

報告番号 乙第 4414 号

## 主論文の要旨

題名

Application of Genetic Engineering to Useful  
Enzyme Production from Bacteria and Plant Cells  
(遺伝子工学的手法による細菌及び  
植物細胞由来の有用酵素生産)

氏名 魚住信之



## 主論文の要旨

報告番号	※ 乙第	号	氏名
			魚住信之
<p>生物体及び生体化合物の合成方法及び設計図は全て遺伝子に書き込まれている。遺伝子操作は、核酸（DNA、RNA）を有する生物は全てに於て可能である。このことは人工的に生物機能を改変することが可能であることを意味し、実際に自然界には存在しなかった生体化合物及び生物が作られている。本論文では、遺伝子の構成様式の全く新しい知見、遺伝子より合成される酵素の人工的改変による触媒機構の解析及び遺伝子導入植物を用いた有効物質生産方法についての成果を示した。</p> <p>酵素は基質特異性を持ち、選択的にある化学反応を触媒することから、工業生産においても広く用いられている。生物はエネルギー源として糖を消費しているがデンプンと呼ばれる糖の重合体から分解産物であるグルコースやマルトースを生産する際に糖加水分解酵素（アミラーゼ）が使用される。アミラーゼは澱粉の鎖を間からランダムに切断する<math>\alpha</math>-アミラーゼと非還元末端から二単糖（マルトース）単位で分解する<math>\beta</math>-アミラーゼがある。<math>\beta</math>-アミラーゼは微生物由来の酵素が使用されているのに対して、<math>\beta</math>-アミラーゼは植物由来の酵素が使用されている。工業生産段階では生産性、機能性などの面から植物や動物由来から微生物由来の酵素に変更されていくのが一般的であり、更に質のよい<math>\beta</math>-アミラーゼを探るため細菌由来の<math>\beta</math>-アミラーゼとその遺伝子について検討した。</p> <p><i>Bacillus polymyxa</i>は<math>\beta</math>-アミラーゼを生産する細菌として知られている。分子量として70,56,48,42kDalのアミラーゼを培地中に生産する。それぞれ4種類のアミラーゼを精製し性質を調べたところ、70,56,42kDalは<math>\beta</math>-アミラーゼであり、48kDalは<math>\alpha</math>-アミラーゼであることが明らかになった。一方、遺伝子をクローン化して全塩基配列を明らかにした。3588bpからなる分子量約130kDalのタンパク質をコードしていた。構造遺伝子の中ごろに300bpからなる反復配列が存在し、5'領域と3'領域に二分された。この反復配列は類縁菌の染色体には存在しない<i>B. polymyxa</i>に特徴的である。アミノ酸配列の結果から70,56,42kDalの<math>\beta</math>-アミラーゼはN末端アミノ酸配列が同一で5'領域にコードされていた。48kDalの<math>\beta</math>-アミラーゼのN末端アミノ酸は修飾されていて明らかではないが、リジルエンドペプチターゼで消化した断片の部分アミノ酸配列は3'領域の配列に完</p>			

## 主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名
			魚住信之
<p>全に一致した。更にプロテアーゼ阻害剤のキモトリプシンを培養液中に添加したところ、130kDalの前駆体アミラーゼが生産されていた。この酵素を精製したところ<math>\beta</math>-アミラーゼ及び<math>\alpha</math>-アミラーゼの両活性が検出された。以上の結果から、<i>Bacillus polymyxa</i>は一つの遺伝子から二種類の酵素を生産する機構ををつことが証明された。この一遺伝子二酵素機構は世界で初めての報告となった。</p> <p><math>\beta</math>-アミラーゼはSH基試薬により活性が阻害されることから、システイン(Cys)が活性触媒に寄与していると考えられていた。ところが最近、化学修飾方法を用いた実験から、Cysは活性中心残基ではないという示唆がなされた。そこでCysの役割を明らかにするために<i>B. polymyxa</i>の<math>\beta</math>-アミラーゼ遺伝子を用いて部位特異的変異法(site-directed mutagenesis)による解析を行った。<i>B. polymyxa</i>の<math>\beta</math>-アミラーゼは3残基のCysを保持している。これらのCysについて、N末端アミノ酸から数えて、83番目のCysをセリン(C83S)、91番目のCysをバリリン(C91V)、323番目のCysをセリン(C323S)そして3残基全てを上記のアミノ酸に変換した変異<math>\beta</math>-アミラーゼ(C-free)をそれぞれ作製した。これらの<math>\beta</math>-アミラーゼを枯草菌において分泌させた後精製する系を確立した。野性型とC91Vを用いた化学修飾実験よりCys83とCys91はSS結合を形成していることが明らかとなり、Cys323は解離型であった。4種類の変異<math>\beta</math>-アミラーゼはそれぞれが触媒に十分な活性があった。またpCMB(<i>p</i>-chloromercuribenzoate)を添加してもC323S及びC-freeは阻害を受けなかった。以上の結果からSH基試薬はCys323に選択的に結合し立体障害的に活性を阻害しており、<math>\beta</math>-アミラーゼの活性中心にはCys残基は含まれないことを証明した。</p> <p><math>\beta</math>-アミラーゼ活性中心残基を探る目的でC末端アミノ酸領域の遺伝子に終始コドンを導入して短縮<math>\beta</math>-アミラーゼを大腸菌で生産させた結果、N末端アミノ酸から248アミノ酸が活性には必要であることがわかった。この領域にはヒスチジン(His)が81番目に1残基存在する。他の加水分解酵素がHisを活性中心にもつことから、His81をロイシン(Leu)に変換した<math>\beta</math>-アミラーゼ(H81L)を作成した。<math>\beta</math>-アミラーゼ活性阻害剤として合成された EPGは163番目のグルタミン酸(Glu)に結合し活性中心残基として推定されている残</p>			

