

〔醸酵工学 第66巻 第3号 163-180. 1988〕

総 合 論 文

微生物の酵素生産に関する基礎的研究

(昭和62年度 日本醸酵工学会斎藤賞受賞)

今 中 忠 行

大阪大学工学部醸酵工学科

Microbial enzyme production. —Monograph— TADAYUKI IMANAKA (*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565*) *Hakkokogaku* 66: 163-180. 1988.

A number of useful enzymes have been produced in industry using specific microorganisms. To enhance the enzyme productivity, two basic approaches are available: ① control of environmental factors such as cultivation temperature, pH, and substrate concentration; ② genetic engineering, i.e., cloning of the enzyme gene and the optimum control of the gene expression. Using these techniques, enzyme productivity can be enhanced. The following examples are discussed.

- (1) Optimization of α -galactosidase production by mold.
- (2) Transformation of a thermophile, *Bacillus stearothermophilus*, with plasmid DNA.
- (3) Molecular cloning of thermostable enzyme genes (α -amylase, neutral protease) in *B. stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*.
- (4) Cloning of the penicillinase genes of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, and *B. stearothermophilus*.
- (5) Exploitation of protein secretion vectors using the penicillinase gene.

1. はじめに

各種生体における素反応を触媒する酵素は数千種類に及び、その中のかんりの有用酵素が微生物培養により生産されている。その生産性向上を目指して形質発現の調節を行うためには、次のような基本的手法が有効であろう。①培養温度、pH、基質濃度などの細胞外環境因子を最適に操作することにより、間接的に形質発現を調節する方法。②遺伝情報の基であるDNAのクローニングとその形質発現調節機構の直接的改変を行う、いわゆる遺伝子工学的的手法。ここではこれらの手法を用いて、酵素生産性を向上させた例を順次述べることにする。ただ項目が多岐にわたっているので、詳細な背景説明は割愛し、われわれの実験データを中心に説明させて頂きたい。

2. 糸状菌による α -ガラクトシダーゼ生産の最適化¹⁻³⁾

2.1. α -ガラクトシダーゼ生産菌の分離

甜菜糖工業において、糖蜜中のラフィノースは製糖期間中漸次増加し、スクロースの結晶化を妨害し、製品甜菜糖の品質および収率を低下させる。今、微生物の生産する α -ガラクトシダーゼを用いてラフィノースをガラクトースとスクロースに分解することができれば、糖蜜中のラフィノースによる妨害作用を除去できるばかりでなく、スクロースの増収も図ることができ、鈴木ら⁴⁾が開発したこの方法が工業的にも利用されてきた。

この目的のためには、 α -ガラクトシダーゼを有し、かつインベルターゼを生産しない微生物が必要である。

また、連続酵素反応を行う場合、菌体そのものを固定化酵素的に利用して酵素の再使用を行うのが有利であり、この見地から α -ガラクトシダーゼは菌体内酵素であることが望ましく、さらに菌体の汙別を容易にするために糸状菌が好適である。

土壌試料より、上記目的に合致する糸状菌を分離した。顕微鏡観察および培養試験により、本菌を *Monascus purpureus* の類縁菌株と判定した。また本菌の生産する α -ガラクトシダーゼはその反応最適 pH が 4.5 であり、55°C 以下で安定であった¹⁾。

2.2. 酵素誘導特性

本菌の α -ガラクトシダーゼはガラクトース、メリビオース、ラフィノースおよびスタキオースにより誘導される菌体内酵素であるが、これらの誘導物質はグルコースに比して高価なので、グルコースによって菌体を増殖させガラクトースによって酵素の誘導、生産を行わせるプロセスを最適化検討のためのモデルシステムとして採用した。

本菌のグルコースを炭素源とした培養では酵素は生産みれず、ガラクトースを基質とした培養においては、酵素は菌体増殖に比例的に生産された。またグルコースとガラクトースを同時に炭素源として与えた回分培養では、典型的な二段階増殖を示した。すなわち、最初グルコースのみが消費され酵素は生産されず、グルコースがほとんど消費された後、ガラクトースの消費と酵素生産が開始され、グルコースが酵素生産を抑制することが示唆された¹⁾。

そこで酵素誘導とその抑制についてより詳細に検討した。ガラクトース培地で酵素誘導を行わせると 80 分の lag の後、酵素生産が始まり、酵素生産中に 0.05% 以上のグルコースを添加すると 40 分後に酵素生産は停止した。ガラクトースの細胞膜透過系は構成的であり、グルコースの添加によりガラクトースの細胞内への取り込みは直ちに完全に阻害された²⁾。酵素誘導とその抑制に長時間を要する主因は、ガラクトースの膜透過系にあるのではなく、細胞内での物質移動やリプレッサーおよび mRNA の合成、分解過程にあると考えられる。ガラクトースを含む糖混合液を用いての酵素生産実験により、ガラクトースが消費される時のみ酵素が生産されることが判明した。

単一炭素源を用いて連続培養を行った結果、菌体増殖は常に Monod の式に従うことが判明し、同一温度ではグルコースの方がガラクトースで培養した場合より、最大比増殖速度 (μ_m) と菌体収率 (Y) は大となり、

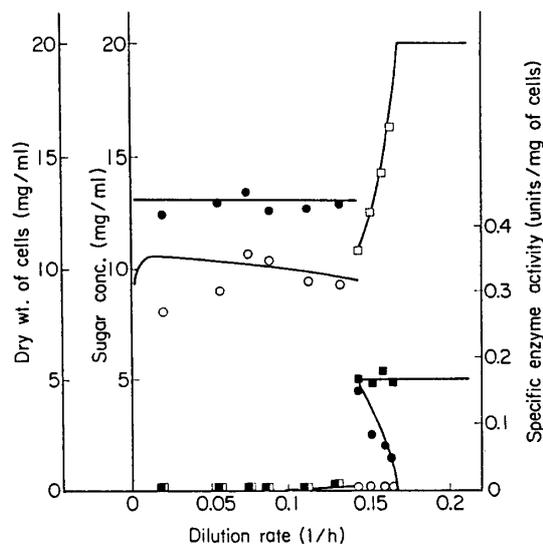


Fig. 1. Steady-state relationships in a single-stage continuous culture at 30°C (shift-up system). Carbon sources were 2% glucose and 0.5% galactose, □ Glucose, ■ Galactose, ● Cell mass, ○ α -Galactosidase.

飽和定数 (K_s) は小となった。同じ糖を用いた場合には、30°Cの方が35°Cの時よりも μ_m と Y が大となり、 K_s は同じ (グルコースを用いた場合) かまたは小 (ガラクトースを用いた場合) となった。

グルコースとガラクトースを同時に用いた場合、グルコースはある臨界濃度以上でガラクトースの細胞膜

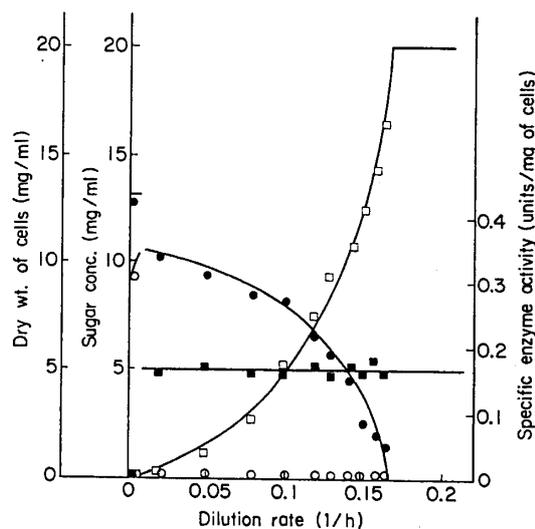


Fig. 2. Steady-state relationships in a single-stage continuous culture at 30°C (shift-down system). Carbon sources were 2% glucose and 0.5% galactose, □ Glucose, ■ Galactose, ● Cell mass, ○ α -Galactosidase.

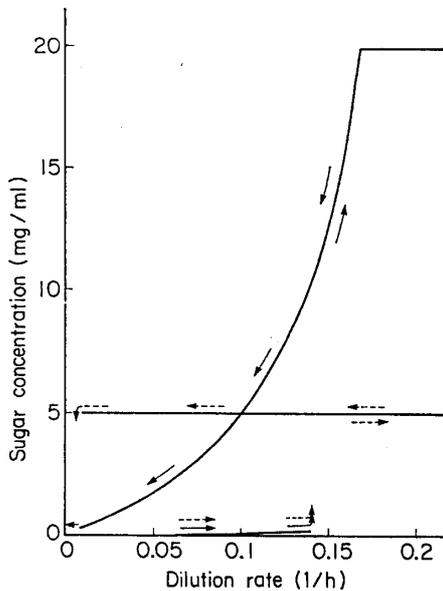


Fig. 3. Steady-state relationships between sugar concentrations and dilution rate.

This is the "hysteresis phenomenon in continuous culture". \leftarrow : Glucose, \leftarrow : Galactose.

