Osaka University Knowledge Archive

Title	好熱好アルカリ性 Bacillus 属細菌由来の巨大アミラーゼに関する研究
Author(s)	李, 相弼
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39113
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏　　名	李（り）　相弼（さんびる）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学位記番号	第　11546　号
学位授与年月日	平成6年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科　醗酵工学専攻
学位論文名	好熱好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌由来の巨大アミラーゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授　今中　忠行 教授　大嶋　泰治　教授　山田　靖宙　教授　菅　健一 教授　新名　惇彦　教授　卜部　格　教授　塩谷　捨明 教授　吉田　敏臣　教授　二井　將光

論文内容の要旨

本論文は，好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. XAL601 由来の新規アミラーゼ／プルラナーゼについて検討したものである。

第1章では，高温およびアルカリ性の条件で生育ができ，アミラーゼを分泌生産する株を土壌から分離し，本菌が分泌生産するアミラーゼ／プルラナーゼの基本性質を調べて，本酵素がアルカリ性および耐熱性を有することを確認している。また，枯草菌を宿主として酵素構造遺伝子のクローニングを行い，枯草菌内での発現に成功している。

第2章では，枯草菌用のベクターにクローニングされている本酵素の構造遺伝子を大腸菌由来のベクターにサブクローニングし，本酵素の遺伝子が大腸菌内でも効率良く発現することを明らかにしている。また，アミラーゼ／プルラナーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し，そのアミノ酸配列を明らかにすると共に，他の遺伝子との相同性を調べている。その結果，本酵素の構造遺伝子はアミラーゼとしては非常に長いこと，および本酵素は α－アミラーゼの4つの保存領域（Region1－4）を有し，*Clostridium* 属由来の α－アミラーゼ活性とプルラナーゼ活性を両方とも保持する酵素と最も相同性が高いことを明らかにしている。さらに，C 末端側には6アミノ酸残基（Gly－Ser－Gly－Thr－Thr－Pro）が12回繰り返される72アミノ酸残基のヒンジ（hinge）領域が存在することも示している。

第3章では，アミラーゼ構造遺伝子を大腸菌のプロモーターに連結し，大腸菌を宿主として発現を行い，その大量生産に成功している。また，大量発現された本酵素の精製及び基本性質検討を行い，本酵素が α－アミラーゼ活性とプルラナーゼ活性を両方とも保持すると共に耐熱性及びアルカリ性酵素であることを明らかにしている。

第4章では，枯草菌用の低コピープラスミドに本酵素遺伝子の全領域をクローニングし，枯草菌を宿主として発現させた結果，本酵素は枯草菌内でプロセッシングを受けることを証明している。枯草菌で生産された2つのアミラーゼをそれぞれ精製して大腸菌から得られた酵素と基本性質を比較した結果，至適温度はほとんど変化が見られなかったが，至適 pH は本酵素の分子量減少に伴ってアルカリから中性側へ変化していることを明らかにしている。

また，元株，大腸菌および枯草菌で生産された粗酵素液について糖鎖の有無を確認し，元株ではアミラーゼ活性を有する糖蛋白質が生産されていることを証明している。

総括では，以上の結果を要約し，将来展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は，耐熱性およびアルカリ性の新規アミラーゼ／プルラナーゼの取得のために，目的とする条件で生育するアミラーゼ／プルラナーゼ生産菌を土壌から分離し，構造遺伝子のクローニングと塩基配列決定を行ったものである。また，大腸菌と枯草菌を宿主として本酵素遺伝子の大量発現を行い，酵素の大量生産に成功している。さらに，遺伝子組換え体から得られた酵素を用い，その基本性質を調べこの酵素が新規アミラーゼ／プルラナーゼであることを証明している。これらの成果を要約すると以下のようになる。

(1) 元株と組換え体から生産された酵素が高い至適温度と pH を有することおよびアミラーゼとプルラナーゼ活性を保持することから，目的の耐熱性アルカリ性アミラーゼ／プルラナーゼが取得されていると考察している。

(2) 耐熱性アルカリ性アミラーゼ／プルラナーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し，この酵素の構造遺伝子はいままで知られている細菌由来のアミラーゼとその関連酵素の構造遺伝子より約3－4倍長いことを明らかにしている。さらにC 末端側には6アミノ酸残基（Gly－Ser－Gly－Thr－Thr－Pro ）が12回繰り返される72アミノ酸残基のヒンジ領域が存在していることから，その役割について考察している。

(3) 酵素遺伝子を転写融合的に大腸菌のプロモーターに連結し，大腸菌内での高発現に成功している。大量生産した酵素を精製し，基本性質検討，分子量測定および基質に対する反応様式検討を行い，この酵素がいままで報告されたアミラーゼやその関連酵素とは性質が異なる新規酵素であることを考察している。

(4) 枯草菌用の発現プラスミドを構築し，枯草菌内ではこの酵素がプロセッシングされることを明らかにしている。生産された酵素を精製し大腸菌から得られた酵素と基本性質を比較することにより，この酵素は分子量減少に従って至適 pH がアルカリから中性側に変化していることを証明し，この酵素の C 末端側にはアルカリ性を支配するドメインが含まれていると考察している。

以上のように，本論文は耐熱性アルカリ性である新規アミラーゼ／プルラナーゼの取得に成功し，醗酵工学に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。