## 主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名
			魚住信之
<p>基である。この残基をグルタミン(Gln)に置換した変異<math>\beta</math>-アミラーゼ(E163Q)を作製した。活性量については、野性型酵素に比べてH81Lは100の1に低下したが有意な<math>\beta</math>-アミラーゼ活性は維持された。E163Qは10,000の1以下に低下したことから、Glu163は活性中心残基と考えられた。</p> <p>遺伝子導入植物の毛状根を用いて、化学試薬として広く使用されているペルオキシダーゼ生産量の増大及び分泌を検討した。通常、毛状根は本来の根という器官の生育条件と二次代謝産物の光による分解を考慮して暗黒下で培養されることが多いが、ペルオキシダーゼ生産については検討されていない。またペルオキシダーゼの分泌生産を行うための安価な添加剤としてNaClを選択し、細胞に刺激を与えることによるペルオキシダーゼ分泌の促進を目的とした。光照射により細胞増殖は促進され、到達細胞密度では暗条件、NaCl無添加の場合の13.5g-乾燥重量/lに対して明条件、NaCl無添加の場合は15.7g-乾燥重量/lと増大し、16%の増加が見られた。光照射は多数の緑芽が現れること、毛状根の太さが暗条件に比べ3倍程度に肥大化すること及び毛状根自体が緑化するといった様に、形態的にも大きな変化をもたらした。ペルオキシダーゼ生産は培地中ペルオキシダーゼ活性では明条件の方が若干高い値であるが、細胞内ペルオキシダーゼ生産量は光照射により約2倍の増加が見られた。分泌性(細胞内ペルオキシダーゼ活性と培地中ペルオキシダーゼ活性を加えた総ペルオキシダーゼ活性に対する培地中ペルオキシダーゼ活性の割合)ではNaCl無添加の場合は明条件の方が低い値を示した。</p> <p>一方、NaCl添加の効果は添加濃度の上昇にともない培地中ペルオキシダーゼ活性は向上し、それに反して細胞の増殖は阻害を受ける傾向があり、これまでに知られている分泌促進方法と同様であるがNaCl100mM添加の場合でも到達細胞重量は33%程度の減少にとどまり、致命的なダメージは受けていない。ペルオキシダーゼ分泌は最も効果の高かった明条件、NaCl100mMは通常の培養法である暗条件、NaCl無添加の場合に比べて約5倍ものペルオキシダーゼ、分泌性で比較しても15%から34%へと2倍以上向上した。</p>			

## 主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	魚住信之
<p>上記の実験結果に基づいた最適条件下でペルオキシダーゼ回収を行う培養を行った。培地中ペルオキシダーゼ活性が10U/mlを越えたところで培地を全量吸着カラムに通し、その後3~4日毎にこの操作を繰り返して培養43日までに6回行ったところ、培地中ペルオキシダーゼ活性について通常の培養では培養34日以降ペルオキシダーゼの分泌は停止しているため、ペルオキシダーゼによる生産物阻害があることが示唆される。これは細胞の増殖に対しても同様なことが考えられ、培地成分の流加は行っていないにもかかわらず、吸着カラムを用いた場合には到達細胞重量で36%もの増加が見られた。</p> <p>植物細胞の高密度培養には流加培養法が有効である。最初に各培地成分の増殖収率を求め、毛状根の生育に合わせた改変MS培地の組成を決定した。植物細胞の培養には炭素源にスクロースが利用されるが、培養液中のインペルターゼでグルコースとフルクトースに分解され、培養液中に3種類の糖が混在し流加培養の際には糖濃度の制御が難しい。ニンジン毛状根及びアジュガ毛状根において炭素源の検討を行ったところ、フルクトースおよびグルコースがそれぞれ細胞増殖に適していた。培養液の電気伝導度を一定に保つように、最適な単糖及び濃縮培地を流加してリアクター培養を行ったところ、ニンジン毛状根においては30.1g-乾燥重量/l、アジュガ毛状根においては27.2g-乾燥重量/lの高密度培養が達成された。この値は、TBRおよび三角フラスコによる回分培養に比べて2-5倍であった。</p> <p>植物毛状根は生長点のみで細胞分裂することから、増殖速度が一定となる次の方程式が成立する。</p> $-dx/dt = mX + (dX/dt)Y_G \quad (1)$ <p><math>m</math>:維持エネルギー <math>Y_G</math>:増殖収率 <math>X</math>:細胞量 <math>S</math>:糖量 <math>t</math>:時間</p> <p>単糖を炭素源にすることで、糖源に対する維持エネルギー及び細胞収率の決定は単純化された。単糖を用いた流加培養から導いたニンジン毛状根及びアジュガ毛状根の両者の値を求めた。微生物と比較して維持エネルギーが植物細胞では低かった。植物細胞は、多細胞生物であり、各細胞の役割分担ははっきり区別されていること、運動性がないこと等の理由から、単細胞生物に比べて低いエネルギー源で細胞の維持が可能であると予想できる。この維持エネルギーは、流加培養の際の流加量の目安となる。</p>				