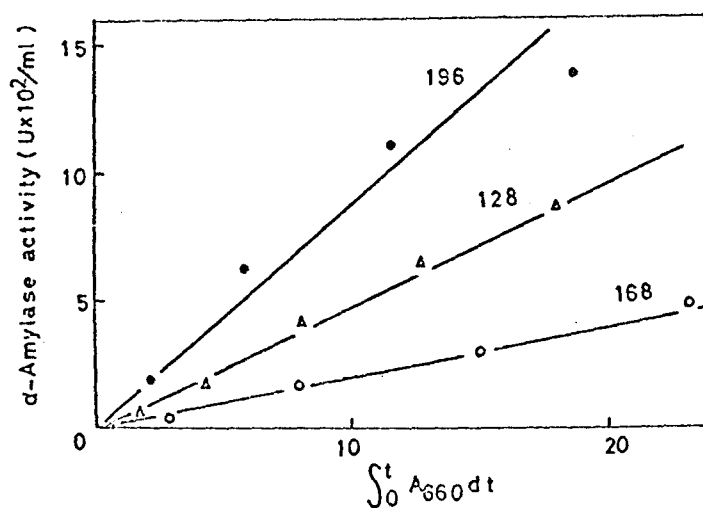


Fig.2-4 Kinetics of α -amylase production by Bac. subtilis 168, 128 and 196.

ある 196 株の nutrient broth での細胞増殖と α -amylase 生産の経時変化を示す。168 株は培養 16 時間目におよそ 600 単位の α -amylase を生産する。128 株は増殖速度が 168 株に較べて遅いけれども 16 時間目には 1300 単位生産した。一方 196 株は増殖速度が 168 株と同じ程度で 16 時間目で 2000 単位余り生産した。

(2) α -Amylase 生産の速度論的解析

Fig. 2-1, Fig. 2-2, Fig. 2-3 の細胞増殖と α -amylase 生産の経時変化より E と $\int OD_{660} \cdot dt$ のプロットを求めたのが Fig. 2-4 である。緒論で示したように 3 つの株は異なった傾きを持つ直線を与えた。productiveness constant (k_p) の値は 168 株で 20、128 株で 47、196 株で 87 であった。これらの結果は変異によって生じた α -amylase 生産量の増加は α -amylase 生産に特異的な mRNA の寿命の変化ではなく、単位時間当り、単位 mRNA 当りにつくられる酵素活性の増加、又は単位菌体量当り単位世代当りにつくられる α -amylase に特異的な mRNA 量の増加を示唆している。

そしてこの原因として次のような可能性が考えられる。

- (i) 変異により α -amylase のアミノ酸配列に変化が生じ高い比活性を持つ α -amylase が生産された。
- (ii) 酵素蛋白 それ自体が何らかの遺伝的理由により多く生産された。

上に述べたような可能性を調べる為 168 株及び 196 株の生産する α -amylase を精製し、比較を行なった。

(3) 酵素化学的性質 第一章に示した 168 株の精製方法に従って 196 株の α -amylase を 100l の醗酵タンクにより培養し、次に DEAE-Sephadex A-50 にかけた

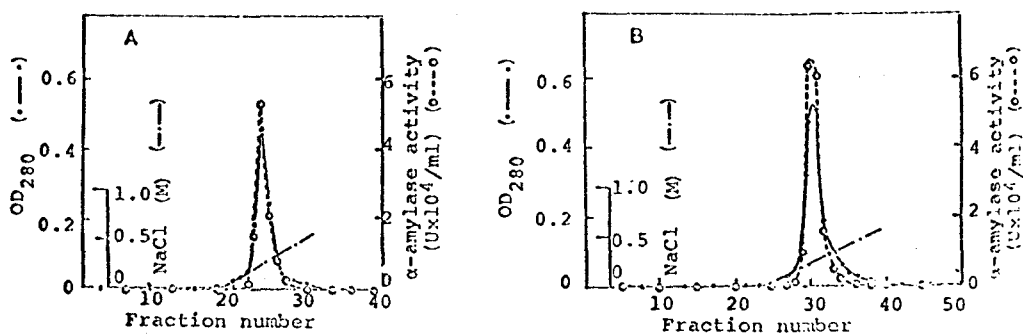


Fig.2-5 Chromatography of α -amylases produced by 168 strain (A) and by 196 strain (B) on a column of DEAE-Sephadex A-50.

クロマトグラムが Fig 2-5 である。Fig. 2-5A には 168 株の α -amylase、Fig. 2-5B には 196 株の α -amylase の流出パターンを示している。両酵素とも類似した流出パターンを示し、0.25M の食塩濃度で流出される。最も精製した両酵素の比活性はともに 12000 単位 / OD₂₈₀ mμ であった。

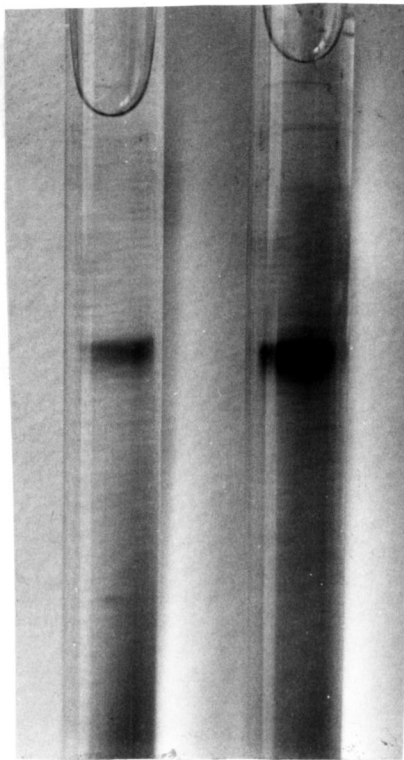


Fig. 2-6 Disc gel electrophoretic pattern of α -amylases produced by 168 (left) and 196 strain (right)

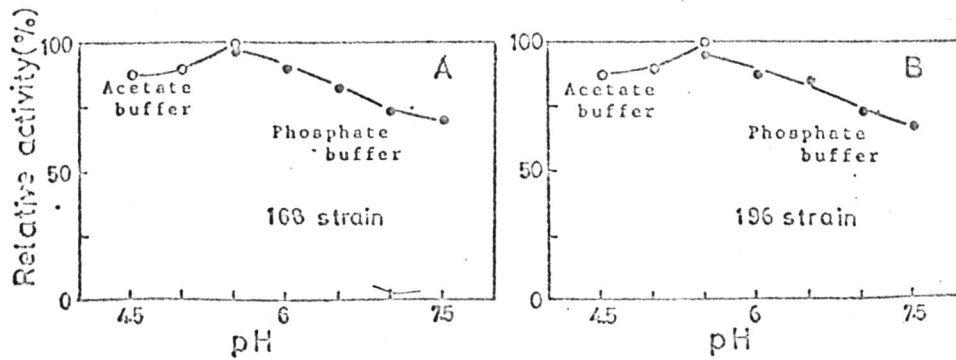


Fig.2-7 pH activity curves of α -amylases produced by strains 168 and 196.