透過を完全に阻害し、ガラクトースはグルコースの資化を拮抗的に阻害した。その結果、稀釈率を変化させて得られる定常状態において、菌体量、糖濃度、酵素の比活性曲線は不連続であり (Fig. 1, 2), μ_m より低い稀釈率で washout が起こり、同一の稀釈率であるにもかかわらず shift-up system と shift-down system で定常状態の異なるいわゆる "ヒステリシス現象" が観察された (Fig. 3)。

2.3. 酵素生産モデル

本菌による α -ガラクトシダーゼ生産の最適化を行うために、得られた実験データを基にして菌体増殖および細胞内での酵素生産に関する数学モデルを提唱した。微生物の特性である増殖や適応過程をモデルにする場合、全ての現象を素反応の組合せで表すことは不可能であるから、工学的に有意義な因子を抽出し、生物現象の本質を失わない範囲内で可能な限り簡素な数式モデルを立てることに留意した。すなわち、本菌による α -ガラクトシダーゼ生産の特徴はこの酵素が誘導的に合成される菌体内酵素であることから、菌体増殖、基質の細胞膜透過および細胞内での酵素誘導機構を有機的に組合せたモデルをたてた。

菌体増殖モデル¹⁾

本菌のグルコース消費速度は Monod 型を示し、ガラクトースによる拮抗阻害の項を加えて(1)式で示す。

$$\begin{aligned} \frac{dS_A}{dt} &= -\frac{X}{Y_A} \cdot \frac{\mu_m S_A}{K_{SA} + S_A + \frac{K_{SA}}{K_i} S_B} \\ &= -\frac{\mu_A}{Y_A} X \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 X = 菌体濃度、 S = 糖濃度、 μ = 比増殖速度、 K_s = 飽和定数、 K_i = 阻害定数、 Y = 収率定数。

添字 A = グルコース、B = ガラクトース、m = 最大値。

ガラクトースの消費速度も Monod 型を示すので

$$\frac{dS_B}{dt} = -\frac{X}{Y_B} \frac{\mu_m S_B}{K_{SB} + S_B} = -\frac{\mu_B}{Y_B} X \quad (2)$$

グルコースとガラクトースを同時に資化する場合を含めた総括菌体増殖速度は(3)式で示す。

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= X \left\{ \frac{\mu_m S_A}{K_{SA} + S_A + \frac{K_{SA}}{K_i} S_B} + \frac{\mu_m S_B}{K_{SB} + S_B} \right\} \\ &= X(\mu_A + \mu_B) = \mu X \end{aligned} \quad (3)$$

ただし、酵素誘導を抑制するのに必要な臨界グルコース濃度を S_{AC} とすれば、 $S_A \geq S_{AC}$ の時、ガラクトースは資化されないので $\mu_B = 0$ とおくことができる。

酵素生産モデル²⁾

α -ガラクトシダーゼ生産をモデル化するにあたり、次の諸点を特に考慮した。

1) 酵素生産の動力学モデルはオペロンモデルを基礎にして誘導した。

2) 微生物の培養系における菌体集団には、完全な同調培養が行われていない限り、細胞レベルでの全ての菌令のものが分布していると考えられる。しかし本菌は糸状菌であり、個々の細胞の菌令分布を正確に把握することが困難だけでなく、細胞内でのアミノ酸のターンオーバーも考えられ、さらに α -ガラクトシダーゼの誘導とその抑制実験において、培養経過を菌体集団の平均値として取り扱っても支障がないことから、細胞内での各反応速度は実時間を基準にして示した。

3) 細胞内では各成分の物質移動 (分子拡散など) も起こっていると考えられるが、本モデルでは、物質移動に要する時間を生化学反応速度定数に総括的に包含させた。

4) 本菌の α -ガラクトシダーゼの真の誘導物質は定かではないので、ガラクトースを誘導物質としてモデルをたてた。

菌体増殖モデルと細胞内諸反応を連結するものとして、糖の細胞膜透過機構を考慮した。今、単位菌体重

量当たりの細胞内のガラクトース量を S_{Bi} とする。糖の細胞膜透過速度は一般にその出入とも Michaelis-Menten 型で表されるが、本モデルは細胞からの糖の流出速度は細胞内の糖濃度に比例するとした。一方、細胞内のガラクトースは 1 分子反応で消費されると仮定すれば次式が成立する。

$$\begin{aligned} \frac{1}{X} \frac{d(S_{Bi}X)}{dt} &= \frac{1}{X} \left\{ S_{Bi} \frac{dX}{dt} + X \frac{dS_{Bi}}{dt} \right\} \\ &= U \left\{ \frac{G_B S_B}{K_{mB} + S_B} - S_{Bi} \right\} - k_1 S_{Bi} \\ \frac{dS_{Bi}}{dt} &= U \left\{ \frac{G_B S_B}{K_{mB} + S_B} - S_{Bi} \right\} - k_1 S_{Bi} - \mu S_{Bi} \end{aligned} \quad (4)$$

ここで U = 定数, G_B = 定数, K_m = 定数

添字 i = 細胞内

$S_A \geq S_{AC}$ の時, ガラクトースは細胞内に取り込まれないので $U=0$ とおくことができる。

細胞内でのリプレッサー合成速度は一定であると仮定する。単位菌体量当たりのリプレッサー量 (R) は 1 分子的に分解し、誘導物質であるガラクトースとは可逆的に結合して不活性化されると考えられるので、比リプレッサー合成速度は、ガラクトースの場合と同様に

$$\frac{dR}{dt} = k_2 - k_3 R - k_4 R S_{Bi} + k_5 \overline{R S_{Bi}} - \mu R \quad (5)$$

ここで $\overline{R S_{Bi}}$ = リプレッサーと誘導物質 (ガラクトース) との複合体の量。mRNA 量 (M) は 1 分子的に分解されると考えられる。今、mRNA の合成を完全に抑制するリプレッサーの臨界量を R_c とおく。mRNA の合成速度はリプレッサー量とその臨界値との差に比例すると仮定すれば、mRNA の濃度変化は次式で示される。

$$\frac{dM}{dt} = k_6 (R_c - R) - k_7 M - \mu M \quad (6)$$

ここで $R \geq R_c$ の時, リプレッサーがその臨界濃度以上あれば mRNA は合成されないで、計算上は $R = R_c$ とおくことができる。

酵素合成速度は mRNA 濃度に比例すると考えられる。本酵素は、この実験条件下では安定であったので酵素の分解は無視し得る。したがって酵素生産速度は次のようになる。

$$\frac{dE}{dt} = k_8 M - \mu E \quad (7)$$

またリプレッサー・ガラクトース複合体の濃度変化

速度は次式で与えられる。

$$\frac{d\overline{R S_{Bi}}}{dt} = k_4 R S_{Bi} - k_5 \overline{R S_{Bi}} - \mu \overline{R S_{Bi}} \quad (8)$$

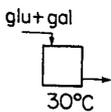
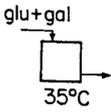
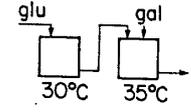
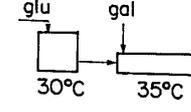
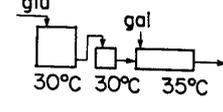
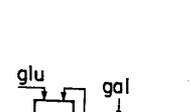
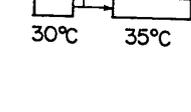
ここで k_j ($j=1, 2, \dots, 8$) = 反応速度定数

菌体増殖および酵素生産モデルをもとにして、単槽連続培養における物質収支式をたて、これより定常状態における各物質濃度を導き、実験的に決定できる定数値の他、細胞内反応速度定数のごとく予測不可能な諸定数を試行錯誤的に検討することにより、グルコースとガラクトースを同時に与える連続培養系の比酵素活性の実験値と計算値を一致させることができた。しかしその他のモデルでは実験結果を満足に説明することができなかった。さらに本モデルを用いて、酵素誘導とその抑制、グルコース、ガラクトースまたはその両者を炭素源とした場合の回分培養、および連続培養の定常、非定常過程の実験結果をすべて表現することが可能なことを確認し、本モデルの妥当性を明白にした^{1,2)}。

2.4. 酵素生産の最適化

多段連続培養による酵素生産プロセスの最適培養方式と最適条件について検討した。すなわち、操作変数を培地流量、槽容積および培養温度とし、評価関数を酵素の生産性としてこれを最大にする操作条件を検討した。その結果、30°C でのグルコースによる菌体増殖と 35°C でのガラクトースによる酵素生産が有利であることが判明した。単槽、2 槽、槽型と管型反応器を組合わせた場合、槽型 2 つと管型反応器を組合わせた場合、および槽型の菌体再使用系と管型反応器を組合わせた場合の連続培養方式について、本モデルを用いて計算により、最適操作条件下における酵素の生産性を比較検討した (Fig. 4)。その結果、菌体再使用系における菌体循環率を示す定数 C が 1.34 以上の場合は、槽型の菌体再使用系と管型の組合わせが最適となり、 $1 \leq C \leq 1.34$ においては、完全混合槽 2 つと管型反応器を直列に組合わせた培養方式が最適であることが判明し、後者の場合にはその最適操作条件下で、702 units/l·h なる酵素生産性の値が得られた。これは単槽連続培養で得られる最大の酵素生産性を 25.6% 上回るものであった³⁾。さらに単槽、2 槽、および槽型と管型反応器を直列に接続した連続培養を行った結果、いずれの実験でも計算結果を再現することができた。

このように、糸状菌による α -ガラクトシダーゼ生産を対象として、その醸酵プロセスに内在する諸特性

Type of fermentation process	Optimum operating conditions	Specific enzyme activity, (units/mg of cells)	Enzyme productivity (units/l·h)
	$D=0.142(1/h)$ shift-up system	0.325	554
	$D=0.121(1/h)$ shift-up system	0.500	559
	$D_1=0.200(1/h)$ $D_2=0.250(1/h)$ $\bar{D}=0.118(1/h)$	0.293	415
	$D_1=0.133(1/h)$ $D_2=0.286(1/h)$ $\bar{D}=0.097(1/h)$	0.500	582
	$D_1=0.193(1/h)$ $D_2=2.342(1/h)$ $D_3=0.286(1/h)$ $\bar{D}=0.117(1/h)$	0.500	702
	$D_1=0.178(1/h)$ $D_2=0.286(1/h)$ $\bar{D}=0.117(1/h)$ $C=1.34$	0.500	702
	$D_1=0.266(1/h)$ $D_2=0.286(1/h)$ $D=0.145(1/h)$ $C=2.00$	0.500	870

glucose = 2%, galactose = 0.5%.

