

Title	Genetic Studies on Cell Wall Hydrolases of the Genus Bacillus.
Author(s)	黒田, 章夫
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38652
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名 黒 田 章 夫

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 8 1 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 4 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 名 Genetic Studies on Cell Wall Hydrolases of the Genus *Bacillus*.
(バチルス属細菌の細胞壁溶解酵素に関する遺伝学的研究)論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 今 中 忠 行

教 授 高 野 光 男 教 授 大 嶋 泰 治 教 授 新 名 惇 彦

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、バチルス属細菌の細胞壁溶解酵素遺伝子のクローニング並びにその発現制御機構に関してまとめたもので、緒論、本論（六章）及び結論から構成されている。

緒論では、本研究の背景をなす知見、特に *Bacillus subtilis* の細胞壁溶解酵素に関する生化学、遺伝学的知見を総括し、つづいて本研究の目的とその内容の概略を述べている。

第一章では *B. subtilis* 及び *Bacillus licheniformis* における細胞壁溶解酵素の発現制御遺伝子 (*flaD* 及び *flaL*) の一次構造を明らかにしている。

第二章では複数存在する *B. subtilis* 細胞壁溶解酵素遺伝子のうち、*cwlA* をクローニングし、その一次構造を明らかにしている。またその遺伝子産物の解析を行い、細胞壁ペプチドグリカン中の N-アセチルムラミン酸と L-アラニンの間を切断するアミダーゼ活性を示すことを述べている。

第三章では *B. licheniformis* 細胞壁溶解酵素遺伝子 *cwlM* をクローニングし、その一次構造を明らかにしている。その遺伝子産物はアミダーゼ活性を示し、また C 末端領域にみられるアミノ酸配列の繰り返しが基質特異性に関与していることを示している。

第四章では複数存在する *B. subtilis* 細胞壁溶解酵素遺伝子のうち、*cwlB* をクローニングし、その一次構造を明らかにしている。また *cwlB* の上流には分子量 75kDa の細胞壁結合蛋白をコードする遺伝子 (*cwbA*) がオペロンとして存在する可能性を示している。

第五章ではその細胞壁結合蛋白 CwbA の一次構造を明らかにし、またその性質について解析を行い、CwlB の細胞壁溶解活性を促進することを明らかにしている。また *cwbA* の上流にはさらにリポ蛋白をコードすると考えられる遺伝子 *lppX* が存在することを推定している。

第六章では、*cwlB* オペロン (*lppX-cwbA-cwlB*) は主に σ^D 型 RNA ポリメラーゼで転写されることを示している。また *flaD* による *cwlB* オペロンの転写制御は σ^D 蛋白の量的な変化によることを明らかにしている。

結論においては以上の成果を要約し、今後の課題について展望している。

論文審査の結果の要旨

細菌の細胞壁溶解酵素は自己の細胞壁の分解、代謝を通して種々の生理的現象に関与する酵素であるが、生体内で過剰に働いた場合いわゆる自己溶解という現象を引き起こす酵素でもある。本論文は工業上重要な菌株であるバチルス属細菌において、その細胞壁溶解酵素構造遺伝子及び制御遺伝子の一次構造とその転写制御機構についての研究をまとめたもので以下に示すような重要な知見を得ている。

- (1) 細胞壁溶解酵素構造遺伝子として、*Bacillus subtilis* から *cwlA*, *cwlB* を、また *Bacillus licheniformis* から *cwlM* をクローニングし、その一次構造を決定している。さらにこれらの遺伝子産物の一次構造の比較及び遺伝子欠失実験を行い、それらの活性中心を含む領域を推定している。また CwlB については細胞壁結合領域を、CwlM についてはその基質特異性に関与する領域を推定している。
- (2) CwlA, CwlB, CwlM を精製し、すべて細胞壁ペプチドグリカン中の N-アセチルムラミン酸と L-アラニンの間を切断するアミダーゼ活性を示すことを明らかにしている。
- (3) *B. subtilis* において *cwlB* 欠損株を作成し、それが自己溶解に対して耐性を示すことを明らかにしている。
- (4) *B. subtilis* において *cwlB* はリポ蛋白をコードすると考えられる *lppX* と CwlB の細胞壁溶解活性を活性化する細胞壁結合蛋白をコードする *cwbA* とオペロンを形成していることを明らかにしている。また CwbA は CwlA, CwlM の細胞壁溶解活性も活性化することを明らかにしている。
- (5) 細胞壁溶解酵素の発現制御を行う遺伝子 (*flaD*, *flaL*) の一次構造を決定し、*flaD* が孢子形成制御遺伝子 (*sin*) と同一であることを示している。さらにその *flaD* 遺伝子産物が転写制御因子であるシグマ D 蛋白の発現に影響を与えることによって *cwlB* の発現を制御していることを明らかにしている。また細胞壁溶解酵素欠損株 (*flaD* 変異株) において多面形質変異を示す理由の一つとしてシグマ D 蛋白の発現が抑制されているためであることを明らかにしている。

以上のように本論文はこれまでに明らかにされていなかったバチルス属細菌の細胞壁溶解酵素構造遺伝子とその発現制御について遺伝学的に研究し、自己溶解という現象に対して多くの基礎的知見を与えており、微生物遺伝学、応用生物工学の発展に寄与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。