この精製 α -amylaseはpH9.5でのデイス、ゲル電気泳動で単一のバンドを与えた。Fig.2-6には168株及び196株の α -amylaseの同じような移動距離を示している。

酵素活性に及ぼすpHの影響をみたのがFig.2-7である。168株、196株の α -amylaseとも4.5から7.5の間にかなり広い最適pH範囲を持ち最大活性はpH5.5であった。

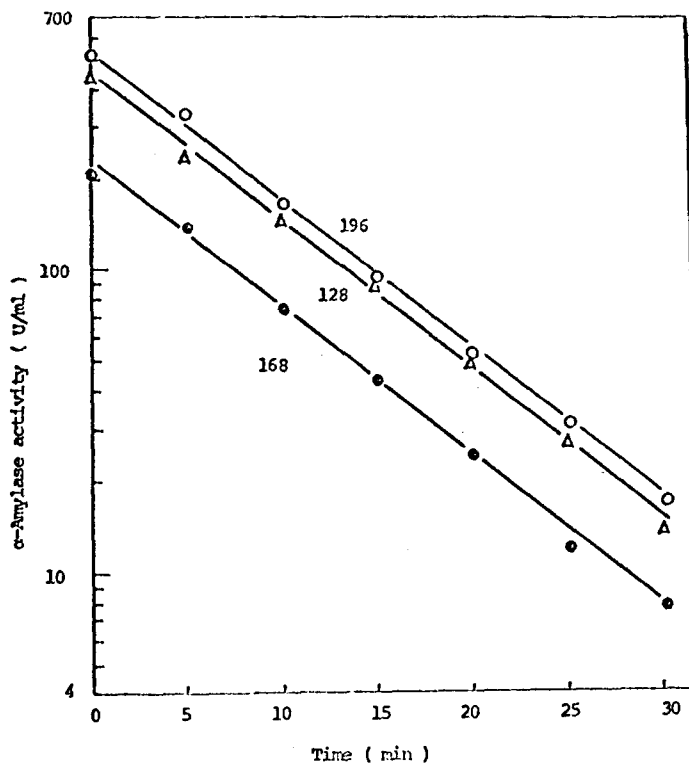


Fig.28 Heat stability of purified α -amylases of Marburg strains at 65°C.

168株、128株、196株の α -amylase の 65°C での熱感受性を調べたのが Fig. 2-8 である。3つの α -amylase とも同じような速度で酵素活性を失った。さらに可溶性デンプンを基質とした時の加水分解活性に対する pNPM を基質とした時の活性の比は Table 2-1 に示した。

Table 2-1 Comparison of amylolytic and maltosidic activities of bacterial α -amylases

α -amylase	Enzyme conc. (mg/ml)	Maltosidic activity (U/ml)	Amylolytic activity (U/ml)	Ratio*
Liquefying type	1	2.22	2.07×10^5	1.07×10^{-5}
Saccharifying type	1	2.50×10^4	1.51×10^5	1.65×10^{-1}
<i>Bac. subtilis</i> 168		78.6	468	1.68×10^{-1}
mutant 128		125	704	1.77×10^{-1}
mutant 196		198	1220	1.63×10^{-1}

Maltosidic and amylolytic activities were measured with p-nitrophenyl- α -D-maltoside and soluble starch as substrate as has been described under "Materials and Methods".
maltosidic activity per amylolytic activity.

168株、128株、196株の α -amylase の間で有意な差は認められなかった。

pH 6.3 での寒天ゲル電気泳動像を示したのが Fig. 2-9 である。168株、128株、196株の α -amylase は

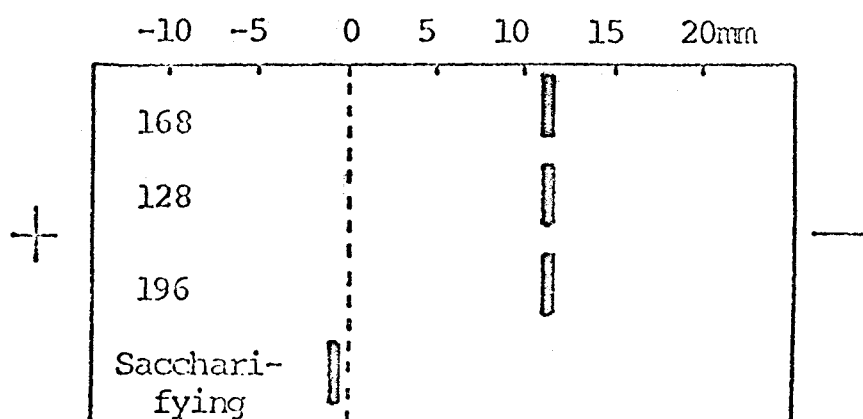


Fig.2-9 Agar gel electrophoretic patterns of α -amylases.

ともに同じ移動度を示している。さらに 196 株の α -amylase を抗原としてつくった兔の抗体を使って 168 株の α -amylase との間で抗原抗体反応を行なった。中央の溝に 196 株の α -amylase 抗体、溝 1、3、5 に 196 株の α -amylase、溝 2、4、6 に 168 株の α -amylase を加え 16 時間後に沈降線を調べたところ、両沈降線は交差せず融合していた (Fig.2-10)。

以上の結果は 168 株とその変異株の間では α -amylase の アミノ酸配列 に変化がないことを示している。

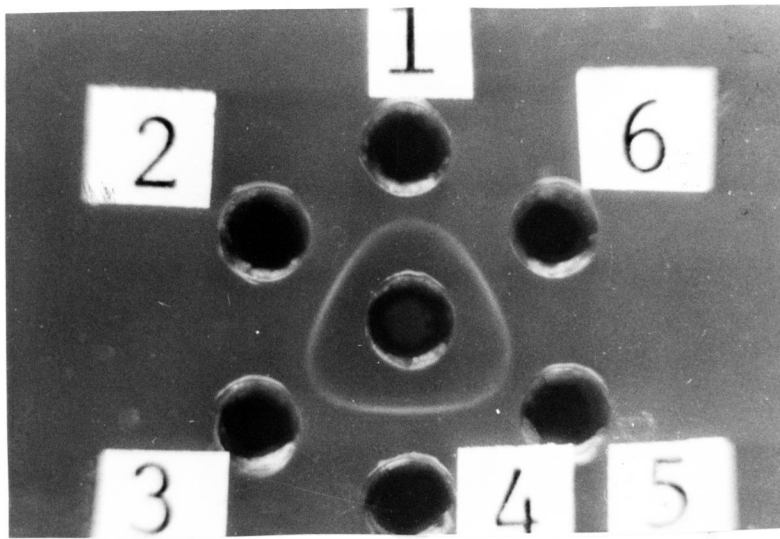


Fig. 2-10 Immunological comparison
of α -amylases produced by 168 and
196 strains

第 4 節 考 察

第3節の実験結果は E と $\int OD \cdot dt$ のプロットの直線性より明らかにされたように、長寿命 mRNA の仮定に基づき酵素生産の生産速度式に α -amylase 生産の増加した変異株が従うことを示している。そしてその変化は特異的な mRNA の寿命 (θ) の変化ではないに、productiveness constant により生じていることがわかった。この productiveness constant の変化には第3節で論じたように、より高い比活性を与えるような酵素蛋白の変化の可能性が考えられたが、次の

理由により否定した。

- (a) 168株の生産する α -amylaseと α -amylase生産量増加した変異株である196株のそれを精製し比活性を測定したところ両酵素とも120,000単位/OD₂₈₀を与えた。
- (b) 65°Cで両酵素とも同じ速度で活性を失った。
- (c) アクリルアミド・ディスクゲル電気泳動で同じ挙動を示した。
- (d) 両酵素のpH感受性は実験誤差範囲内で同じであった。
- (e) Amylolytic activityに対する maltosidic activityの比は両酵素とも同じであった。
- (f) 抗原抗体反応でも両酵素は同じであった。
他の可能性、例えば α -amylaseに特異的なmRNA量の増加、高いtranslationの効率を持つmRNAへの変化等が考えられるが、これらについては今後の研究に待たねばならない。

