

枯草菌における α -アミラーゼ 高生産変異株の単離およびその 制御遺伝子

一 柳 和 正

α -Amylase is one of several extracellular enzyme of *Bacillus subtilis*. Most of α -amylase produced is localized in culture medium, and small amount is found of cell. Regulatory genes for production of α -amylase in *Bacillus subtilis*, *amyR*, *tmr7*, *amy-B*, *amyS*, and *papSAC*, have been reported.

In this paper additional regulator genes, *cs108* and *abpc2* for production of α -amylase were found in D- cycloserine and ampicillin resistant mutants CS108 and ABPC2 of *Bacillus subtilis* 6160, respectively. Strain CS108 increased the production of α -amylase about 5 times and about 80 times compared to parental 6160 strain. Strain ABPC2 showed a nearly 6-fold increased α -amylase production.

These genetic elements displayed a synergistic effect with other genetic factors in production of extracellular α -amylase when these elements were transferred by DNA mediated transformation. By stepwise introduction of these and other genetic elements into *Bacillus subtilis* 6160 by transformation and mutation, strains with higher α -amylase producing activity were obtained. The finally obtained strain, T2N 26, produced about 1,500~2,000 times more α -amylase than parental 6160 strain.

1. はじめに

細菌は種々の酵素を生成し、それらの酵素は食品工業、医薬品、飼料工業、織物産業、石油産業、そして公害防除に利用されている。国内での酵素の生産額は30億円以上に達し、その生産額の75%、生産量の実に98%はアミラーゼおよびプロテアーゼという酵素で占められている¹⁾。特にアミラーゼは多方面の産業に利用され、今後も急速な発展が期待される分野となるであろう。枯草菌は食品である納豆に含まれる細菌で、 α -アミラーゼやプロテアーゼなど多種類の菌体外酵素を生産する。但し、従来、枯草菌 α -アミラーゼとして工業的に利用されていた酵素は液化型 α -アミラーゼで、これを生産する菌は分類学的に言う *Bacillus subtilis* とはやや異なる菌であり、現在では *B. amyloliquefacience* と命名され、ここでいう枯草菌 (*B. subtilis*) とは区別されている。*B. amyloliquefaciens* は α -アミラーゼの生産量も多く、その α -アミラーゼの性質も良いので、主として生化学的研究に使われていたが、この菌株はDNAを用いる形質転換も、また接合による交雑もできないので、遺伝生化学的研究はほとんど行なわれていない。

本研究に用いた枯草菌 *B. subtilis* (Marburg strain) は糖化型の α -アミラーゼを生産する菌で、その生産性は低い²⁾が、1958年 SpizizenによりDNAによる形質転換が可能であることを見出し、それによって形質転換を利用した遺伝子地図が作成されつつあり³⁾、遺伝生化学的研究が可能である。ここでは形質転換能を持つ *B. subtilis* 6160株を用いて、遺伝子の交換・集中を行って、 α -アミラーゼの生産性の増強を目的として研究した。

2. 枯草菌の α -アミラーゼ産生に関与する種々の制御遺伝子

Yukiらは^{4) 5)} α -アミラーゼの変異株を用いてDNAによる α -アミラーゼ構造遺伝子の解析を行って、aro 116の遺伝子が α -アミラーゼとlinkしていることを示した。山口らは^{6) 7)}*B. natto* IAM1212株のDNAが6160株の α -アミラーゼ生産性に形質転換できることを発見し、また^{6) 7)}*B. natto*の α -アミラーゼと6160株の α -アミラーゼとが電気泳動・耐熱性などで区別がつくことを利用して α -アミラーゼの構造遺伝子 *amy E* と生産性を支配している制御遺伝子 *amy R* との関係を検討し、両者は染色体上の極めて近いところに位置している異なる2つの遺伝子であることを明らかにした^{6) 7) 8)}。 α -アミラーゼと同時にプロテアーゼの生産性も上がる変異株が米田らによって見出され、この両酵素の制御遺伝子は染色体上で α -アミラーゼの構造遺伝子と全く異なる位置にあるので、これを *pap*遺伝子と命名した。この遺伝子の作用は酵素産生の増加以外に、鞭毛がなくなり、細胞壁溶解酵素の作用が減少し、細胞質膜蛋白質組成に変化が見られる^{10) 11)}。

また、糖化型 α -アミラーゼを多量に生産する菌として、福本らは¹²⁾土壤中より *Bacillus subtilis* var *amylosacchariticus* 株を単離している。この株は6160株の10倍以上の120~150単位/mlの α -アミラーゼを生産する。この菌株のDNAを用いて6160株に形質転換を起させ