Fig. 4. Comparison of various enzyme production processes.

を生理的、培養工学的観点から解明することによって菌体増殖と酵素生産に関する数学モデルを誘導するとともに、多段連続培養における酵素生産の最適条件を求めることができた。

3. プラスミド DNA による *Bacillus stearothermophilus* の形質転換

3.1. 好熱性細菌における宿主・ベクター系の利点

微生物種の中には 55°C 以上の高温環境下で増殖する好熱性細菌が存在する。これらは一般に高い増殖速度を示し、かつ、その生産する各種酵素は熱や化学的変性剤に対して耐性が強いという特徴を示している。したがって、遺伝子操作技術を好熱性細菌に適用することができれば、常温菌を宿主とする場合と比較して次のような種々の利点を生かすことが期待できよう⁵⁻⁷⁾。

(1) 好熱菌由来の耐熱酵素遺伝子をクローン化し、効

率のよい形質発現と遺伝子増幅により、耐熱酵素の生産性を高める。

(2) 大型発酵槽での培養において、冷却費を低減することができる⁸⁾。

(3) 一般に増殖速度が大であり（世代時間、約15分）、培養時間を短縮することができる。

(4) 高温培養が可能であり、雑菌汚染の危険が軽減される。

(5) 室温では増殖できない（もしくは死滅する）ので、宿主・ベクター系として安全である。

(6) 好熱菌における各種（常温菌由来や好熱菌由来）遺伝子の形質発現と遺伝子産物を比較検討することにより、好熱菌における耐熱機構の分子の解明など基礎的研究が可能になる。

さて、遺伝子操作技術は、安定に複製・維持される有効なベクターと効率のよい形質転換法が備わっていれば、好熱菌を宿主として利用することも可能である。

しかし、これら2点が相互に補完関係にあるため、実際に新しい宿主・ベクター系を開発する場合には、両者を並列的に検討しなければならなかった。

3.2. 宿主菌の選定

ある特定遺伝子をクローン化し、これら類縁菌相互にそれぞれ移入して、常温菌と好熱菌における形質発現とその産物を比較することは、好熱菌の特性を解明するためにも重要な方法となろう。また、大腸菌などのグラム陰性細菌では有用酵素などを培地中に分泌した例があまりなく、工場規模で有用物質の発酵生産と分離・回収を考える場合には、分泌機構を有する *Bacillus* 属細菌が望ましい。以上の点を考慮して、好熱性宿主菌として *B. stearothermophilus* を選択した。

具体的には、本菌種の基準菌株である *B. stearothermophilus* ATCC12980 を使用した。本菌株は各種抗生物質（アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、テトラサイクリンなど）に対する感受性が高く、薬剤耐性をマーカーとする形質転換株の選択が容易であると考えた。本株は18.3メガダルトン (Md) の潜在性プラスミド pBSO1 を保持していた。そこで、本菌の識別を容易にするためにストレプトマイシン (500 µg/ml) に耐性 (Sm^r) となった自然突然変異株 S1 を分離し、これより pBSO1 を除去した菌株 CU21 を形質転換実験の宿主菌として用いた⁹⁾。

3.3. *B. stearothermophilus* の形質転換法⁹⁾

Bacillus 属細菌を宿主とする遺伝子操作技術は *B. subtilis* を中心として進展しており、コンピテントセル (competent cell) 法¹⁰⁾ やプロトプラスト (protoplast) 法¹¹⁾ による形質転換実験によって、プラスミド DNA の *B. subtilis* への移入が行われている。*Bacillus licheniformis* ATCC 9945A FD 0120 株などのコンピテント細胞は、染色体 DNA の組換えによる形質転換が可能であるにもかかわらず、プラスミド DNA により形質転換されることはなかった¹²⁾。これに対し、*B. licheniformis*¹²⁾、*Bacillus megaterium*¹³⁾、*Bacillus thuringiensis*¹⁴⁾ などのプロトプラストは、プラスミド DNA により形質転換される。したがって *B. stearothermophilus* の形質転換法の開発に当たっては、調製条件の設定が困難な（あるいは不可能かもしれない）コンピテントセル法ではなく、プロトプラスト法について検討を加えた。

すなわち、Chang と Cohen のプロトプラスト法¹¹⁾ による *B. subtilis* の形質転換法を基本として、プラス

ミド DNA による *B. stearothermophilus* の形質転換を行った。しかし、*B. stearothermophilus* ATCC 12980 の生育最低温度および最高温度がそれぞれ 40°C と 70°C であり、室温では急激に死滅することから、操作温度の変更が必要であった。本菌は 4°C 以下では休眠状態をとり、生菌数の低下があまり認められなかったため、操作温度はすべて 40°C 以上または 4°C 以下になるように設定した。

本方法はプロトプラストの調製、ポリエチレングリコール (PEG) 処理によるプラスミド DNA の細胞内への移入、細胞壁の再生および形質転換株の選択から成っているが、その詳細は原報⁹⁾ を参照して頂きたい。

3.4. 好熱菌で利用可能なベクター・プラスミドの選定

好熱菌 *B. stearothermophilus* CU21 を宿主として利用可能なベクター・プラスミドを選択するに当たって、まず同属の常温菌 *B. subtilis* を形質転換し得る各種薬剤耐性プラスミドを供与 DNA として用いた。*B. stearothermophilus* の形質転換株の分離を試みた結果、pUB110 と pTB19 を用いた場合にのみ形質転換株が得られ、それぞれ Km^r と Km^rTc^r の表現型を示した⁹⁾。pTB19¹⁵⁾ は *B. stearothermophilus* を形質転換することができたが、*B. subtilis* を宿主として分離した pTB19 由来の小型プラスミド (*Eco*RI 処理断片の組合わせ) pTB51, pTB52, pTB53 では *B. stearothermophilus* の形質転換株を得ることができなかった。

したがって、同様の手法により *B. stearothermophilus* の形質転換系を利用して、好熱菌内で複製可能な小型プラスミドの作成を試み、小型プラスミド pTB90 を得ることができた。これらを用いて *B. subtilis* の形質転換を試みた結果、pTB90 では Km^rTc^r 株が得られた。

pTB19, pTB90, pTB51, pTB52 および pTB53 また、pTB90 由来の各種小型プラスミドの制限酵素切断地図を Fig. 5, 6 に示す¹⁶⁾。

次に3種のプラスミド (pUB110, pTB19 および pTB90) について、好熱菌の形質転換頻度をまとめたのが Table 1 である⁹⁾。pUB110 による形質転換頻度は、その調製源 (*B. subtilis* と *B. stearothermophilus*) が異なっても大差はなく、再生菌当たり 1~6×10⁻³ 程度であった。これに対し、*B. subtilis* から調製した pTB19 や pTB90 を用いて形質転換した場合には、いずれも *B. stearothermophilus* から調製したプ

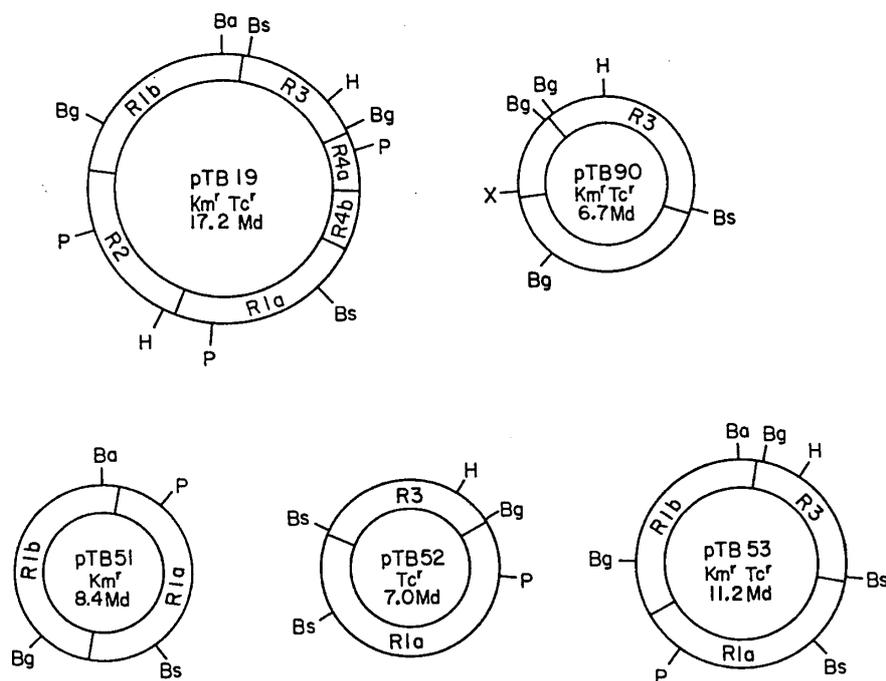


Fig. 5. Restriction endonuclease cleavage maps of plasmids. Cleavage sites of *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*EII, *Pst*I, *Hind*III, and *Xba*I are indicated by Ba, Bg, Bs, P, H, and X, respectively. Cleavage sites of *Eco*RI are indicated by the bars inside the circles.