第5節 要約

Bac. subtilis 168 *try*⁻ (Marburg株)より紫外線処理により α -amylase生産量の増加した変異株を分離した。そしてバクテリアの α -amylase生産が長寿命mRNAに依存するというstandpointより等かれた次式を使う生産量増加を解析した。

$$E = k \int_{t=0}^t X \cdot dt$$

X : 培養時間 t の菌体量 E : α -amylase 生産量

t : 培養時間

θ : α -amylase 生産に特異的な mRNA の平均寿命

k : productiveness constant

上の式に従うとすると酵素生産量も細胞増殖と独立して k 及び θ より求めることができる。原株の Marburg 168 株とその sequential な変異株 128 株、196 株では 2 倍及び 3~4 倍の α -amylase 生産量増加を示した。そしてこれらの変異株の α -amylase 生産は等しい mRNA の平均寿命 (θ) を持ったが、productiveness constant (k) において 2 倍及び 3~4 倍の値を示した。原 168 株及び変異株の生産する酵素を精製し、 α -amylase の比活性、電気泳動像、熱感受性、pH 感受性、可溶性澱粉に対する PNPAM の加水分解活性の比、抗 196 α -amylase 抗体に対する抗原抗体反応を行なった結果 原株と変異株の間では酵素蛋白の変化は認められなかった。

第 3 章 形質転換による α -amylase 生産 量支配遺伝子の解析

第 1 節 緒 論

微生物は遺伝的制御の下に種々のレベルの細胞内、細胞外酵素をつくる。特に *E. coli* では β -galactosidase をはじめとする酵素系で分子生物学、分子遺伝学的に酵素生産量の制御が解析されている。^{10-13, 13-66)} (しかし *Bac. subtilis* においては酵素生産量の制御の研究は少ない。 *Bac. subtilis* の α -amylase 生産においては、以前 *E. coli* で報告されている細胞内酵素の制御方法以外に細胞外酵素独自の制御が考えられる。このように学問的に重要であるばかりではなく、*Bac. subtilis* α -amylase は protease とともに工業的に重要な酵素である。 α -Amylase は澱粉工業に利用され、protease は洗剤、医薬品にと利用範囲が広い。 *Bac. subtilis* の α -amylase 生産の制御を研究する際、最も解析しやすい系として 168^{try} 株を使った。168 株は *Bac. subtilis* の遺伝学⁶⁷⁾ に最も広く用いられている Marburg 株の 1 つで遺伝子地図も作成されており、形質導入をはじめ形質転換にも使用できる。形質導入による α -amylase 遺伝子の解析は Iijima²²⁾ によって報告されているが、ファージ利用の範囲は限られている。一方形質転換法による解析は Spizizen¹⁵⁾ により報告されて以来広く用いられてきている。 α -Amylase 生産の制御に関し

形態転換法を使つて²³⁾ Greenら、²⁴⁻²⁶⁾ Yukiら、²⁸⁾ Yamaguchiらは
詳細な検討を行なった。その結果 α -amylaseの構造
遺伝子に連鎖した制御遺伝子の存在を報告した。

Yuki²⁷⁾らは構造遺伝子の一部分である E site が α -amylase
の電気移動度を支配することを報告している。

第2章では168株より α -amylase生産能の増加し
た逐次変異株である128株、196株の分離について述べ
た。そしてこの増加が速度論的解析よりmRNAの寿命に
関係するものではなく、productiveness constant (k)
に依存していることを示した。そして表に含まれる1因子であ
る酵素蛋白自体の変化は関係がなかった。この章ではこれ
ら変異株の α -amylase生産量の制御を遺伝的に解析する
とともに、168株とは由来の異なる Bac. subtilis IF0
3215株での α -amylase生産の制御遺伝子を報告する。

第 2 節 実験方法 および材料

使用菌株 使用した株はすべて Bac. subtilis であ
る。使用菌株の geno-type を Table 3-1 にまとめた。3215
株は醗酵研究所から供与されたもので、Marburg 168株と
は由来を異にするものである。 α -amylase欠損株 168 try-
amy⁻ は 0.2% 可溶性澱粉を含んだ nutrient agar で
平板培養した時、コード添加により hallo は認められな
かった。この株を nutrient broth で液体培養した時、細胞
外にも細胞内にも α -amylase は検出できなかった。

Tryptophan⁺への復帰変異株は200.4g/mlのN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine処理後Spizizenの最少培地で平板培養し分離した。

培養条件 *Bac. subtilis* は18mm直径の試験管にnutrient broth 5mlを含んだ培地で1夜前培養を行なった。前培養を終った細胞は100ml又は500mlの三角フラスコに実容20ml又は100mlのnutrient brothを含んだ培地で本培養を行なった。全ての培養を通じて培養温度は37℃、振盪回転数120rpmを用いた。

Table 3-1 Bacterial strains

Strain	Geno-type	Parent and mutagen	Characteristics
3215	wild		poor α-amylase production (k≈1)
168	try ₂ ⁻		standard α-amylase production (k≈20)
128	try ₂ ⁻	168 (UV)*	high α-amylase production (k≈40)
196	try ₂ ⁻	128 (UV)	highest α-amylase production (k≈60-80)
168 try ⁻ amy ⁻	try ₂ ⁻ amy ⁻	168 (UV)	α-amylase negative (k=0)
168 try ⁻ amy ⁻ str ^r	try ₂ ⁻ amy ⁻ str ^r	168 try ⁻ amy ⁻ (UV)	amylase negative and resistant to 1 mg/ml of streptomycin (k=0)
196 try ⁺	try ⁺	196 (NG) ^{***}	highest α-amylase production (k≈60-80)

* Ultraviolet irradiation

** N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

*** k : productiveness constant of α-amylase

形質転換 (1) DNA抽出 3215株、196 try⁺
 株を nutrient broth を含んだ 2l の坂口フラスコ (実容 1l) で
 培養を行なった。細胞は流條後 Saito と Miura の方法^{7, 68)}
 で DNA を抽出した。すなわち 6mg の lysozyme を 3ml
 の saline-EDTA (0.15M NaCl + 0.1M EDTA), (pH
 8.0) に溶かし菌体に加え、よく攪拌した。pH を調べる
 酸性になっていたら saline EDTA を増量した。37°C に
 10~20分加温し、菌体がよりもち状になり始めたときに
 ちに凍結した。この際 ステンレス遠沈管に入れ、アセトン
 ドライアイス中に浸した。凍結した菌体に 50ml の Tris-SDS
 緩衝液 (0.1M Tris 緩衝液 + 1% Sodium dodecyl
 sulfate + 0.1M NaCl) (pH 9.0) を加えて攪拌融解する
 と菌体は潰れた。さらに 60°C に加温して完全に溶菌させ
 た。以後の操作は 4°C で行なった。溶菌液を离心管に
 移し、等量の緩衝液飽和 フェーレ (蒸溜したフェーレを
 Tris-SDS 緩衝液で飽和、又は 4:1 (v/v)) を加えて 10
 ~20分振盪した。懸濁液を低速遠心分離して 3層に分け、
 上の層をスポイド付ピペットで採取した。抽出がうまく行な
 われた時は中層に変性蛋白が厚く集まった。水層はまだ
 白濁しているので 12000 rpm, 10分遠心分離を行な
 して上澄液を取った。上澄液には 2容の冷エタノールを静か
 に加えてガラス棒で絨氈状の沈殿を巻きとり、70、80、90
 % エタノール各 10ml 中に順次数分づつ浸漬した後 20~40
 ml の希 saline-citrate (0.015M NaCl + 0.015M

