



Title	Bacillus subtilisの適応過程における増殖と α -amylase生産に関する生理学的並びに速度論的研究
Author(s)	土屋, 勝躬
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31210
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏 名・(本籍)	土 ^{つち} 屋 ^や 勝 ^{かつ} 躬 ^み
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 2 6 0 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 1 月 31 日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Bacillus subtilis の適応過程における増殖と α-amylase 生産に関する生理学的並びに速度論的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 三 浦 喜 温 (副査) 教 授 上 原 喜 八 郎 教 授 青 沼 繁 教 授 近 藤 雅 臣

論 文 内 容 の 要 旨

醗酵プロセスの設計および制御などの最適化のためには、微生物の増殖および生産物の生成過程を定式化することが必要とされる。微生物の増殖速度式としてこれまで制限基質のみの関数として表わされた Monod の式が多く用いられてきた。しかし Monod の式は制限基質濃度が十分である回分培養初期の誘導期、および培養液組成の変化など環境変化に伴う増殖の非定常状態を表わすことができない。このような非定常状態における RNA、蛋白質の挙動については多く報告されているが、このような菌体内成分を考慮した微生物の増殖速度の定式化は少なく、まだ十分に環境変化に対する適応現象を表わしているとはいえない。

一方微生物によって生産される菌体外酵素は一般に J. Monod によって定義された preferential synthesis によるものが多く、*Bacillus subtilis* などによって生産される α -amylase もその一つである。この α -amylase 生産の preferential synthesis の要因について、A. R. Gould らは α -amylase の mRNA の *de novo* 合成およびその蓄積、S. Kinoshita らは mRNA の安定性によって説明し定式化を行っている。しかし本研究に使用した *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase の生産様式は増殖静止後も非常に長時間にわたって α -amylase の生産を持続し、この α -amylase の mRNA は安定ではなく Kinoshita らのモデル式では表わすことが困難である。

以上のような観点から、適応過程をも含めた微生物の増殖および増殖静止後の長時間にわたる α -amylase の定式化を目的として本研究を行った。

第 1 章で *Bacillus subtilis* の適応過程における菌体内成分の挙動を調べ、増殖速度の定式化のための基礎的知見を得た。

第2章では第1章で得た結果にもとづいて適応過程をも含めた増殖速度式を導いた。

第3章では *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産における preferential synthesis の要因を検討し、定式化のために必要な基礎的知見を得た。

第4章では第3章の結果にもとづいて α -amylase 生産様式の定式化を試みた。

第1章 増殖中の菌体内成分の挙動

Bacillus subtilis を用いて glucose を制限基質とした連続培養を行い、種々の稀釈率での定常状態における菌体内の DNA, RNAs, および蛋白質含量の挙動について検討した結果、DNA, tRNA および蛋白質含量は増殖静止期をも含めて、比増殖速度に関係なく一定であったが、rRNA 含量は、増殖静止期においても一定量存在し、比増殖速度の増加に伴い直線的に増加した。また xylose を炭素源とした回分培養の指数増殖期に glucose を添加するという炭素源の shift-up によって比増殖速度は 0.48 hr^{-1} から 0.8 hr^{-1} に増加した。この shift-up によって得られた増殖の非定常状態においても菌体内蛋白質、遊離 amino acid および遊離 pyrimidien nucleotide 含量は一定であったが、RNA および purine nucleotide 含量は比増殖速度の増加に伴い増加した。特にエネルギー源としてより重要である adenine nucleotide 含量の変化率よりも、guanine nucleotide 含量の変化率の方が大きく、shift-up と同時に培養液に guanine を添加することにより非定常状態は約半分に短縮された。さらに菌体内 GTP 含量は shift-up と同時に急激な増加を示した。

これらのことから増殖の律速段階は蛋白質合成段階であり、この蛋白質比合成速度は rRNA 含量により、また rRNA 比合成速度は guanine nucleotide 含量により制御されていることが判った。

第2章 適応過程の増殖の速度論的解析

第1章で得た結果より増殖速度式を得るため次のような仮定をした。

- 1) 蛋白質合成速度は臨界含量 (R_{xc}) 以上の rRNA 含量および制限基質濃度に対する saturation kinetics に従い、この蛋白質合成段階が増殖の律速段階である。
- 2) rRNA 合成速度は臨界含量 (N_{xc}) 以上の nucleotide 含量の saturation kinetics に従い、rRNA は一分子的に分解する。
- 3) nucleotide 含量は比増殖速度に比例する。
- 4) 適応過程において rRNA および蛋白質合成因子 G が外部基質より合成され、一分子的に分解する。
- 5) 制限基質消費速度は増殖速度に比例する。