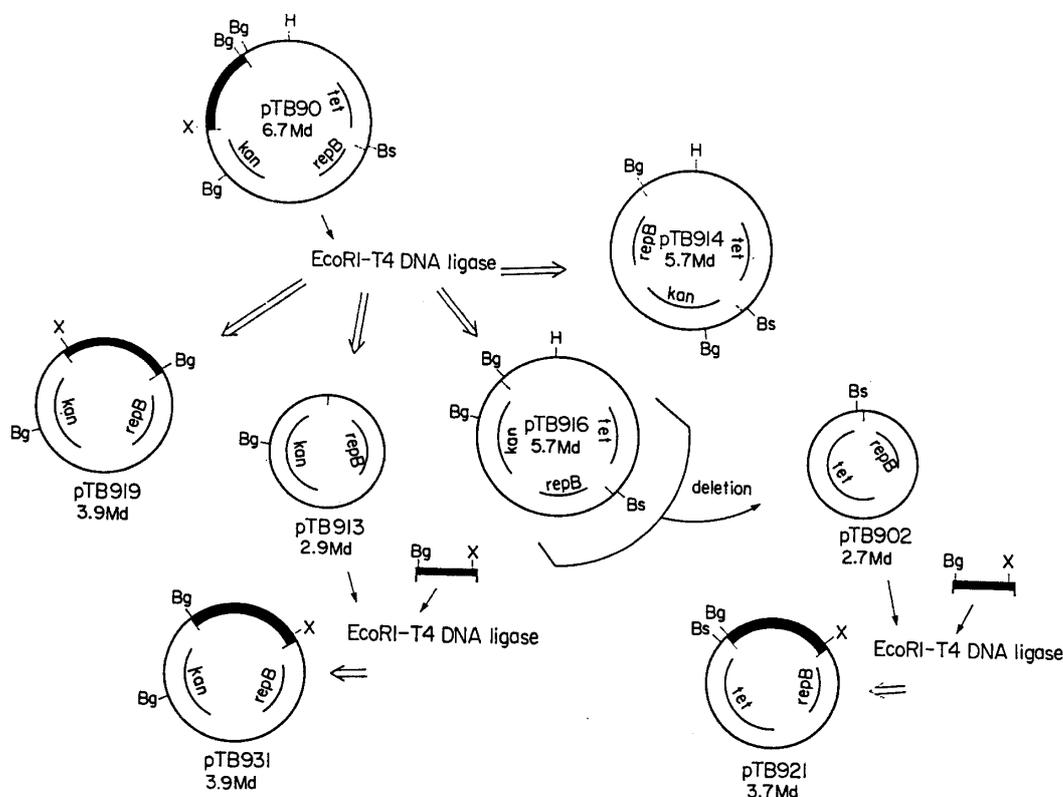


Fig. 6. Restriction endonuclease cleavage maps of plasmids. Cleavage sites of *Bgl*II, *Bst*EII, *Hind*III, and *Xba*I are indicated by Bg, Bs, H, and X, respectively. The bars inside the circles indicate the cleavage sites of *Eco*RI. The heavy line corresponds to the 1.0 Md *Eco*RI fragment.

Table 1. Transformation of *B. stearothermophilus* CU21 with plasmid DNA.

Plasmid	Source ^a	Antibiotic ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Transformants per μg of DNA	Transformation frequency per regenerant
pUB110	<i>B. sub.</i> MI113	Km (25)	1.6×10^5	1.6×10^{-3}
pUB110	<i>B. stearo.</i> CU21	Km (25)	5.9×10^5	5.9×10^{-3}
pTB19	<i>B. sub.</i> MI113	Km (25)	4.9×10^3	4.9×10^{-5}
pTB19	<i>B. sub.</i> MI113	Tc (5)	9.0×10^3	9.0×10^{-5}
pTB19	<i>B. stearo.</i> CU21	Km (25)	1.0×10^5	1.0×10^{-3}
pTB19	<i>B. stearo.</i> CU21	Tc (5)	5.5×10^5	5.5×10^{-3}
pTB90	<i>B. sub.</i> MI113	Km (25)	2.2×10^4	2.2×10^{-4}
pTB90	<i>B. sub.</i> MI113	Tc (5)	2.6×10^4	2.6×10^{-4}
pTB90	<i>B. stearo.</i> CU21	Km (25)	1.3×10^7	1.3×10^{-1}
pTB90	<i>B. stearo.</i> CU21	Tc (5)	2.0×10^7	2.0×10^{-1}

^a *B. sub.*, *Bacillus subtilis*; *B. stearo.*, *Bacillus stearothermophilus*.

^b Km, kanamycin; Tc, tetracycline.

ラスミドを用いた時より、その頻度はかなり低下していた。

この原因として、*B. subtilis* から調製した pTB19 や pTB90 が *B. stearothermophilus* の形質転換の際に宿主菌の保有する制限酵素 *Bst*PI により制限を受けているためであり、pUB110 には *Bst*PI の切断点が存在しないので、その調製源による形質転換頻度の差が生じなかったことが明かである。pTB90 を用いた場合には、高頻度で *B. stearothermophilus* の形質転換が可能であり、再生菌の約20%、 $1 \mu\text{gDNA}$ 当たり 2×10^7 の形質転換株が出現した⁹⁾。この値は pC194 や pUB110 による *B. subtilis* プロトプラストの形質転換頻度 (再生菌の80%、 $1 \mu\text{gDNA}$ 当たり 4×10^7)¹¹⁾ と同程度に高い値であり、pUB110 による *B. megaterium* の形質転換 (再生菌の2%、 $1 \mu\text{gDNA}$ 当たり 2×10^5)¹³⁾ や pBC16 による *B. thuringiensis* の形質転換 (再生菌の 3×10^{-7})¹⁷⁾ と比較して高頻度であるといえる。

3.5. *Bacillus* プラスミドの DNA 複製

pTB19 由来の小型プラスミドであっても、*B. stearothermophilus* と *B. subtilis* を共に形質転換できるプラスミド (pTB90 など) もあれば、*B. subtilis* のみを形質転換できるプラスミド (pTB53 など) も得られた¹⁶⁾。これらの DNA 複製機構を詳細に検討した結果、pTB90 などの多コピー数プラスミドには、*repB* 遺伝子が^{16,19)}、pTB53 などの低コピー数プラスミドには *repA* 遺伝子²⁰⁾ が存在することが判明した。RepB タンパク質は負に作用する制御因子であり¹⁹⁾、RepA は正

に作用する制御因子である²⁰⁾ことも明らかにされた。この研究過程で得られた各種プラスミドの特性を Table 2 にまとめた。これらのコピー数は1~214の範囲にあり、目的に応じて最適コピー数のプラスミドをベクターとして利用することが可能になった。

4. 耐熱性分泌酵素の生産

微生物起源の諸酵素が工業的に利用されはじめて久しいが、量的に主要な位置を占めるのはアミラーゼとプロテアーゼであろう。その用途も広く、 α -アミラーゼはデンプン液化、醸造工業、糊抜き、消化剤などに、プロテアーゼ (アルカリ性、中性、酸性) は醸造工業、洗剤、消化剤、消炎酵素剤などに利用されてきた²¹⁾。一方、これら有用酵素の生産菌は多様で、それぞれ自然界から分離後、突然変異による高生産株として選択されたものといえよう。しかし近年、遺伝子操作技術が広く普及した結果、酵素構造遺伝子のクローン化と遺伝子増幅効果による生産性増強が報告されるようになってきた。ここでは分泌酵素であるアミラーゼとプロテアーゼの生産について述べる。

4.1. 耐熱性アミラーゼ遺伝子のクローニング

Bacillus 属細菌はアミラーゼやプロテアーゼなど多種の菌体外酵素を生産する。これら高分子タンパク質の分泌は、細胞膜透過機構などに関する基礎的研究のみならず、応用的立場からも興味もたれている。たとえば有用分泌酵素遺伝子をクローン化し、その生産性向上をはかるのみならず、その分泌機構を利用して他の有用タンパク質を効率よく菌体外に分泌、蓄積す

Table 2. Properties of plasmids.