7-ヒン酸ソーダ) (pH 7.0 ± 0.2) に溶かし、濃 saline-citrate (1.5M NaCl + 0.15M 7-ヒン酸ソーダ) と 2~4ml 加えた。この粗 DNA 液をそのまま形質転換に使用した。

(2) Competent cell の調整及び形質転換 168 try⁻amy⁻ str^r 細胞は 18mm 直径の試験管に nutrient broth 5ml を含んだ培地で一夜培養した。Competent cell の調整及び形質転換は Nester⁽⁵⁹⁾ らの方法に従った。すなわち 0.5ml の前培養培地を遠心分離し、CHT-2 培地 (Spizizen の最少培地 + 0.02% casamino acid + 20μg/ml DL-tryptophan) 5ml に懸濁した。37°C で 4 時間 CHT-2 培地で培養後その 0.5ml を CHT-10 培地 (Spizizen の最少培地 + 0.1% casamino acid + 200μg/ml DL-tryptophan) へ加えた。CHT-10 培地でさらに 1 時間半培養後 DNA を 1μg/ml 加えて 30 分間低速で振盪培養した。その後菌体は最少塩培地で洗滌した。

(3) 平板培養 洗滌菌体は最少塩培地で希釈したあと選択培地を含まないアガー上に 0.1ml 加えた。フラスコで 37°C、2 日間保温した。選択培地の組成は Spizizen の最少培地、0.2% 可溶性澱粉、1mg/ml ストربتマイシン、1.2% 寒天、pH 7.0 であった。選択培地で増殖した transformant の α-amylase 生産能は 1% ヨード溶液を加えることで判定した。α-amylase 生産性の transformant は単細胞分離後寒天斜面に保存した。

α-amylase 測定法⁽⁵⁶⁾ Fowle の方法に従って行った。

protease測定法 100 mMの磷酸緩衝液
(pH 7.5)に溶解させた0.6%カゼイン(E. Merck AG)溶液を
2.5 mlと酵素溶液を0.5 ml加えて30°Cで40分間酵素反応
をさせた。反応は0.5N酢酸を2.5 ml添加することによ
り停止させた。その後30分間放置した後、濾紙(東洋濾紙
No. 2)で濾過後、濾液の1 mlを0.5N炭酸ソーダ5 mlに
加え、40°Cで5分間あたためた。その後Folin原液の5倍
稀釈液を1 ml加えることにより反応を開始し、20分後に5mmの
セルを用いて660 m μ の吸収を測定した。proteaseの1単位
を1分間に1 μ g チロシン相当量を可溶化できる酵素量と定
めた。Serine protease活性、metal protease活性は
Michel⁷⁰⁾による記述された方法に準じた。培養上澄液に最
終濃度10 mMになるようにEDTA(和光純薬社製品)を加えて
30°C、15分間保持した後protease活性を測定してserine
protease活性とした。一方metal protease活性は阻害剤
であるEDTAを添加(1分間の全protease活性からserine
protease活性の値を引くことにより求めた。この測定法
はmetal protease活性(EDTAで完全に阻害される
protease活性)とserine protease活性(10 mMのDFP
で完全に阻害されるprotease活性)との和は全protease
活性にほぼ等しいというMillet⁷¹⁾、Prestidge¹⁹⁾らの実験結果
ならびに著者の予備実験の結果に依存している

寒天ゲル電気泳動 Ogitaの方法⁵⁸⁾に準じた。

第 3 節 結 果

(1) 3215株と168 try⁻ amy⁻ str^r株との形質転換
Bac. subtilis 3215株は168株の $\frac{1}{50}$ の低い生産能を
 示す。Fig. 3-1Aにこれら2つの株の α -amylase生産
 の経時変化を示した。Kinoshita, Okada, Terui
 らによる Bac. subtilis α -amylase 生産の速度式

$$E = k \int_{t=0}^t X \cdot dt$$

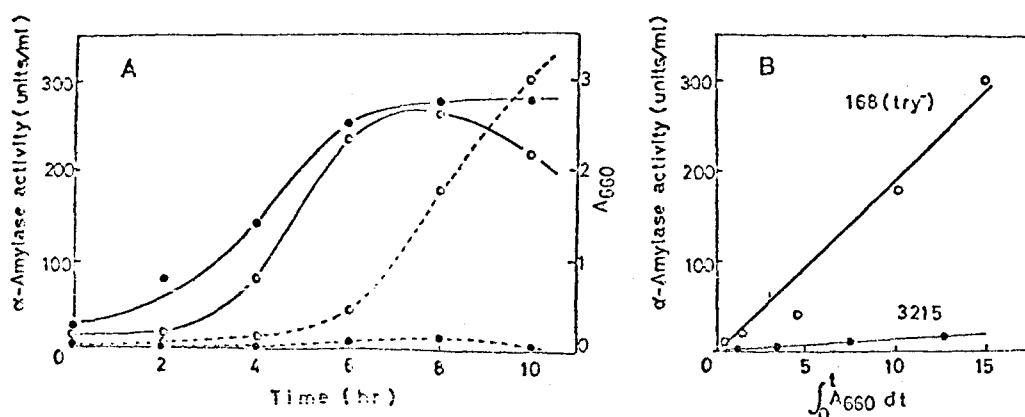


Fig3-1 Time courses of α -amylase production by *B. subtilis* 168 try⁻str and 3215. α -Amylase formed was plotted against culture time (Fig. A) and against $\int_0^t \lambda_{660} dt$. (Fig. B) ---- α -amylase production, — cell growth, o 168 strain, • 3215.

E: 酵素生産量 X: 菌体量

θ : α -amylase に特異的な mRNA の平均寿命

μ : 培養時間

k : productiveness constant

を適用すると Fig. 3-1B が得られる。このプロットは θ が一定であり、 k の値は 168 株で 20, 3215 株で 1 を示した。以後 α -amylase 生産量の比較を k を用いて行なった。この 3215 株と 168 株は k だけでなく電気泳動像においても異なり、Fig. 3-2 に示したように pH 6.3 で 168 株が陰極方向へ移動するのに対し、3215 株は陽極へ移動した。

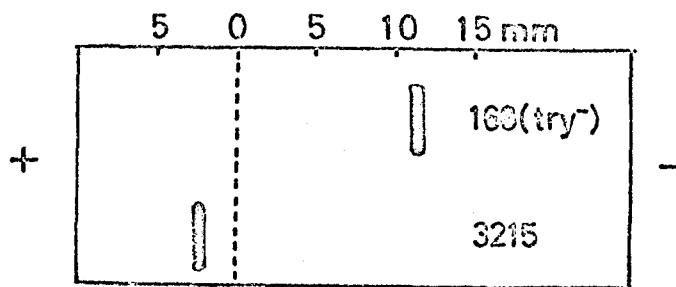


Fig. 3-2 Agar gel electrophoretic pattern of α -amylases produced by *B. subtilis* 168 try⁻st^r and *B. subtilis* 3215.

The gel buffer was 12.5mM phosphate buffer (pH 6.3). Electrophoresis was carried out at 4°C, 12.5 V/cm for 2 hrs.