以上の仮定により次のような増殖の適応過程をも表わす増殖速度式を導いた。

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{a}{X} \frac{dp}{dt} = \frac{V_1 \left(\frac{R}{X} - R_{xc} \right)}{K_1 + \left(\frac{R}{X} - R_{xc} \right)} \frac{S}{K_s + S} \dots\dots\dots (1)$$

$$\frac{1}{X} \frac{dR}{dt} = \frac{V_2 \left(\frac{N}{X} - N_{xc} \right)}{K_2 + \left(\frac{N}{X} - N_{xc} \right)} - k_1 \left(\frac{R}{X} - R_{xc} \right) \dots\dots\dots (2)$$

$$\frac{N}{X} = \frac{b}{X} \cdot \frac{dX}{dt} + N_{xc} \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{V_m S}{K_m + S} - k_2 G \quad \dots\dots\dots (4)$$

$t=0$ で $K_m \ll S$, $G=G_s$ として(4)式を解き, G の蛋白質および rRNA 合成への関与率を f_1 , f_2 とすると

$$V_1 = V_{1m}(1 + f_1 G_s)\{1 + D_1(1 - e^{-k_2 t})\} \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$V_2 = V_{2m}(1 + f_2 G_s)\{1 + D_2(1 - e^{-k_2 t})\}$$

$$D_1 = \frac{f_1 \left(\frac{V_m}{k_2} - G_s \right)}{1 + f_1 G_s}, \quad D_2 = \frac{f_2 \left(\frac{V_m}{k_2} - G_s \right)}{1 + f_2 G_s}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad \dots\dots\dots (6)$$

ここで X : 菌体濃度, P : 蛋白質濃度, R : rRNA 濃度, N : nucleotide 濃度, S : 制限基質濃度, G : 蛋白質質および rRNA 合成因子含量, $R_{xc}: \mu=0$ における rRNA 含量, $N_{xc}: \mu=0$ における nucleotide 含量, a : 蛋白質含量を表す定数, b : 比例定数, V_{1m} , V_{2m} : G の最大合成速度, K_m : G 合成における飽和定数, k_1 , k_2 : 合成された rRNA および G の分解速度定数, Y : 収率因子, K_1 , K_2 : 蛋白質および rRNA 合成における飽和定数。

以上のような(1)~(6)式を Runge-Kutta-Gill 法により数値計算を行った結果, 非定常状態の実験値と良好な一致を示し, さらに種々の条件の菌体を接種菌体としたとき, 接種菌体の増殖していた環境と新しい環境条件との差が大きいほど, 誘導期が長くなるという現象をも現わすことができた。

第3章 *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産性

Adenine 要求株 *Bacillus subtilis* KYA 741 は soluble starch によって多量の α -amylase の生産を誘導されたが, maltose および glucose によっては誘導されず, 逆に抑制作用がみられた。また高初期濃度の soluble starch によって α -amylase 生産速度は抑制され, これは α -amylase による soluble starch の主分解産物が maltose であり, 培養液中に多量蓄積していたことから, この抑制は maltose によるものと推察された。37°C の培養温度で adenine を増殖制限基質とした増殖静止期において40時間も α -amylase 生産は持続し, 制限基質である adenine を増殖静止期において添加し, 増殖の回復がみられても α -amylase 生産は抑制されず, 逆に促進された。この増殖静止期において制限基質である adenine の不完全消費がみられ, この残存 adenine を除去することによって α -amylase 生産は抑制された。さらに ^{32}P - H_3PO_4 の DNA への, ^3H -uracil の RNA への取り込みが増殖静止期にみられ, DNA および RNA の合成が行なわれていることが判明した。RNA 合成阻害剤である Actinomycin D, rifampicin, DNA 合成阻害剤である mitomycin C による, RNA および DNA 合成阻害と同時に α -amylase 生産も阻害された。これらのことから *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産の preferential synthesis の要因は, 増殖制限基質の不完全消費による残存 adenine を用いた DNA および mRNA の turnover にも

とづくものであることが判った。また酵素生産中の培養液は、glucose を炭素源として増殖した非誘導菌体に対して α -amylase 生産を誘導することができたが、酵素生産停止後の培養液では誘導することができなかった。このことから α -amylase 生産の停止は誘導物質である soluble starch の生産された α -amylase による分解に伴う誘導物質の欠除によるものであることが推察された。

