

Title	Bacillus subtilisの $\alpha$ -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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2483">https://hdl.handle.net/11094/2483</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・（本籍）	せき 関	ぐち 口	じゆん 順	いち 一
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	2774	号	
学位授与の日付	昭和48年3月24日			
学位授与の要件	工学研究科醸酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	<b>Bacillus subtilis の<math>\alpha</math>-Amylase の生産能の研究</b>			
論文審査委員	(主査) 教授	岡田 弘輔		
	(副査) 教授	芝崎 勲	教授	大嶋 泰治 教授 田口 久治
	教授	原田 篤也	教授	市川 邦介

### 論 文 内 容 の 要 旨

*Bacillus subtilis* Marburg 株は工業的に重要な加水分解酵素を生産し、細胞外酵素の制御機構研究の最適のモデルである。また形質転換をはじめ種々の遺伝的手法が可能で、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ものである。

第1章では *Bac. subtilis* Marburg 株の  $\alpha$ -amylase を精製し、その酵素化学的、免疫化学的性質を液化型  $\alpha$ -amylase、糖化型  $\alpha$ -amylase と比較検討した。Marburg 株の  $\alpha$ -amylase は熱感受性、最適 pH. p-nitrophenyl maltaside に対する親和性において液化型  $\alpha$ -amylase とは非常に異なり糖化型  $\alpha$ -amylase と類似するが、電気泳動、免疫性は糖化型  $\alpha$ -amylase と異なることがわかった。

第2章では、*Bac. subtilis* Marburg 株より  $\alpha$ -amylase 生産の増加した変異株を分離し、その変異株と原株との  $\alpha$ -amylase 生産の増加の原因を速度式を用いて検討した。その結果、 $\alpha$ -amylase 生産に特異的な mRNA の安定性の変化ではなく、productiveness constant (K) に変化が生じたものであると結論した。この K の変化に含まれる 1 因子である酵素蛋白の変化の可能性を原株及び変異株の  $\alpha$ -amylase を精製し、酵素化学的、免疫化学的に比較研究した結果、これらの株では  $\alpha$ -amylase の蛋白自体には変化がないと結論した。

第3章では原株より  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase 生産の増加した 196株を使って増加因子を遺伝学的に解析した。これらの変異株では serine protease, metal protease 量が128株では原株の $\frac{1}{4}$ に減少しており、196株では原株より serine protease で10倍、metal protease で20倍増加していた。そして196 try<sup>+</sup> 株を DNA donor に168 try<sup>-</sup> amy<sup>-</sup> st<sup>r</sup> 株を recipient にした形質転換により  $\alpha$ -amylase 生産の増加した transformant は中間の生産能を示した。又これら transformant はすべての protease 生産が20倍増加していることにより、

128株から196株への変異に対応する遺伝子 (hap gene) が形質転換されたものと結論した。168株から128株への変異に対応する遺伝子 (halp gene) は2つの protease 生産量を減少させた。又 hap gene, halp gene とも amy<sup>-</sup> ( $\alpha$ -amylase の構造遺伝子変異) とは連鎖しないことが形質転換より明らかになった。次に Marburg 株とは由来の異なる3215株を DNA donor に 168 try<sup>-</sup> amy<sup>-</sup> st<sup>r</sup> 株を recipient とした形質転換により3215株の  $\alpha$ -amylase 生産量を支配する遺伝子 (P gene) は  $\alpha$ -amylase の構造遺伝子に連鎖していることがわかった。

第3章の結論として  $\alpha$ -amylase 生産量を支配する3つの遺伝子が明らかになった。1つは  $\alpha$ -amylase の構造遺伝子に連鎖する P gene. 他の2つの遺伝子 (hap, halp gene) は  $\alpha$ -amylase の構造遺伝子に連鎖せず、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 生産量の減少を支配していた。

### 論文の審査結果の要旨

本論文は微生物の生産する酵素量を決定する遺伝的支配を解明したものであり、*Bacillus subtilis* Marburg 株の  $\alpha$ -amylase 生産をモデルとして研究している。

まず *B. subtilis* の  $\alpha$ -amylase 生産能を量的に評価する方法を確立し、K (酵素生産性係数) と  $\theta$  (酵素の mRNA 安定平均時間) を用いて菌体増殖に関係なく測定することに成功している。ついで原株から突然変異により  $\alpha$ -amylase 生産性の向上した変異株をとり、その向上の遺伝子の背景を、速度論、酵素化学、および遺伝学の立場から追求している。

酵素生産速度論からは  $\theta$  の値は不変であり、K の値が大きくなることを認めた。ついで原株および変異株の  $\alpha$ -amylase を電気泳動的に均一になるまで精製し、酵素化学的および免疫学的性質から酵素蛋白として差がない事を見出している。そして酵素蛋白質の変化が K 値増大の理由でないと結論している。

遺伝学的に形質転換実験から  $\alpha$ -amylase 生産に量的に関係する遺伝子として P, hap, halp の3遺伝子があり、P 遺伝子は構造遺伝子と強く連鎖しており promotor 遺伝子である可能性があるが hap と halp は構造遺伝子と連鎖しておらず、また  $\alpha$ -amylase の他 serine protease や metal protease の生産に量的に関係する遺伝子であることを明らかにしている。

また *B. subtilis* Marburg 株の生産する  $\alpha$ -amylase は液化型よりもむしろ糖化型  $\alpha$ -amylase に近似するものであることも併せて解明している。

以上の如く本論文は微生物の酵素生産性の遺伝生理学に全く新しい分野を開拓したものとして基礎醸酵学に大なる貢献をなすものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。