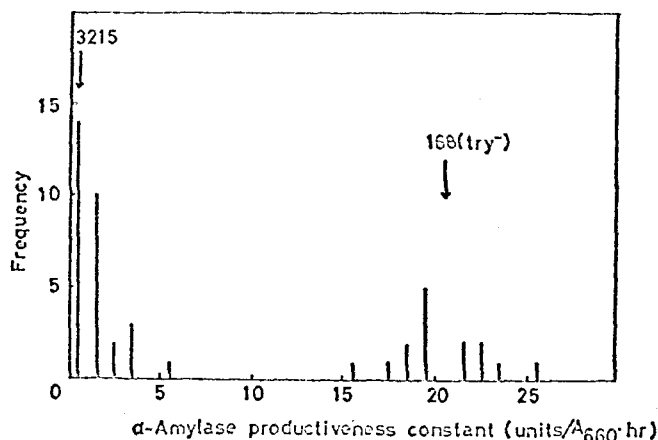


Fig.3-3 Distribution of α -amylase productiveness constant of amy^+ transformants isolated from the transformation using strain 168 $try^- amy^- st^+$ as recipient cells and strain 3215 as the DNA donor.

そこで3215株の α -amylase生産の値い因子を168株に形質転換することを目的とし、この制限遺伝子と構造遺伝子の位置関係を追跡した。3215株をDNA donorに168 $try^- amy^- st^+$ 株をrecipientに使った形質転換により、 $amy^+ try^+$ transformantを分離した。そしてこのtransformantの α -amylase生産量及び α -amylaseの電気泳動的性質を調べた。Transformantの生産量は2つのグループに分けられた(Fig.3-3)。1つのグループは3215株の生産量に対応する値を示し(尤 ≈ 1) / つは168株のそれに対応するものであった(尤 ≈ 20)。中間の尤値を持つものは得られなかった。そして分離した45株中30株の

transformant が donor (3215) 型の生産量、15 株が recipient (168) 型の生産量を示した。そして recipient 型の生産量を示す株のうち 6 株が donor 型の電気泳動像を示し、9 株が recipient 型の電気泳動像を示した (Table 3-2)。これらの結果は α -amylase の構造遺伝子及び α -amylase 生産量支配遺伝子 (P gene) の存在を示している。そしてこれら 2 つの遺伝子は連鎖していることがわかる。そしてこの実験では try^+ transformant 当り double transformant $try^+ amy^+$ の得られる割合は

Table 3-2 Transformation of strain 168 $try^- amy^- str^r$ by DNA from strain 3215.

Donor	Recipient	amy^+ transformants		
		$amy^+ P_{3215}$ (k $\pm$ 1)	$amy^+ P_{168}$ (k $\pm$ 20)	
			Electrophoretic behaviour of α -amylases	
			3215 type	168 type
<u>B. subtilis</u> 3215	<u>B. subtilis</u> 168			
($amy P_{3215}$)	($try_2^- amy^- str^r$ $amy P_{168}$)	30	6	9

The amy^+ cells were isolated from transformants selected previously by try^+ . Transformation frequency of amy^+/try^+ cells is 1 %.

* a gene which regulates quantities of α -amylase production in 3215 (k $\pm$ 1)

** a gene which regulates quantities of α -amylase produced by 168 try^- (k $\pm$ 20)

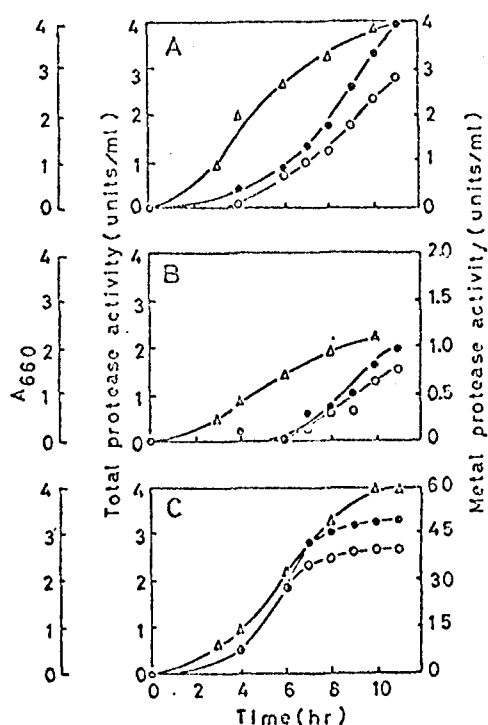


Fig.3-4 Time courses of protease productions by *B. subtilis* 168 try⁺, 128 try⁻, and 196 try⁻. (A) 168, (B) 128, (C) 196. ○—○, metal protease; ●—●, total protease activity; Δ—Δ, cell growth.

1%であった。

(2) 196株と168 try⁻ amy⁻ str⁺ 株との形質転換
 Amylase 生産量を交配する他の遺伝子を解析するために、
 168株より分離した逐次変異株128、196を使った。
 第2章2-示しのように128株は168株よりおよそ2倍
 大きな値を示し、196株は168株の3~4倍の値

を示した。そしてこれらの α -amylase は酵素蛋白として検出できる変化をうけていないことが示された。 α -Amylase とともに細胞外酵素の代表である serine protease, metal protease の生産の time course を示す (Fig. 3-4)。
128 株は原株である 168 株より serine protease, metal protease のともに $1/4$ に減少しており、一方 128 株より得られた 196 株では、168 株と比較して serine protease で 10 倍、metal protease で 20 倍の増加を示した。これから 3 つの酵素生産量の増加 (α -amylase, serine protease, metal protease) 因子が形質転換可能であり、又 single gene の変異によって生じたかどうか調べる為形質転換を行った (Fig. 3-5)。196 try^+ 株を DNA donor に 168 $try^- amy^- st^r$ recipient cell とした形質転換より $amy^+ try^+$ の transformant を分離した。77 株の transformant の内 74 株が平均値 20.4 標準偏差 3.0 を持つ productivity constant を示した、168 株の productivity constant は平均値 21.0、標準偏差 2.1 の分布を示すことより、74 株の transformant の α -amylase 生産量は recipient である 168 のグループに対応すると考えられる。残りの 3 株の transformant は 168 のグループと区別できる高い生産量を示した (値 = 37 ~ 46)。しかしながらこの 3 株の transformant の生産量は donor (196) 株の $1/2$ の生産量しか示さなかった。そしてこの α -amylase 生産量の増加は 168 株から 128 株に関連した変異ではなく、128 株から 196 株

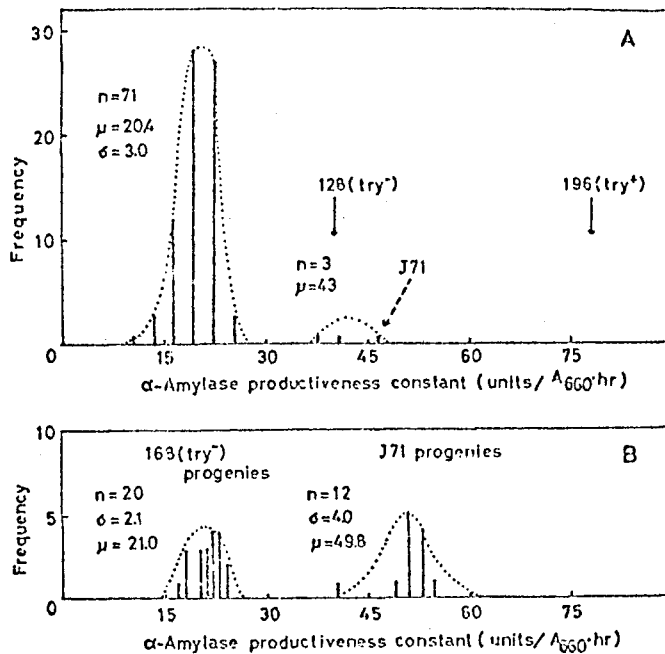


Fig. 3-5 (A) Distribution of α-amylase productiveness constant of amy⁺ transformants isolated from the transformation using strain 168 try⁻amy⁻st^x as recipient cells and strain 196 try⁺ as the DNA donor. (B) Distribution of the k values of 168 try⁻ and J71. μ , mean; σ , standard deviation; n, sample size.