Plasmid	Size (kb)	Characteristics	Rep	1.5 kb fragment of pBSO2	Copy no. in <i>B. subtilis</i>	Transformation of <i>B. stearothermophilus</i>	Copy no. in <i>B. stearothermophilus</i>
pTB19	26.5	Km ^r Tc ^r	A, B	—	1	+	1
pTB51	12.9	Km ^r	A	—	8	—	
pTB52	10.8	Tc ^r	A	—	9	—	
pTB53	17.2	Km ^r Tc ^r	A	—	8	—	
pRA1	7.4	Km ^r	A	—	8	—	
pRAT1	3.5	Km ^r	A	—	8	—	
pRAT11	2.6	Km ^r	A	—	8	—	
pTB90	10.3	Km ^r Tc ^r	B	+	11	+	5 (18)
pTB914	8.8	Km ^r Tc ^r	B	—	13	+ ^a	43
pTB916	8.8	Km ^r Tc ^r	B	—	15	+ ^a	— ^b
pTB913	4.5	Km ^r	B	—	25	+ ^a	39
pTB919	6.0	Km ^r	B	+	13	+	5
pTB931	6.0	Km ^r	B	+	14	+	4
pTB902	4.2	Tc ^r	B	—	24	+ ^a	60
pTB921	5.7	Tc ^r	B	+	13	+	7
pRBT1	3.2	Km ^r	B	—	35	+ ^a	NT
pRBH1	2.3	Km ^r	B	—	42	+ ^a	NT
pRBH1-IR	2.3	Km ^r	B	—	134	+ ^a	NT
pRBHC3	2.3	Km ^r	B	—	134	+ ^a	NT
pRBHC3-IR	2.3	Km ^r	B	—	214	+ ^a	NT
pRBHC7	2.3	Km ^r	B	—	202	+ ^a	NT
pRBHC7-IR	2.3	Km ^r	B	—	214	+ ^a	NT
pUB110 ^c	4.6	Km ^r	B	—	48	+ ^a	50
pUB110dB ^d	2.3	Km ^r	B	—	55	+ ^a	NT

NT, Not tested. (), Copy number in the presence of tetracycline.

^a Low transformation frequency.

^b Deletion plasmid appears frequently.

^c Originally isolated from *Staphylococcus aureus*.

^d A deletion derivative of pUB110.

ることができると考えられるのである。つまり、タンパク質を分泌生産させるほうが、細胞質内に蓄積させるよりも、①生産タンパク質の絶対量を高めることができる、②分離・精製が比較的容易である、③細胞内プロテアーゼで分解されず、生産タンパク質の安定性が増す、などの点で有利である²²⁾。

以上の立場から、すでに多数のアミラーゼ遺伝子がクローン化されている²²⁾。われわれもベクタープラスミド pTB90 や pTB53 を用い、好熱菌 *B. stearothermophilus* CU21 由来の耐熱性 α -アミラーゼ遺伝子をそれぞれクローン化した²³⁾。これらの遺伝子は *B. stearothermophilus* と *B. subtilis* いずれの宿主菌

でも形質発現し、 α -アミラーゼを培地中に分泌した。しかし、Table 3 に示すように、好熱菌由来の遺伝子は常温菌 (*B. subtilis*) より好熱菌で効率的に形質発現することもわかった²³⁾。中性プロテアーゼ遺伝子をクローン化した場合には、対数増殖後期から減衰期にかけて生産されるのに対し、アミラーゼは主として定常期に生産される点に特徴があり、各遺伝子の形質発現時期の差異は *Bacillus* 属細菌の多様な σ 因子に起因すると考えられている。また *B. subtilis* を宿主とした培養後、熱処理することにより宿主菌由来のタンパク質が失活変性するため、耐熱酵素の精製が容易になることが判明した

Table 3. Production of α -amylase by *B. stearothermophilus* and *B. subtilis*.

Strain	Temperature (°C)	α -Amylase (U/mg of cells)		
		late log	stationary	24 h
<i>B. stearothermophilus</i> CU21	55	1.6	2.4	3.9
<i>B. stearothermophilus</i> AN174	55	ND ^a	ND	ND
<i>B. stearothermophilus</i> AN174 (pTB90)	55	ND	ND	ND
<i>B. stearothermophilus</i> AN174 (pAT9)	55	2.7	12.4	20.9
<i>B. subtilis</i> MI113	37	ND	0.1	0.3
<i>B. subtilis</i> TN106	37	ND	ND	ND
<i>B. subtilis</i> TN106 (pTB53)	37	ND	ND	ND
<i>B. subtilis</i> TN106 (pAT5)	37	0.1	0.3	1.1

^a ND, Not detectable (<0.01 U/ml).

4.2. アミラーゼの遺伝子構造とアミノ酸配列

われわれは *B. stearothermophilus* の α -アミラーゼ遺伝子とその周辺領域の DNA 塩基配列を決定した²⁴⁾. GTG の開始コドンで始まる 1647 塩基 (549 アミノ酸に相当) からなるオープンリーディングフレーム, その上流に RNA ポリメラーゼ結合部位のプロモーター (-35 領域と -10 領域) とリボソーム結合部位の SD 配列が認められた. さらにプロモーター上流とタンパク質構造遺伝子下流にそれぞれ 1~2 ヶ所の逆位繰返し配列が認められ, これらが転写終結のターミネーターとして機能していると考えられることから, この α -アミラーゼの発現はモノシストロニックな遺伝子によると思われる.

B. stearothermophilus の培養液から精製した菌体外 α -アミラーゼの NH₂-末端領域のアミノ酸配列を決定することにより, 34 アミノ酸からなるシグナル配列の存在が明らかになった²⁴⁾. また成熟アミラーゼは 515 アミノ酸からなり, 推定分子量は 58779 であった. この DNA 塩基配列より求めた α -アミラーゼのアミノ酸配列を, 他の α -アミラーゼのそれと比較したのが Fig. 7 である²⁵⁾. 第 1 段目に示したのがシグナル配列部であり, *Bacillus* 属細菌の場合は比較的長い (31~41 アミノ酸) が, 高等動物の場合は短い配列 (12~15 アミノ酸) が特徴である.

各アミノ酸配列の相同性をドットプロットマトリックスにより解析した. *B. stearothermophilus* と *B. amyloliquefaciens* の耐熱性 α -アミラーゼは, 高い相同性 (61%) を示し, ラット, マウス, ブタ, ヒトなどの高等動物の α -アミラーゼ間にも高い相同性 (約 80~90%) が認められた. しかし, 好熱菌の耐熱性ア

ミラーゼは, *B. subtilis* のアミラーゼやカビ, 高等動物植物などの耐熱性の低い酵素とはアミノ酸配列にほとんど相同性が認められなかった²⁵⁾.

Fig. 7 に示した 11 種のアミラーゼについての, 相同性解析や, Matsuura ら²⁶⁾ による *Aspergillus oryzae* タカアミラーゼ A の酵素学的解析結果などをもとにして, 計 4 カ所の共通アミノ酸配列領域を見いだした²⁵⁾. これらの領域は, 細菌, カビ, 高等動物のいずれの場合にも保存されており, かつアミラーゼ活性を示すという以外に共通点がないことから, これら 4 カ所の相同領域の存在が α -アミラーゼ活性発現に必須であり, その活性中心と基質の結合部位を含んでいるものと考えられている. このように全く起源の異なる多種の酵素遺伝子をクローニングし, 塩基配列決定により得られたアミノ酸配列を比較して, 酵素活性発現の必須領域を推定することは, 酵素学における遺伝子工学の新しい利用法を示すものといえよう.

4.3. 耐熱性プロテアーゼ遺伝子のクローニング

Bacillus 属細菌のプロテアーゼ遺伝子も多数クローン化されている²²⁾. われわれも好熱菌 *B. stearothermophilus* CU21 由来の耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子をクローン化し, プロテアーゼ生産量の増大を確認することができた (Table 4)²⁷⁾. また構造遺伝子の解析²⁸⁾ と他のプロテアーゼとのアミノ酸配列の比較²⁹⁾ を行ってきた. その方法論はアミラーゼの場合と同様であるから省略し, プロテアーゼの特徴についてのみ簡単に触れておきたい. まずプロテアーゼ遺伝子のクローニングに際して, プロテアーゼ欠損変異株を宿主菌とすることが望まれるのであるが, その取得はアミラーゼの場合ほど容易ではない. なぜならば, 通常生