第4章 α -Amylase 生産の速度論的解析

第3章で得た結果より α -amylase 生産速度式を得るため次の仮定をした。

- 6) 菌体内 DNA 含量は一定であり、DNA 比合成速度は菌体当りの adenine 量に対する saturation kinetics に従い、DNA は一分子的に分解する。
- 7) 制限基質である adenine の消費速度は増殖速度に比例する。
- 8) α -Amylase の mRNA 合成は soluble starch によって、誘導遅れ時間、 t_e 、をもって誘導されるが、soluble starch 分解産によって阻害される。mRNA 比合成速度は adenine 濃度に対する saturation kinetics に従う。この mRNA は一分子的に分解する。
- 9) α -Amylase 比生産速度は mRNA 量に比例する。
- 10) Soluble starch 分解速度は α -amylase 量に比例し、soluble starch に対して saturation kinetics に従う。starch 分解産物生成速度は starch 分解速度に比例する。

以上の仮定より次の式を導いた。

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\frac{V_1}{b} \cdot A/X}{K_{A_1} + A/X} - k_1 \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/A}} \frac{dX}{dt} \quad \dots\dots\dots (8)$$

$$\frac{1}{X} \frac{dR}{dt} = \frac{V_2 \cdot A}{K_{A_2} + A} \cdot \frac{S}{(K_s + S)(1 + P/K_i)} - k_2 \quad \dots\dots\dots (9)$$

$$t \leq t_e \text{ のとき } dR/dt = 0$$

$$\frac{1}{X} \frac{dE}{dt} = a \cdot \frac{R}{X} \quad \dots\dots\dots (10)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_3 ES}{K_m + S} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \quad \dots\dots\dots (11)$$

ここで X : 菌体濃度, A : adenine 濃度, R : mRNA 濃度, S : saluble starch 濃度, E : α -amylase 活性, P : starch 分解産物濃度, a : 酵素比生産速度定数, b : DNA 含量を表わす定数, V_1, V_2 : DN A および mRNA 最大比合成速度, K_{A_1}, K_{A_2}, K_s : DNA および mRNA 合成における飽和定数, K_i : 阻害定数, k_1, k_2 : DNA および mRNA 分解速度定数, k_3 : starch 分解速度定数, K_m : starch 分解における飽和定数, $Y_{X/A}, Y_{P/S}$: 収率因子。

以上導かれた(7)~(11)式を Runge-Kutta-Gill 法によって数値計算した結果、adenine の初期濃度およ

び培養温度などの α -amylase 生産に対する影響などをよく表わすことができた。

結 論

Bacillus subtilis の適応過程の増殖と α -amylase 生産の生理学的ならびに速度論的検討により次の結論を得た。

1. *Bacillus subtilis* の増殖の律速段階は蛋白質合成段階であり、蛋白質比合成速度は rRNA 含量により、また rRNA 比合成速度は nucleotide 含量により制御される。
2. 1)～2) の仮定により導かれた増殖速度式は環境変化に伴う適応過程をも含めた増殖過程を表わすことができた。
3. *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産は増殖静止期において長時間の持続性を示し、この preferential synthesis の要因は増殖制限基質である adenine の不完全消費にもとづく残存 adenine を用いた DNA および mRNA の turnover によるものである。
4. 6)～10) の仮定により導かれた α -amylase 生産速度式は adenine の初期濃度および培養温度の α -amylase 生産に対する影響など、*Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産様式をよく表わすことができた。

論文の審査結果の要旨

醗酵プロセスの設計および制御の基礎として、微生物の増殖および生産物の生成過程の定式化を目的とし、適応過程をも含めた *Bacillus subtilis* の増殖および α -amylase の生産過程を生理学的ならびに速度論的に検討し、次の結論を得た。

- 1) *Bacillus subtilis* の増殖の律速段階は蛋白質合成段階であり、蛋白質比合成速度は rRNA 含量により、また rRNA 比合成速度は nucleotide 含量により制御される。
- 2) 1) の実験結果に基づいて導かれた増殖速度式は環境変化に伴う適応過程をも含めた増殖過程を定量的に表わすことができた。
- 3) *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産は増殖静止期において長時間の持続性を示し、この preferential synthesis の要因は増殖制限基質である adenine の不完全消費にもとづく残存 adenine を用いた DNA および mRNA の turnover によるものである。
- 4) 3) の実験結果に基づいて導かれた α -amylase 生産速度式は適応過程をも含めた *Bacillus subtilis* KYA の α -amylase 生産様式を定量的によく表わすことができた。

したがって本論文は薬学博士の学位を授与するに値するものである。