た実験から、この菌株には6160株の *amyR* 1 に対立した制御遺伝子として *amyR* 3、また、*amyR* 3 以外に *pap* とよく似た遺伝子 *pap'* が存在していることを報告している。米田らは *B. subtilis* var *amylosacchariticus* から DNA を用いた形質転換から、さらに多量の α -アミラーゼを出す株を見つけ、遺伝解析の結果、*amyR* とは染色体上の位置は異なるが、 α -アミラーゼの生産性を 2 倍にあげる遺伝子の存在を推定し、これを *amyS* と呼んでいる。また、佐々木らは^{25) 26)} ツニカマイシン抗生物質に耐性な枯草菌が α -アミラーゼ生産量を 5 倍近く多く出す変異株を見出し、この遺伝子を *tmr* 7 と命名した。 α -アミラーゼの生産性に影響を与える遺伝子は *amyR*、*pap*、*pap* SAC、*amyS*、*tmr* 7 の 5 種類である。米田ら⁹⁾ により 1 つの細胞に *amyR* 2 と *pap* が同時に存在すると、 α -アミラーゼの生産性が相乗的に増大することが明らかにされた。また、これら 5 種類の遺伝子を DNA による形質転換法を用いて、適当に組合せた場合、 α -アミラーゼの生産性が相乗的に増大し、 α -アミラーゼ高産生変異株が得られることが知られている。¹³⁾

α -アミラーゼは菌体外酵素であるため、 α -アミラーゼが菌体外に分泌されるには膜の影響の存在が問題になってくる。事実、*pap* や *tmr* 7 は細胞膜又は細胞壁に何らかの影響をもつものではないかと考えられている。^{9) 11) 14)}

本研究においては、まず、細胞壁、細胞膜合成を阻害する抗生物質に耐性を示す変異株をさがし、その中から、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ等の菌体外酵素をより多く分泌するようになった変異株の選出について記し、次いで、これらの変異と既知の制御遺伝子との組合せの効果について研究した結果を述べ、最後に、極めて多量の α -アミラーゼを生産する新しい株 (T 2 N 26 株) を作出した経過について記述する。

3. 実験の材料と方法

i) 使用菌株

本研究で使用した菌株とその性質及び由来は第1表にまとめて記した。親株の6160株は *B. subtilis* Marburg 168株に由来する株である。

第1表 使用菌株

Strain	Genotype	Origin
B. subtilis		
6160	<i>purB6 trpB3 metB5</i>	<i>amyR1</i> Y. Ikeda
NA 64	<i>purB6 metB5</i>	<i>amyR2</i> K. Yamaguchi
B7	<i>purB6 metB5</i>	<i>amyR2 tmr7</i> T. Sasaki
SP 38	<i>purB6 trpB3 metB5 Str-r^{a)}</i>	<i>amyR3 amyS papSAC</i> Y. Yoneda
TM 23	<i>purB6 trpB3 metB5 Str-r^{a)}</i>	<i>amyR3 amyS papSAC tmr7</i> Y. Yoneda
YY 88	<i>purB6 metB5 Str-r^{a)}</i>	<i>amyR2 pap9</i> Y. Yoneda
CS 108	<i>purB6 metB5 trpB3 Cs-r^{b)}</i>	<i>amyR1 cs108</i> NTG treatment of 6160
ABPC2	<i>purB6 metB5 trpB3 Abpc-r^{c)}</i>	<i>amyR1 abpc2</i> NTG treatment of 6160
515	<i>purB6 metB5 trpB3 Str-r^{a)} Abpc-r^{c)}</i>	See fig. 4 Transformant of TM23 by DNA of ABPC2
B 12	<i>purB6 metB5 trpB3 Str-r^{a)} Abpc-r^{c)} Cs-r^{b)}</i>	See fig. 4 Transformant of 515 by DNA of CS108
630	<i>purB6 metB5 trpB3 Str-r^{a)} Cs-r^{b)}</i>	may be equal to 630T2 Transformant of TM23 by DNA of CS108
630T2	<i>purB6 metB5 trpB3 Str-r^{a)} Cs-r^{b)}</i>	See fig. 4 Tunicamycin treatment of 630
T2N 26	<i>purB6 metB5 trpB3 Str-r^{a)} Cs-r^{b)}</i>	See fig. 4 NTG treatment of 630T2

a) Phenotypical streptomycin-resistant character.

b) Phenotypical D-cycloserine-resistant character.

c) Phenotypical ampicillin-resistant character.

ii) 培養条件

菌株の培養には門脇らのBY培地とBY培地の濃度を2倍にしたものに10%の可溶性デンプンを加えたABY培地のどちらかを用いた。培養はまず試験管で定常期まで一次培養し(30℃一夜、約12~15時間)、その0.1mlをモノー試験管の新しい培地(5ml)に接種して、30℃、30時間振盪培養し、遠心分離により集菌する。上澄液は菌体外酵素(α -アミラーゼ、プロテアーゼ)の粗酵素標品とする。

iii) 各酵素の酵素活性の測定

1. α -アミラーゼ活性の測定

α -アミラーゼ活性の測定は不破¹⁶⁾の変法で測定した。酵素活性の単位は、1分間に基質とした可溶性デンプンの1%を消化する活性を1単位とした。

2. プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性の測定は中村の方法を多少改変して測定した。酵素活性の単位は40℃、1分間に0.001の吸収増加力を示す活性を1単位とした。

