

Title	Pseudomonas のアミラーゼ遺伝子に関する研究
Author(s)	藤田, 昌也
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36959">https://hdl.handle.net/11094/36959</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	ふじ 藤	た 田	まさ 昌	や 也
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	8967	号	
学位授与の日付	平成2年2月2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	<b><i>Pseudomonas</i> のアミラーゼ遺伝子に関する研究</b>			
論文審査委員	(主査)			
	教授	二井 将光		
	(副査)			
	教授	吉田 敏臣	教授 岡田 弘輔	教授 今中 忠行
	教授	大嶋 泰治	教授 菅 健一	教授 山田 靖宙
	教授	高野 光男		

### 論文内容の要旨

*Pseudomonas* 属細菌が菌体外に分泌するアミラーゼのうち、イソアミラーゼはデンプン様多糖類の分岐点を構成する 1, 6- $\alpha$ -D-グリコシド結合を特異的に加水分解する酵素として、またマルトテトラオース生成アミラーゼ ( $G_4$ -アミラーゼ) はデンプンをエキソ型に加水分解してマルトテトラオース ( $G_4$ ) を生成する酵素として、前者はマルトースの、後者はマルトテトラオースの工業生産において重要な役割を果たしている。本研究開始以前には、両酵素に関して、蛋白質化学的研究は詳細になされていたものの、遺伝子レベルでの研究は皆無であった。本論文は、初めて両酵素の遺伝子レベルでの解析に取り組んだ結果、両酵素遺伝子のクローニングに成功し、これらのDNAの塩基配列を決定し、さらに両遺伝子の発現調節機構についての研究をまとめたものであり、5つの章からなっている。

第1章では、*P. amyloclavata* SB-15のイソアミラーゼ遺伝子 (*iam*) のクローニング、DNA塩基配列の決定を行ない、イソアミラーゼの一次構造を明らかにした。その結果、イソアミラーゼの一次構造にはプルランナーゼ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ等の一次構造の間に保存されている領域が存在し、この領域が活性に関与していることが示唆された。とくに、同じ枝切り作用をもつプルランナーゼの一次構造との比較により、1, 6- $\alpha$ -D-グリコシド結合切断に関与する部位を推定した。

第2章では、イソアミラーゼ遺伝子 (*iam*) の発現調節について解析した。その結果、*iam* の発現はマルトースによって誘導されるが、グルコースによっては抑制されず、その調節は転写レベルでなされていることを明らかにした。さらに、転写開始点を決定し、*iam* プロモーターの配列を推定した。その結果、*iam* プロモーターは *Pseudomonas* 特有のプロモーター配列をもつことが明らかとなった。

第3章では、*P. stutzeri* MO-19の $G_4$ -アミラーゼ遺伝子 (*amy P*) のクローニング、DNA塩基配列の決定を行ない、 $G_4$ -アミラーゼの一次構造を明らかにした。その結果、 $G_4$ -アミラーゼの一次構造には、他の $\alpha$ -アミラーゼの一次構造に保存されている領域が存在し、活性に関与していることが示唆された。さらに配列の特徴から、特異性に関与する部位について考察した。

第4章では、 $G_4$ -アミラーゼ遺伝子 (*amy P*) の発現調節について解析した。その結果、*amy P* の発現はマルトースによって誘導され、グルコースによって抑制され、その調節は誘導に関しては転写レベルで、抑制に関しては転写後レベルでなされていることを明らかにした。さらに転写開始点を決定し、*amy P* プロモーターの配列を推定した。その結果、*amy P* プロモーターは *Pseudomonas* 特有のプロモーター配列をもつことが明らかとなった。

第5章では、本研究で得られた主要な結果の総括と今後の展望について述べている。イソアミラーゼと $G_4$ -アミラーゼの一次構造が明らかになったことにより、イソアミラーゼがデンプンの1,6- $\alpha$ -D-グリコシド結合を切断する機構、 $G_4$ -アミラーゼがデンプンをエキソ型に分解し $\alpha$ -マルトテトラオースを生成する機構について、これまでに得られている酵素化学的知見とあわせて、アミノ酸残基レベルで考察できるようになった。さらに、遺伝子の部位特異的変異によるアミノ酸残基置換を導入することにより、本酵素の特異性に関し、反応速度論的性質、熱安定性、基質特異性、至適pHなどを改変することが可能となった。

一方、*iam* と *amy P* の発現を制御するプロモーター領域の解析により、両遺伝子は *Pseudomonas* 特有のプロモーター配列を持ち、糖によって発現が制御されていることが明らかになった。したがって、*Escherichia coli* や *Bacillus* 属に比べて解析が遅れている *Pseudomonas* 属の遺伝子発現のモデル系として、*iam* あるいは *amy P* を用いることにより、*Pseudomonas* の遺伝子発現の制御機構に関する研究が大きく発展するものと期待される。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、マルトースおよびマルトテトラオースの工業生産に重要な役割を果たしているマルトテトラオース生成アミラーゼ ( $G_4$ -アミラーゼ) およびイソアミラーゼの遺伝子レベルの研究を行ったものである。両酵素の遺伝子レベルの解析から、次のような重要な知見を得ている。

- (1) *P. amyloclavata* のイソアミラーゼ遺伝子のDNA塩基配列を決定し、本酵素の一次構造を明らかにしている。さらに一次構造の解析から、本酵素の活性に関与している領域を推定している。
- (2) イソアミラーゼ遺伝子のプロモーター配列を同定し、発現調節機構を明らかにしている。
- (3) *P. stutzeri* の $G_4$ -アミラーゼ遺伝子のDNA塩基配列を決定し、本酵素の一次構造を明らかにしている。同時に一次構造の解析から、本酵素の活性に関与している領域を推定している。さらに、本酵素の遺伝子のプロモーターを固定し、その発現はマルトースによって誘導され、グルコースによって抑制されることを見出している。

(4) 特異性の改変, 熱安定化等をふくめ, これら2つのアミラーゼの工業的生産に関して新しい展望を示している。

以上本研究は *Pseudomonas* の遺伝学, アミラーゼの生化学に貢献するものであり, 2つの特異的なアミラーゼの工業生産に重要な知見を与えるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。