への変異に対応するものであることが以下の実験で明らかにされた。Fig. 3-5には、α-amylase生産量の増加した Transformant の1株である J71 株の clone による k 値の分布を示してある。J71 株は 168 の try⁻ に含まれていないことがわかる。

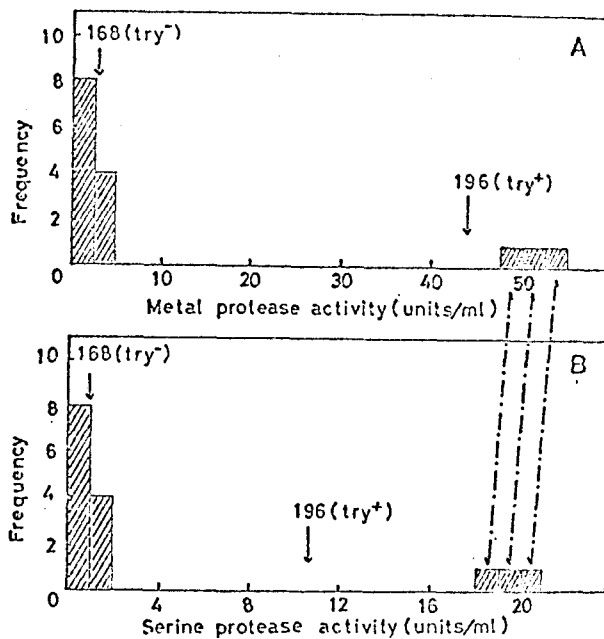


Fig. 3-6 Distribution of the amount of proteases produced by amy⁺ transformants isolated from the transformation using strain 168 try⁻amy⁻st^r as recipient cells and strain 196 try⁺ as the DNA donor. (A) metal protease, (B) serine protease. -----> protease productions of identical transformants.

そこで Fig. 3-5 の transformant の serine protease metal protease 生産量を測定した。右側の高い α -amylase 生産量を示した transformant は いずれも metal protease 活性、serine protease 活性を 168 株と比較して 20 倍生産していた (Fig. 3-6)。低い α -amylase 生産を示す transformant 74 株中より 1 任意に

選んだ12株はいつでも168株に対応する serine protease, metal protease の生産性を示した。この結果 形質転換された遺伝子 (仮に hap gene と名づけた) は128株から196株への変異に関係するもので α -amylase をおよそ2倍、serine protease を20倍、metal protease を20倍増加させた。そしてこの hap gene は形質転換率の低さより α -amylase の構造遺伝子に連鎖していないと判断した。

上に得られた結果は少なくとも α -amylase 生産量を支配する2つの制御遺伝子の存在を示している。それは p 及び hap gene である。 p gene は α -amylase の構造遺伝子に連鎖しているが hap gene は連鎖していない。そして hap gene は α -amylase 以外の2つの酵素 serine protease, metal protease 生産量を支配していた。又3番目の制御遺伝子の存在する可能性もある。それは168株から128株への変異に関係するもので α -amylase 生産量を増加させ、2つの protease 生産を減少させる遺伝子である。この遺伝子を仮に halp gene と名づけたが、この遺伝子は α -amylase の構造遺伝子には連鎖していない。

第4節 考察

上の実験結果は少なくとも2つの遺伝子 (p および hap) が α -amylase 生産量を制御していることを示している。p gene は α -amylase の構造遺伝子に密接に連鎖しており α -amylase 生産量の4を制御している。一方 hap

gene は α -amylase の構造遺伝子に連鎖せず、 α -amylase 生産量とともに serine, protease, metal protease 生産を支配している。 α -Amylase の構造遺伝子に連鎖した α -amylase 生産量支配遺伝子の存在は Yuki²⁵⁾, Yamaguchi²⁸⁾ らによって報告されている。Yuki は Bac. subtilis 1088 株と Bac. subtilis 168 株との形質転換、Yamaguchi らは Bac. natto と Bac. subtilis Marburg 株との形質転換を用いて研究した。又 Yuki²⁶⁾ らは α -amylase の構造遺伝子が染色体の origin から 0.6-0.7 の距離に存在し、arg₁₁₆, phe₉₆ に連鎖し、try₂ には連鎖していない事を報告した。Bac. subtilis 3215 株と Bac. subtilis 168 株との形質転換により明らかになった p gene は以前の報告と同じ遺伝子であろうと推察される。128 株から 196 株への変異により hap gene は α -amylase の構造遺伝子には連鎖していなかった。hap gene を持つ transformant は α -amylase 生産において 2 倍、serine protease, metal protease において 20 倍と少なくとも 3 つの細胞外酵素生産能を増加させた。この事実は (i) hap gene が少なくとも 3 つの加水分解酵素の制御遺伝子である、(ii) 細胞外酵素の分泌に関連する遺伝子である可能性を示唆している。Prestidge²⁹⁾ らは 168 株より protease 生産量の増加に mutant を分離した結果 metal protease が 10 倍、serine protease が 2 倍増加していることを示した。又最近 Yoneda⁷²⁾ らは Bac. subtilis Marburg 株より α -amylase, protease 生産の

に高まった変異株も報告している。3番目の制限遺伝子 (halp gene) の存在は 168 株から 128 株への変異に対応して考えられる。この遺伝子は α -amylase の構造遺伝子には連鎖していない。 α -Amylase 生産を増加させるのに対し、serine protease、metal protease 生産量を減少させる。それゆえ P gene, hap gene とは異なるものである。又 hap gene と halp gene で α -amylase 生産に加算性が存在することになった。

第 5 節 要約

α -Amylase 生産の遺伝的支配を Bac. subtilis を使って研究し次の結果が得られた。

(1) 低い α -amylase 生産 (productiveness constant; 長≒1) を示す Bac. subtilis IF 3215 株を DNA donor として使い、Bac. subtilis 168 try⁻amy⁻st^r を recipient に使った形質転換において、 α -amylase 生産を行うようにした amy⁺ transformant は例外なく 2つのグループに分けられた。Transformant の $\frac{2}{3}$ は donor strain と同じ長値を持つグループに属し、残りは amy⁻ 株の親株である 168 株 (長≒20) と同じ長値を示した。長≒20 の値を示す transformant の α -amylase の電気泳動像を調べた結果、15 株中 6 株の α -amylase が donor 株である 3215 と同じ泳動像を示し、残りが 168 株と同じ泳動像を示した。これらの結果は α -amylase 生産量の制限遺伝子 (P gene) が

α -amylase の構造遺伝子に密接に連鎖していることを示している。

(2) 168 株から由来する 2 つの逐次変異株、128 株 ($k=40$) 196 株 ($k=60 \sim 80$) の serine 及 α -metal protease 生産を調べた。128 株では serine 及 α -metal protease が $\frac{1}{4}$ に減少したのに対し、196 株では 168 株に対し serine protease で 10 倍、metal protease で 20 倍増加した。

(3) 196 株 ($k=60 \sim 80$) を DNA donor とし、168 株の amy^- ($k=0$) を recipient に使った形質転換により amy^+ の transformant を分離した。この transformant は生産量より 2 つのグループに分けることができた。Transformant 77 株中 74 株は 168 株に相当する k 値 (21.0 ± 2.1) を示し、残りの株は高い生産量 ($k=37 \sim 46$) を示した。