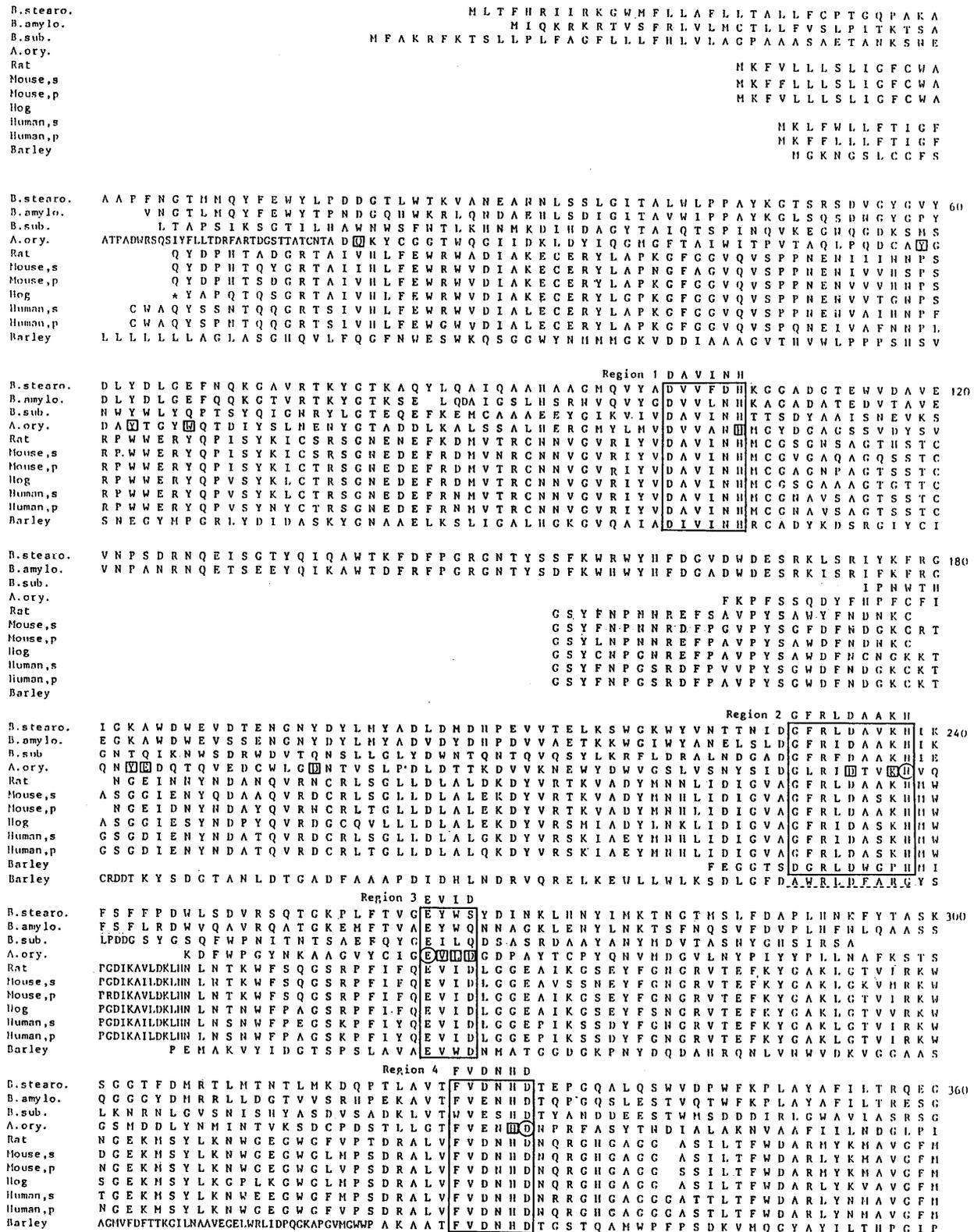


Fig. 7.



Fig. 7. Comparison of amino acid sequences of various α -amylases. Amino acid residues are shown by single letters as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr. Enzyme sources are abbreviated as: B. stearo., *Bacillus stearohermophilus*; B. amylo., *Bacillus amyloliquefaciens*; B. sub., *Bacillus subtilis*; A. ory., *Aspergillus oryzae*; s, saliva; p, pancreas. The first amino acid of extracellular amylase of *B. stearohermophilus*, Ala, is counted as +1. Signal peptides are shown in the first rows. Homologous sequence regions 1, 2, 3, and 4 are surrounded by rectangles. The amino acid sequence described above the rectangular regions was taken as representative of regions 1 to 4. Active sites and those of substrate binding proposed by Matsuura *et al.*²⁶⁾ for Taka-amylase A from *A. oryzae* are indicated by \circ , and \square , respectively. Barley amylase has another sequence somewhat similar to region 2 as shown by a broken underline. *, Pyrrolid-2-one-5-carboxylic acid.

Table 4. Production of extracellular protease by *B. stearohermophilus* and *B. subtilis*.

Strain	Temperature (°C)	Protease (U/mg of cells) ^a at (h)		
		6	9	12
<i>B. stearohermophilus</i> CU21	55	19	17	17
<i>B. stearohermophilus</i> MO-3 ^b	55	5.9	10	5.0
<i>B. stearohermophilus</i> MO-3 (pNP28)	55	210	290	310
<i>B. subtilis</i> MT-2 ^b	37	4.2	7.0	6.2
<i>B. subtilis</i> MT-2 (pNP22)	37	90	210	180

^a Samples were taken at the time indicated, and the protease in the culture supernatant was assayed. Maximum cell growth was observed at around 7h for *B. stearohermophilus* and 10h for *B. subtilis*.

^b No halos were formed in the plate assay by *B. stearohermophilus* MO-3 and *B. subtilis* MT-2; neither strain produced neutral protease on plates.

物には複数のプロテアーゼ遺伝子が存在し（大腸菌の場合少なくとも8種類のプロテアーゼが現在同定されている）³⁰⁾, それらが生体内の代謝調節に直接または間接的に関与している場合が多いためである。また、遺伝子がクローン化されて、プロテアーゼ活性が異常に増大すれば、諸酵素の分解につながることも予想される。不必要なタンパク質分解活性を抑えるために、プロテアーゼは通常プレ・プロ・プロテアーゼとして生成される。分泌の過程でシグナル配列が除去されて、プロ・プロテアーゼとなり、その後のプロセッシングにより NH₂末端側のアミノ酸配列が再度除去されて、成熟プロテアーゼとして培地中に検出される。このような構造は、分泌性の中性およびアルカリ性プロテアーゼについて一般的に認められている。

5. ペニシリナーゼ遺伝子のクローニングとタンパク質分泌用ベクターの開発

5.1. ペニシリナーゼ遺伝子のクローニングと形質発現

われわれは *B. licheniformis* ATCC9945A 株由来の野生型および構成性ペニシリナーゼ遺伝子を、それぞれ pMB9 をベクタープラスミドとして *E. coli* 内でクローン化した¹²⁾。pMB9 に組み込まれた 2.8 Md *EcoRI* 断片上にはペニシリナーゼ構造遺伝子 (*penP*) とそのリプレッサー遺伝子 (*penI*) が存在している。なお、構成性株由来の DNA 断片では *penI* 遺伝子が突然変異したものである。これらの 2.8 Md 断片を、それぞれ *B. subtilis* および *B. licheniformis* 内で

Table 5. Penicillinase activity of plasmid-carrying strains.

Strain	<i>penP</i>	<i>penI</i>	Anti-repressor gene	Plasmid	Copy no. ^a	<i>penP</i>	<i>penI</i>	Penicillinase activity ^b		Induction ratio
								Uninduced	Induced	
<i>E. coli</i>										
C600-1	-	-	-	-				ND ^c		
C600-1	-	-	-	pMB9	high	-	-	ND		
C600-1	-	-	-	pTTE11	high	+	-	6.7		
C600-1	-	-	-	pTTE21	high	+	+	7.5		
<i>B. subtilis</i>										
M1112	-	-	-	-				1.0	0.3	0.3
M1112	-	-	-	pUB110	high	-	-	1.0		
M1112	-	-	-	pTB53	low	-	-	1.0		
M1112	-	-	-	pTTB21	high	+	+	100	87	0.9
M1112	-	-	-	pTTB22	high	+	+	83		
M1112	-	-	-	pTTB32	low	+	-	12,000		
M1112	-	-	-	pTTB42	low	+	+	26	20	0.8
<i>B. licheniformis</i>										
FD0120, R206	+	+	+	-				7.1	930	130
C01	+	-	+	-				3,000	3,200	1.1
M015-1	-	-	+	-				ND		
M015-1	-	-	+	pUB110	high	-	-	0.8		
M015-1	-	-	+	pTB53	low	-	-	ND		
M015-1	-	-	+	pTTB21	high	+	+	87		
M015-1	-	-	+	pTTB22	high	+	+	89	96	1.1
M015-1	-	-	+	pTTB32	low	+	-	10,000		
M015-1	-	-	+	pTTB42	low	+	+	22	88	4.0
R206	+	+	+	pTTB32	low	+	-	84	3,800	45

^a High, 20-50 copies per chromosome; low, 8-10 copies per chromosome.

^b Activities are expressed in units of penicillinase per mg of cells.

^c ND, Not detectable (<0.01 U/mg of cells).

Table 6. Penicillinase activity of *B. stearothermophilus*.

Plasmid	Antibiotic ($\mu\text{g/ml}$)	Growth temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Penicillinase activity (U/mg of cells)	
			Total	Supernatant
None	None	48	ND ^a	— ^b
pTB90	Km (5)	48	ND	—
pLP21	Km (5)	48	90	7.4
pLP21	Km (5)	55	120	—
pLP21	Km (5)	60	17	—
pLP11	Km (5)	48	3,300	820
pLP11	Km (5)	55	610	—
pLP11	Km (5)	60	39	—
pLP11	Km (5)+Tc (1)	48	3,700	510
pLP11	Km (5)+Tc (2)	48	4,700	680
pLP11	Km (5)+Tc (3)	48	6,000	700
pLP11	Km (5)+Tc (4)	48	5,800	750

^a ND, Not detectable (<0.01 U/mg of dry cell weight).

^b —, Not tested.

