

Title	枯草菌細胞膜による α -Amylaseのin vitro合成
Author(s)	二宮, 保男
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2775
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	にの 二	みや 宮	やす 保	お 男
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	3744	号	
学位授与の日付	昭和51年12月1日			
学位授与の要件	工学研究科 醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	枯草菌細胞膜による α -Amylase の in vitro 合成			
論文審査委員	(主査) 教授	合葉 修一		
	(副査) 教授	芝崎 勲	教授 岡田 弘輔	教授 田口 久治
	教授	市川 邦介	教授 大嶋 泰治	教授 原田 篤也

論 文 内 容 の 要 旨

Bacillus amyloliquefaciens KA63の単離細胞膜による無細胞蛋白合成系を調製し、 α -amylaseが膜結合ポリソームにおいて合成されることを明らかにした。

第1章では、対数増殖期菌体を低温リゾチーム処理、ショ糖密度重層遠心分離法により、蛋白合成活性を有する膜画分を得た。この膜画分は細胞質画分、エネルギー補給系、アミノ酸混液を添加することにより安定な in vitro 蛋白合成活性を示した。この系での蛋白合成はATP, GTP, phosphocreatineを要求し、膜画分またはS-105単独では活性を示さず、KCNによって阻害されないことから、完全な無細胞系であると結論された。この蛋白合成はtranslationの阻害剤であるchloramphenicol, puromycinによって阻害され、transcriptionの阻害剤であるactinomycin D, rifampicinには影響されないことより、系に既存のメッセンジャーRNA(mRNA)によるde novo合成であると結論した。さらにこの系での蛋白合成速度はS-105濃度に依存し、合成された蛋白量は膜画分の量によって制限されることが明らかとなった。

第2章では、この無細胞蛋白合成系にリボソームを追加することによって蛋白合成が促進されることを示し、合成が停止した後に加えても効果があることを明らかにした。この結果から、蛋白合成停止後もmRNAは比較的安定に保存されるとの結論を得た。反応系のショ糖密度勾配遠心分析より、蛋白合成は主に膜結合ポリソームにおいて起ることが認められ、S-105中にmRNAを含まない事実から、この系は膜結合ポリソームによる無細胞蛋白合成系であることが明らかになった。反応系に単離した30Sルボソームサブユニットを添加することにより蛋白合成量は増大したが、50Sサブユニットでは阻害的に作用した。

第3章では、膜結合ポリソーム系による全合成蛋白の16~17%が抗amylase血清と反応したが、S-30を用いた遊離ポリソーム系では0.7~1.7%しか反応せず、 α -amylase合成が膜で行われることを示した。また α -amylase高生産期の菌体から調製した膜画分においては全合成蛋白の60%以上が抗amylase血清と反応したことから、 α -amylaseのmRNAは細胞の増殖過程においても崩壊より保護され膜に蓄積されるものと思われた。また、 α -amylase生産の低下したAL222株からの無細胞蛋白合成系においては、抗amylase血清との免疫沈降物中への放射能の取り込みが検出されず、in vivoにおける表現型と一致し、免疫反応によるin vitro合成 α -amylaseの測定法は信頼されうると判断した。

論文の審査結果の要旨

本論文は工業的に重要な *Bacillus amyloliquefaciens* の菌体外酵素 α -amylaseのin vitro生産を取扱ったものである。一般に菌体外酵素は、増殖非運動型の生成経過をとる原因と分泌機構が未解決のまま残されている。

論文提出者は今まで成功していなかった *Bacillus* 属菌において初めて安定なin vitroアミノ酸取込み系を開発することに成功している。また系中に注意深く調整された細胞膜結合ポリソームを添加することにより actinomycin D や rifampin 耐性のアミノ酸取込みが観察できることから、この系は安定性 mRNA による取込み系である事を推定し、KCN 抵抗性、と ATP, GTP creatinephosphate の要求性からアミノ酸取込みは混在生残菌によるものではないと結論している。

細胞膜結合ポリソームにより生成した蛋白質を抗 amylase 血清を用いて分析し、全合成蛋白質の約 16% が抗血清と反応するが、膜結合ポリソームの代りに遊離ポリソームを用いたものや、 α -amylase の leaky 変異株 AL222 から調整した膜結合ポリソームを用いたものでは新しく合成された蛋白質は抗アミラーゼ血清と反応しなかった。

以上の結果から *Bacillus amyloliquefaciens* の α -amylaseの生産の場合は細胞膜に結合したポリソーム上であり、安定 mRNA に依存している事が推定される。また膜結合性、分泌性と mRNA の安定性の相関について論じている。

以上本論文は、分泌酵素の生産機構を基礎的に研究したもので工業的に利用されている他の微生物分泌酵素にも広く適用できるもので、学術的にも、また工業的にも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。