α -amylase 生産の増加したグループは serine protease で 20 倍、metal protease で 20 倍の増加を示した。

(4) $k=20$ を示すグループのどれも serine protease、metal protease 生産量を増加させなかった。これらの結果は α -amylase の構造遺伝子に隣接せず、 α -amylase、serine protease、metal protease の 3 種の酵素生産を支配する hap gene の存在を示唆している。

(5) p. hap の 2 つの遺伝子以外にも α -amylase 生産と制御する遺伝子 (halp gene) の存在が推測される。この halp gene は α -amylase 生産を増加させ 2 つの protease の生産を減少させるものである。

総括 および 結論

微生物の生産する酵素量の制御の研究は、その大半が *E. coli* の生産する細胞内酵素系で進歩、発展してきた。一方酵素の工業利用の観点から、日本では加水分解酵素について深く研究されてきている。

著者がここにとりあげた *Bac. subtilis* Marburg 株は工業的に重要な加水分解酵素を生産するうえから、細胞内酵素と異なり細胞外酵素独自の制御機構を考へる上から、好材料であった。

Bac. subtilis Marburg 株は形質転換をはじめとする種々の遺伝的手法が可能であるため、その利点を生かして細胞外酵素生産量の制御機構を遺伝的、分子生物学的に研究したのが本論文である。

本論文は *Bac. subtilis* Marburg 株の α -amylase の性質、 α -amylase 生産量支配遺伝子の解析という問題を扱っている。ここで得られた結果は次のように総括、結論される。

第1章では *Bac. subtilis* の α -amylase の内、遺伝学に広く利用されている Marburg 株の α -amylase を精製し、その酵素化学的、免疫化学的性質を工業利用に重要な役割を果している液化型 α -amylase、糖化型 α -amylase と比較検討した。Marburg 株の α -amylase は熱感受性、最適 pH、p-nitrophenyl-maltoside に対する親和性において液化型 α -amylase とは非常に異なり、糖化型 α -amylase と類似している。一方電気泳動性に関しては液化型 α -amylase が糖化型 α -amylase より近いことがわかった。免疫性の比較により3つの酵素の違いが明瞭に示された。液化型 α -amylase は Marburg 株の α -amylase と共通する抗原決定基を持つ。糖化型 α -amylase は Marburg 株の

α -amylase と共通する抗原決定基を持っているが、糖化型 α -amylase には存在しない Marburg 株の α -amylase 独自の抗原決定基が確認された。以上の結果より Marburg 株の α -amylase は糖化型 α -amylase とは異なり、糖化型 α -amylase に近いが同一の酵素でないと結論した。

第2章では Bac. subtilis Marburg 株より α -amylase 生産の増加した変異株を分離した。そして変異株と原株との α -amylase 生産の増加の原因を Kinschita²⁹⁻³⁰⁾らの α -amylase 生産の速度式を用いて検討した。この速度式は以下のよう
に示される。

$$E = k \int_{t-\theta}^t X \cdot dt$$

E: 酵素生産量 t: 培養時間

X: 培養時間 t での菌体量

θ : α -amylase 生産に特異的な mRNA の平均寿命

k: productiveness constant

原株、変異株とも E と $\int X \cdot dt$ のプロットは $t - \theta = 0$ になるまで直線を与えた。そして両株を直線の勾配が異なることより、 α -amylase 生産に特異的な mRNA による変化ではなしに、k に変化が生じたものであると結論した。この k に含まれる1因子である酵素蛋白の変化の可能性は、原株及び変異株の α -amylase を精製し、酵素化学的、免疫化学的に比較した結果、これらの株では α -amylase の蛋白自体に変化

がないと結論した。表に含まれる他の因子、例えば単位菌体量当り、単位 mRNA に translate される効率の増加、単位菌体量当り、単位世代当りに作られる α -amylase に特異的な mRNA 量の増加の可能性が残っている。

第3章では第2章で分離した原株より α -amylase がおよそ2倍増加した変異株 128、128株よりさらに変異をうけた α -amylase 生産の増加した 196株を使ってこの増加因子を遺伝学的に解析した。196 try^+ 株と 168 $try^- amy^- st^r$ 株との α -amylase の形質転換により α -amylase 量の増加した transformant は DNA donor である 196株の α -amylase 生産量 (表=60~80) を示さず、168 amy^+ 株 (表=20) のおよそ2倍 (表=37~46) の生産量を示した。一方 protease 生産の挙動は 168株に較べて 128株では serine protease, metal-protease とも $1/4$ に減少していた。196株では serine protease は 168株に比較して10倍、metal protease は20倍の増加を示した。上で示した形質転換により得られた α -amylase 生産の増加した transformant はいずれも serine protease metal protease 生産が 168株に比較して20倍増加していた。このことより形質転換された α -amylase 生産量増加に同定する遺伝子 (*lap* gene) は 128株から 196株への変異に関連する遺伝子であり、 α -amylase 生産だけでなく serine protease, metal protease 生産量も増加させ形質転換率より α -amylase の構造遺伝子と連鎖していないと結論した。また 168株から 128株への変異に対応

する遺伝子 (hap gene) の存在の可能性が考えられる。
この hap gene は α -amylase 生産量増加とともに、
2つの protease 生産量を減少させることより hap gene とは
異なる。 α -Amylase⁻ (構造遺伝子変異) との形質転換が
できないことより、 α -amylase の構造遺伝子に連鎖するとは
考えられない。その上 α -amylase 生産に加算性が存在す
ることより新しい遺伝子であろう。次に Marburg 株とは由
来の異なる 3215 株を用いて α -amylase 生産量の解析
を行った。3215 株は α -amylase 生産量 (長 1) が低く、
電気泳動性においても 168 株とは異なるので、3215 株
を DNA donor とし、168 try⁻ amy⁻ str^r を recipient
として α -amylase 遺伝子の形質転換を行った。得ら
れた amy⁺ の transformant 中 2/3 が生産量におい
ても著しく近く 3215 株の生産量 (長 1) を示した。残
りが 168 amy⁺ 株の生産量を示した。(長 20) 168 株
の生産量を示す transformant 15 株の内 6 株が 3215
株に相当する α -amylase の電気泳動像を示した。これ
らの結果より 3215 株の α -amylase 生産量を支配する
遺伝子は α -amylase の構造遺伝子に連鎖していること
を示し、p gene と名付けた。第 3 章の結論としては、
 α -amylase 生産量を支配する 3つの遺伝子が考えられ、
1つは α -amylase の構造遺伝子に連鎖する p gene
他の 2つの遺伝子 (hap, hap gene) は α -amylase
の構造遺伝子には連鎖せず、serine protease,

metal protease の生産も支配する遺伝子であり、hap
gene は 2 つの protease の生産量増加に、halp gene は
生産量の減少も支配している。

文 献

- 1) Meyer, K. H., Fuld, M., Bernfeld, P.: *Experientia*, 3, 411 (1947).
- 2) Junge, J. M., Stein, E. A., Neurath, H., Fischer, E. H.: *J. Biol. Chem.*, 234, 556 (1959).
- 3) 福本寿一郎 : 近代工業化学 (小田良平 編集), Vol. 23, p. 9, 朝倉書店 (1969).
- 4) Toda, H., Narita, K.: *J. Biochem. (Japan)*, 63, 302 (1968).
- 5) Sugae, K.: *J. Biochem. (Japan)*, 47, 170 (1960).
- 6) Kojima, H., Sugae, K.: *J. Biochem. (Japan)*, 64, 713. (1968).
- 7) Hsiu, J., Fischer, E. H., Stein, E. A.: *Biochemistry*, 3, 61 (1964).
- 8) Imanishi, A.: *J. Biochem. (Japan)*, 60, 381 (1969).
- 9) Welker, N. E., Campbell, L. L.: *J. Bacteriol.*, 94, 1131 (1967).
- 10) Jacob, F., Monod, J.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26, 193 (1961).
- 11) Jacob, F., Monod, J.: *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961).
- 12) Jacob, F., Ulman, A., Monod, J.: *C. R. Acad. Sci., Paris*, 258, 3125 (1964).
- 13) Novic, A., Horiuchi, T.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26, 239 (1961).
- 14) Halvorson, H. O., Herman, A., Okada, H., Gorman, J.: *Induktion und Morphogenese*, p41, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1962).