サブクローニングし、その形質発現量を比較したのが Table 5 である。 *Bacillus* 属細菌内では *penP*, *penI*, いずれも発現すると共に、多量のペニシリナーゼが分泌生産されたが、 *E. coli* ではその活性が極めて低かった。また、これらの 2.8 Md *EcoRI* 断片を pTB90 に組み込んで得た組換えプラスミドをそれぞれ pLP21 (野生型) および pLP11 (構成性) とした。 pLP21 または pLP11 を保持する *B. stearothermophilus* について LG 培地でのペニシリナーゼ生産を比較したのが Table 6 である³¹⁾。プラスミド非保持菌や pTB90 保持菌では、ペニシリナーゼ活性が全く検出されなかった。 pLP21 保持株については、48 $^{\circ}\text{C}$ と 55 $^{\circ}\text{C}$ の培養で約 100 U/mg cell の活性が認められたが、60 $^{\circ}\text{C}$ では 17 U/mg cell と減少していた。一方、pLP11 保持株では、48 $^{\circ}\text{C}$ で 3,300 U/mg cell と比較的高活性のペニシリナーゼが検出されたが、培養温度の上昇につれて急激にその活性が低下した。この活性低下は、培養中における酵素の熱失活などに起因するものと思われるが詳細は明らかではない。同一温度での生産量を、pLP21 保持菌と pLP11 保持菌について比較することにより、構造遺伝子 *penP* のみならずプレッサー遺伝子 *penI* も *B. stearothermophilus* 内で発現していることは明らかである。

ここで用いたベクター・プラスミド pTB90 は Tc 添加により *B. stearothermophilus* 内で増幅されるが、この遺伝子増幅現象がペニシリナーゼ遺伝子を含

む組換えプラスミド pLP11 においても期待できるため、Tc 添加培地でのペニシリナーゼ生産を検討した (Table 6)。添加した Tc 濃度が上昇するにつれてペニシリナーゼ生産性が増大し、Tc 3 $\mu\text{g/ml}$ で最大活性 (6,000 U/mg cell) を示した。これは Tc 無添加の場合の約 2 倍であり、遺伝子投与量効果が認められた。また組換えプラスミド保持株について、その培養液中のペニシリナーゼ活性も測定したが、全酵素活性の約 10~20% が培地中に分泌されていた。本実験で用いたペニシリナーゼ遺伝子を *B. licheniformis* や *B. subtilis* に移入した場合には、それぞれ全活性の 60% および 30% が培養液中に検出された。したがって、好熱菌と常温菌の違いはあってもこれら *Bacillus* 属細菌における細胞外酵素の分泌機構は一部共通性があるものと思われる。

5.2. 枯草菌における分泌ベクターとその利用

大腸菌では、内膜・外膜と 2 種の膜が存在するため、分泌タンパクといっても、外膜カペリプラズムに局在しており、通常、培地中に蓄積されることはない。これに対し、枯草菌は細胞質膜が 1 層であるため、分泌酵素は、膜結合型として細胞表面に位置するか、さらにプロセッシングを経て培地中に蓄積されることになる。この分泌特性を利用して、各種分泌ベクターが作成されている³²⁾。

B. licheniformis のペニシリナーゼは、膜結合型、菌体外の *exo-large* 型と *exo-small* 型の 3 種があり、

それぞれに特異的なプロセッシング部位が存在する。各種分泌用ベクターとカートリッジの組合せにより、シグナル配列の他に、これら3種のプロセッシング部位に相当する配列が、すべてベクター側に適正な相対位置で存在しなければ、効率のよいタンパク質の分泌は起こらないことが示された³³⁾。さらに、タンパク質分泌効率は、シグナル配列と、それに続く異種成熟タンパク質部分の組合せによっても大きく影響されるの

で³⁴⁾、分泌させたいタンパク質の種類に応じて、最良の組合せを検討しなければならないだろう。

具体的な分泌例としては、*penP* を利用した、*B. stearothermophilus* の α -アミラーゼ³⁴⁾ やヒト・プレプロインシュリンおよびヒト・ β -インターフェロンの分泌³⁵⁾、*B. subtilis* の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyE*) を利用したマウス・インターフェロン- β ³⁶⁾ や大腸菌 pBR322 由来の β -ラクタマーゼ³⁷⁾ の分泌、*B.*

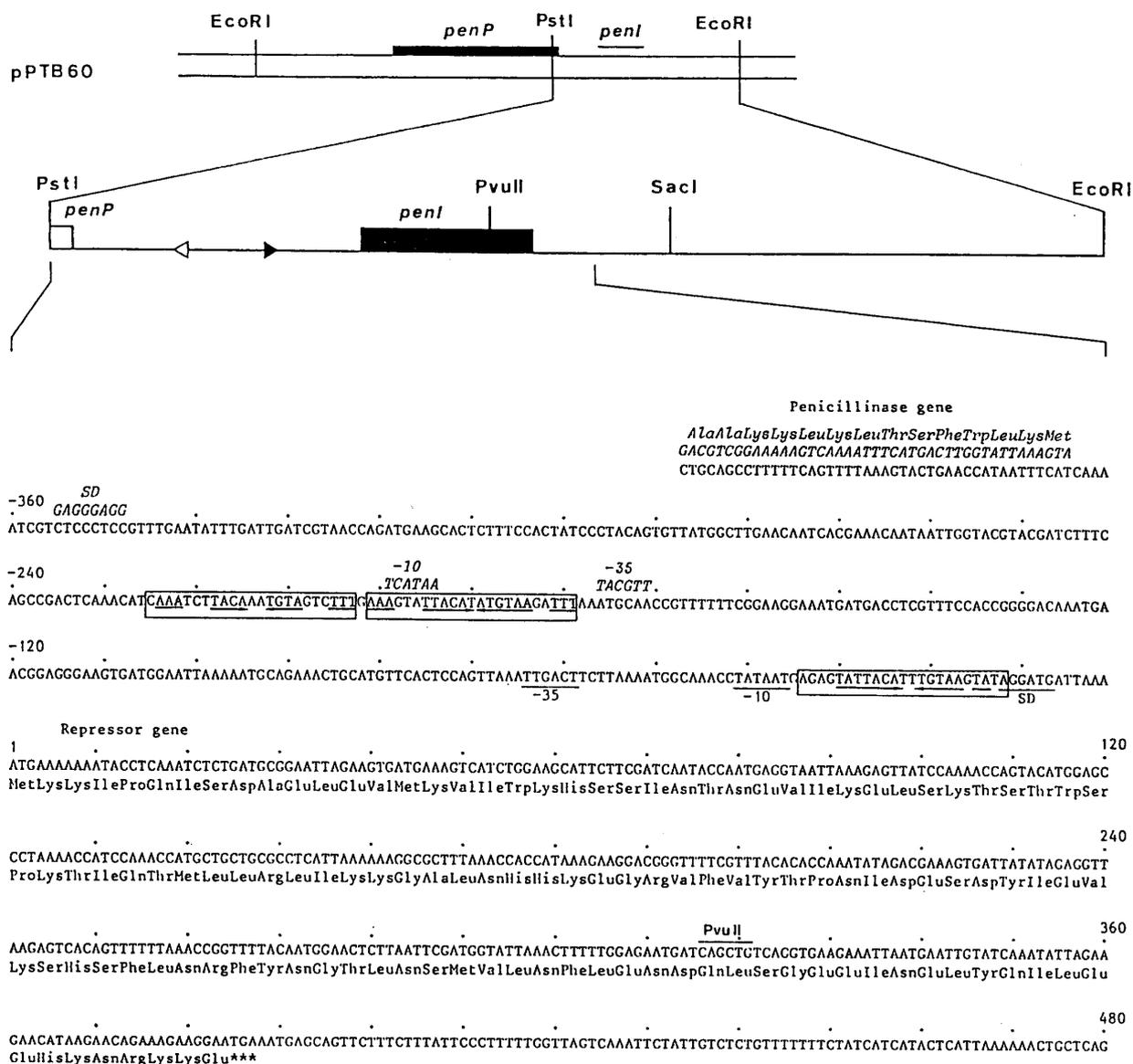


Fig. 8. Nucleotide sequence of pPTB60. ◁ and ▶, Promoters of *penP* and *penI*, respectively. The position of the first nucleotide of the coding region is defined as +1. The amino acid sequence of the coding region is given beneath. The Shine-Dalgarno sequence and promoter (−35 and −10 regions) are shown. The nucleotide sequence, amino acid sequence, Shine-Dalgarno sequence, and promoter for the opposite direction are in italics. Twofold symmetric regions are surrounded by boxes. — → ← —, Regions for the inverted repeat.

amyloliquefaciens の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyN*) を利用したヒト・ α -インターフェロンの分泌³⁸⁾, *B. amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼ遺伝子を利用したペニシリナーゼの分泌³⁹⁾などが挙げられよう。しかし、高等動植物由来遺伝子産物の枯草菌による分泌生産は、低分子量のものでも絶対量は少なく、ヒト・唾液腺の α -アミラーゼのような高分子量ものはまったく分泌されなかった³⁴⁾。したがって、真核生物由来有用ペプチドの分泌生産には、酵母や放線菌など、他の微生物種をも含めた幅広い検討が望まれる。

枯草菌染色体上での変異を組み合わせることにより、 α -アミラーゼの分泌生産性を約 250 倍にも増強することができる⁴⁰⁾。このような株を宿主として、*amyN* 遺伝子を多コピー数プラスミド上にクローニングした場合でも、元株 (野生型) に移入した場合でも、アミラーゼ生産性はほとんど変わらなかった⁴¹⁾。これは、約 1,000 倍にも及ぶ α -アミラーゼの生合成・分泌により、転写・翻訳あるいは分泌機構が飽和状態になっている可能性がある。大腸菌における分泌部位の数が 1 細胞あたり約 2×10^4 と試算されている⁴²⁾ ことも考え合わせると、この可能性が高い。したがって、今後さらに高生産株を育種するためには、分泌装置に関する遺伝子も同時にクローン化して増幅する必要があり、それによって宿主菌のもつ可能性を最大限に活用し得ると思われる。