- 15) Spizizen, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 1072 (1958).
- 16) Anagnostopoulos, C., Spizizen, J.: J. Bacteriol., 81, 741 (1961).
- 17) Saito, H., Miura, K.: Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963).
- 18) Coukoulis, H., Campbell, L. L.: J. Bacteriol., 105, 319 (1971).
- 19) Prestige, L., Gage, V., Spizizen, J.: J. Bacteriol., 107, 815 (1971).
- 20) Levisohn, S., Aronson, A. I.: J. Bacteriol., 93, 1023 (1967).
- 21) Isono, K.: Japan. J. Genetics, 45, 285 (1970).
- 22) Iijima, T., Ikeda, Y.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 97 (1963).
- 23) Green, D. M., Colarusso, L. J.: Biochim. Biophys. Acta, 89, 277 (1964).
- 24) Yuki, S.: Japan. J. Genetics, 42, 251 (1967).
- 25) Yuki, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 182 (1968).
- 26) Yuki, S., Ueda, Y.: Japan. J. Genetics, 43, 121 (1968).
- 27) Yuki, S., Osaki, E.: Japan. J. Genetics, 46, 223 (1971).
- 28) Yamaguchi, K., Matsuzaki, H., Maruo, B.: J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 97 (1969).
- 29) 木下晋一, 岡田弘輔, 照井亮造 : 日本農芸化学会講演要旨集, 京都, p278 (1966).

- 30) Kinoshita, S., Okada, H., Terui, G.: J. Ferment. Technol., 46, 427 (1968).
- 31) Akabori, S., Hagihara, B., Ikenaka, T.: Proc. Japan Acad., 27, 350 (1951).
- 32) Akabori, S., Hagihara, B., Ikenaka, T.: J. Biochem. (Japan), 41, 577 (1954).
- 33) Campbell, L. L.: J. Am. Chem. Soc., 76, 5256 (1954).
- 34) Takaoka, K., Fuwa, H., Nikuni, Z.: Mem. Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ., 10, 199 (1952).
- 35) Markovitz, H., Klein, H. P., Fischer, E. H.: Biochim. Biophys. Acta, 19, 267 (1956).
- 36) Robyt, J., French, D.: Arch. Biochem. Biophys., 104, 338 (1964).
- 37) DePinto, J. A., Campbell, L. L.: Biochemistry, 7, 114 (1968).
- 38) Minoda, Y., Yamada, K.: Agr. Biol. Chem. (Japan), 27, 806 (1963).
- 39) Minoda, Y., Arai, M., Torigoe, Y., Yamada, K.: Agr. Biol. Chem. (Japan), 32, 110 (1968).
- 40) Welker, N. E., Campbell, L. L.: Biochemistry, 6, 3681 (1967).
- 41) Manning, G. B., Campbell, L. L.: J. Biol. Chem., 236, 2952 (1961).
- 42) Pfueller, S. L., Elliott, W. H.: J. Biol. Chem., 244, 48 (1969).
- 43) Ogasahara, K., Imanishi, A., Isemura, T.: J. Biochem. (Japan), 67, 65 (1970).

- 44) Breed, R. S., Murray, F. G. D., Smith, N. R.:
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th
edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore
(1957).
- 45) 福本寿一郎, 山本武彦、鶴 大興、覚前 貢:
日本農芸化学会誌, 34, 475 (1960).
- 46) Fischer, E. H., Stein, E. A.: The Enzymes, 2nd ed.
(Boyer, P. D.), Vol. 4, p. 313, Academic Press,
New York and London (1960).
- 47) Fischer, E. H., Sumerwell, W. N., Junge, J. M., Stein,
E. A.: Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna,
1958, Symp. 8, p. 124, Pergamon Press, Oxford (1960).
- 48) Yutani, A., Yutani, K., Isemura, T.: J. Biochem.
(Japan), 65, 201 (1969).
- 49) Isemura, T., Imanishi, A.: J. Biochem. (Japan),
51, 172 (1962).
- 50) Imanishi, A., Momotani, Y., Isemura, T.: J. Biochem.
(Japan), 55, 562 (1964).
- 51) Imanishi, A., Momotani, Y., Isemura, T.: J. Biochem.
(Japan), 57, 417 (1965).
- 52) 岡田茂孝, 東原昌孝、福本寿一郎:
日本農芸化学会誌, 42, 665 (1968).
- 53) Yoshida, H., Hiromi, K., Ono, S.: J. Biochem. (Japan),
62, 439 (1967).
- 54) Yoshida, H., Hiromi, K., Ono, S.: J. Biochem. (Japan),
65, 741 (1969).
- 55) 松岡雄治: 蛋白質 核酸 酵素, 11, 35 (1966).

- 56) Fuwa, H.: J. Biochem. (Japan), 41, 583 (1954).
- 57) Matsubara, S.: Bull. Chem. Soc. (Japan), 34, 718 (1961).
- 58) Ogita, Z.: Med. J. Osaka Univ., 15, 141 (1964).
- 59) Davis, B. J.: Ann. New York Acad. Sci., 121, Art. 2, 321 (1964).
- 60) 松橋 直, 臼井美津子, 成内秀雄: 化学と生物, 9, 125 (1971).
- 61) Yoshida, A., Fukumoto, J., Yamamoto, T.: Agr. Biol. Chem., 31, 682 (1967).
- 62) Hagihara, B.: Ann. Rep. Sci. Osaka Univ., 2, 35 (1954).
- 63) Beckwith, J. R.: J. Mol. Biol., 8, 427 (1964).
- 64) Scaife, J., Beckwith, J. R.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 403 (1966).
- 65) Beckwith, J. R.: Science, 156, 597 (1967).
- 66) Davis, J., Jacob, F.: J. Mol. Biol., 36, 413 (1968).
- 67) Young, F. E., Wilson, G. A.: Spores (Halvorson, H. O.), Vol. 5, p. 77, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1971).
- 68) 斎藤日向: 核酸実験法(蛋白質 核酸 酵素 編集部) p. 32, 共立出版 (1966).
- 69) Nester, E. W., Lederberg, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 52 (1961).
- 70) Michel, J. F., Millet, J.: J. appl. Bact., 33, 220 (1970).
- 71) Millet, J.: J. appl. Bact., 33, 207 (1970).
- 72) 米田祐康, 山根国男, 丸尾文治: 生化学 44, 469 (1972).

本論文に関係ある主な報告

- 1) Regulation of α -Amylase production in a
Bacillus subtilis Marburg strain
(I) Isolation of Mutants which Produce High Levels
of α -Amylase and Analysis of Their Enzymes
J. Ferment. Technol., 50, 801 (1972).
- 2) Characterization of α -Amylase Produced by
Bacillus subtilis Marburg strain
J. Ferment. Technol., 50, 910 (1972).
- 3) Genetic analysis of α -amylase production by
Bacillus subtilis Marburg strain
Biochim. Biophys. Acta, in preparation.