5.3. ペニシリナーゼ遺伝子の発現制御

penP, *penI* およびペニシリナーゼの誘導に必要なアンチリプレッサーとでもいえる正の制御遺伝子 *penJ* を含む 5.2 Kb の *Hind* III 断片をクローニングし、その塩基配列を決定した⁴³⁾。*penI* の位置は温度感受性変異リプレッサーの解析により決めることができた⁴⁴⁾。

ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*) とリプレッサー遺伝子 (*penI*) の発現制御領域の塩基配列を Fig. 8 に示す。リプレッサー結合部位 (オペレーター) は \square で囲ってあるが、大腸菌で調べられたリプレッサーや CAP タンパク質の結合部位と同様に、逆繰返し配列が認められる。リプレッサー遺伝子は自己調節系を形成していると共に、*penP* はオペレーターが 2 個連結しており、より強く抑制が働くようになっているものと考えられる⁴⁴⁾。

われわれは、前述のごとくこのリプレッサーの温度感受性変異株を得ており、低温では抑制がかかり、高温では誘導物質を添加することなしに抑制が解除されるという、温度による形質発現制御機構を、枯草菌に

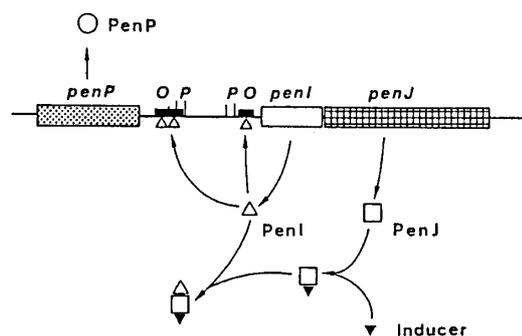


Fig. 9. Speculation on penicillinase regulation in *B. licheniformis*. P, promoter; O, operator.

において基本的に確立することができた。

このペニシリナーゼ制御系をまとめたのが Fig. 9 である⁴³⁾。*penI* と *penJ* は 1 つのオペロンを形成しておりそのポリシストロニックな転写は *penP* と逆方向に進行する。通常の培養条件下ではリプレッサー PenI がペニシリナーゼ PenP の生産を抑制している。また、PenI 量は自己調節されている。培地にセファロスポリン C のような誘導物質を添加すると、PenJ との相互作用を介して PenI を不活化し、PenP 生産を開始するものと考えられている。しかし、この十分なる誘導には 2 時間程度を要することから、細胞複製過程も関与していると思われるが、その解明には今後の検討を待たなければならない。

6. 酵素生産微生物育種の展望

有用酵素の生産菌株の改良には、目的酵素の合成、修飾および分泌などの諸機構を理解し、その代謝流束を増大させる必要がある。また試験管内遺伝子組換え技術の利用で酵素遺伝子を増幅できれば、さらに生産性があげられると思われる。しかし、菌体内に蓄積できる酵素量には限界があり、菌体外への分泌が望まれる。ここで注意すべきことは、目的遺伝子のクローンの化みが必要かつ十分条件でないことである。たとえば、同じ遺伝子を異なった宿主菌に移入して形質発現させた場合、宿主菌に特異的なプロセッシングを受けることがある⁴⁵⁾。したがって、異種の宿主菌の生産する遺伝子産物は、必要に応じてその構造を検討しなければならない。逆にいえば、宿主菌に特異的な修飾酵素やプロセッシング機能を付与しておけば、クローン化した遺伝子産物の物性改変を自動的 (同時) に行うことも可能になるであろう。またタンパク質の構造遺伝子の中で 1 塩基置換するだけで耐熱性が顕著に上昇

する例も見いだされている⁴⁶⁾。この考え方を発展させれば、設計された合成オリゴヌクレオチドを利用した部位特異的変異により、酵素の性質を改変することも可能であるし²⁹⁾、プロモーターやオペレーター等の改良を進めることもできよう。今後は、遺伝子操作とタンパク質工学を利用することにより、有用酵素の生産と改良が積極的に進められるものと考えられる。

終りに臨み、これらの研究を御指導下さいました、大阪大学名誉教授、故田口久治先生および、大阪大学名誉教授、合葉修一先生に深く感謝致します。また一連の研究において御協力下さいました多くの共同研究者の皆様にもお礼申し上げます。

文 献

- 1) Imanaka, T., Kaieda, T., Sato, K., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 633-646 (1972).
- 2) Imanaka, T., Kaieda, T., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 423-430 (1973).
- 3) Imanaka, T., Kaieda, T., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 431-439 (1973).
- 4) 鈴木, 小沢, 田辺: 特許公報昭45-9827.
- 5) Imanaka, T.: *Trends in Biotechnology*, **1**, 139-144 (1983).
- 6) Imanaka, T.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **33**, 1-27 (1986).
- 7) Imanaka, T., Aiba, S.: *Thermophiles: General, Molecular, and Applied Microbiology*, John Wiley & Sons, 159-178 (1986).
- 8) Aiba, S., Imanaka, T., Koizumi, J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **413**, 57-70 (1983).
- 9) Imanaka, T., Fujii, M., Aramori, I., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **149**, 824-830 (1982).
- 10) Ehrlich, S. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1680-1682 (1977).
- 11) Chang, S., Cohen, S. N.: *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111-115 (1979).
- 12) Imanaka, T., Tanaka, T., Tsunekawa, H., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **147**, 776-786 (1981).
- 13) Brown, B. J., Carlton, B. C.: *J. Bacteriol.*, **142**, 508-512 (1980).
- 14) Martin, P. A. W., Lohr, J. R., Dean, D. H.: *J. Bacteriol.*, **145**, 980-983 (1981).
- 15) Imanaka, T., Fujii, M., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **146**, 1092-1097 (1981).
- 16) Imanaka, T., Ano, T., Fujii, M., Aiba, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1399-1408 (1984).
- 17) Alikhanian, S. I., Ryabchenko, N. F., Bukanov, N. O., Sakanyan, V. A.: *J. Bacteriol.*, **146**, 7-9 (1981).
- 18) Muller, R. E., Ano, T., Imanaka, T., Aiba, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 169-171 (1986).
- 19) Ano, T., Imanaka, T., Aiba, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 416-420 (1986).
- 20) Imanaka, T., Ishikawa, H., Aiba, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 90-96 (1986).
- 21) Wiseman, A. (ed): *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Ellis Horwood Press (1975).
- 22) 今中, 合葉: 応用分子遺伝学, 講談社サイエンスフィク, 162-177 (1986).
- 23) Aiba, S., Kitai, K., Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1059-1065 (1983).
- 24) Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **163**, 401-406 (1985).
- 25) Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 355-360 (1986).
- 26) Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M.: *J. Biochem.* **95**, 697-702 (1984).
- 27) Fujii, M., Takagi, M., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **154**, 831-837 (1983).
- 28) Takagi, M., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **163**, 824-831 (1985).
- 29) Imanaka, T., Shibasaki, M., Takagi, M.: *Nature*, **324**, 695-697 (1986).
- 30) Swamy, K. H. S., Goldberg, A. L.: *J. Bacteriol.*, **149**, 1027-1033 (1982).
- 31) Fujii, M., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2997-3000 (1982).
- 32) 今中: *BIO INDUSTRY*, シーエムシー, **4**, 17-29 (1987).
- 33) Imanaka, T., Himeno, T., Aiba, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1753-1763 (1985).
- 34) Himeno, T., Imanaka, T., Aiba, S.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 17-21 (1986).
- 35) Chang, S., Ganesan, A. T., Hoch, J. A.: *Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli*, Academic Press, 159 (1982).
- 36) Shiroza, T., Nakazawa, K., Tashiro, N., Yamane, K., Yanagi, K., Yamasaki, M., Tamura, G., Saito, H., Kawade, Y., Taniguchi, T.: *Gene*, **34**, 1-8 (1985).
- 37) Ohmura, K., Shiroza, T., Nakamura, K., Nakayama, A., Yamane, K., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, G.: *J. Biochem.*, **95**, 87-93 (1984).
- 38) Palva, I., Lehtovaara, P., Kääriäinen, L., Sibakov, M., Cantell, K., Schein, C. H., Kashiwagi, K., Weissmann, C.: *Gene*, **22**, 229-235 (1983).
- 39) Yoshimura, K., Miyazaki, T., Nakahama, K., Kikuchi, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 250-256 (1986).
- 40) Yoneda, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 274-279 (1980).
- 41) Sibakov, M., Sarvas, M., Palva, I.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 81-85 (1983).
- 42) Ito, K., Bassford, Jr., P. J., Beckwith, J.: *Cell*, **24**, 707-717 (1981).

- 43) Imanaka, T., Himeno, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **169**, 3867-3872 (1987).
S.: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2621-2628 (1983).
- 44) Himeno, T., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **168**, 1128-1132 (1986).
46) Matsumura, M., Katakura, Y., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **160**, 413-420 (1984).
- 45) Imanaka, T., Oshihara, W., Himeno, T., Aiba, (昭63. 4. 5受付)