iv) プレートによる酵素産生量の判定

1. α -アミラーゼ

1%可溶性デンプンが入ったBY寒天プレートに、滅菌した竹くしで菌を植え、一夜培養し

てコロニーを作らせる。このコロニーに I_2-KI 溶液をスプレーすると第1図に示すように、 α -アミラーゼを多量に生産する菌株はそのコロニーの周囲が分泌されたアミラーゼによってデンプンを分解しているため、 I_2 -デンプン複合体ができず、透明なハローができる。 α -アミラーゼを少量しか生産しない菌株はこのようなハローが生じない。ハローの大きさが親株より大きい菌株には sup と記し、また、親株と同じか、もしくは小さいハローには (+) と記した。

2. プロテアーゼ

1%カゼインの入ったBY寒天プレートに滅菌した竹ぐしで菌を植え、一夜培養すると生育したコロニーの周囲にハローを生じる。第2図に示すように、ハローの大きいコロニーはプロテアーゼ産生量が多く、またハローの小さいコロニーはプロテアーゼ産生量が少ない。また α -アミラーゼと同様に、親株より大きいハローを sup と記し、親株と同じか、小さいハローを (+) で記す。

v) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli¹⁸⁾らの方法で行った。粗酵素液を1% SDS、1%メルカプトエタノールで100℃、5分間処理し、 $0.6 \times 10.5cm$ のゲルにのせ、1 mA/1本で、約13時間室温で泳動した。泳動後ゲルを0.05% コマジープリリアントブルー・R250で一昼夜染色し、蛋白質以外は7%酢酸、5%メタノール混液で脱色した。

vi) 形質転換に用いるDNAの調整

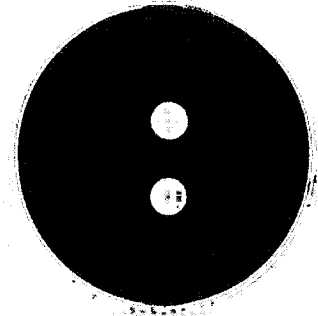
各菌株のDNAの調整には芥藤¹⁹⁾らの pH 9.0 フェノール緩衝液法に従って調整したフェノールで除タンパクを行い、最後にエタノールで沈澱したDNAをクエン酸塩緩衝液に溶かし粗DNA溶液 ($0.5 \sim 1.0 \mu g/ml$) とした。

vii) 形質転換

形質転換は吉川²⁰⁾らの方法に従って行った。DNA受容菌の形質転換可能な (competent な) 細菌集団は細菌の生育を $550m\mu$ の OD で、定常期に入る直前の状態を用いた。これにDNA供用菌のDNAを加えて、30℃、120分培養した。培養で生育した形質転換株を選ぶプレートにまいて、さらに培養しコロニーを生育させる。

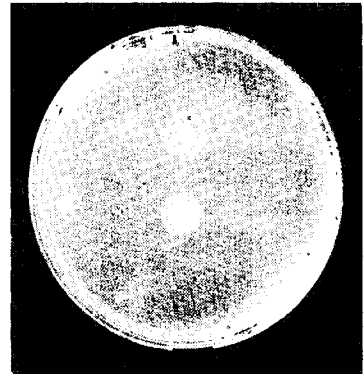
viii) NTG処理

第1図 α -アミラーゼのプレート判定



上のハローの小さい株を+と判定し、下のハローの大きい株をsupと判定する。

第2図 プロテアーゼのプレート判定



上のハローの大きい株をsupと判定し、下のハローの小さい株を+と判定する。

各菌株のNTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 処理は Adelberg²¹⁾の方法に従って行った。まず一次培養で12~15時間振盪培養し、その培養液 (0.1ml) を新しいBY培地 (5ml) に接種し、対数増殖期中期まで振盪培養した。この培養液を遠心分離して集菌し、菌体はTM緩衝液で洗浄した後、同じ緩衝液に懸濁した。この懸濁液にNTGの最終濃度が150 $\mu\text{g/ml}$ になるよう加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で15分間処理した。処理菌はミリポアーフィルターで集菌しBY培地で洗浄した後、懸濁して、新しいBY培地に10%接種し対数増殖期中期まで振盪培養してプレートにまいた。

4. 結 果

1. 細胞壁及び細胞膜合成系に作用する抗生物質耐性変異株の α -アミラーゼ産生について

B. subtilis Marburg 6160株をNTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)

第2表 *B. subtilis* 6160株の各抗生物質の最少阻止濃度

Antibiotic	Minimum inhibitory concentration (M. I. C)	Action site
Penicillin	2 $\mu\text{g/ml}$	Cell wall
Ampicillin	1 $\mu\text{g/ml}$	Cell wall
D-Cycloserine	200 $\mu\text{g/ml}$	Cell wall
Bacitracin	500 $\mu\text{g/ml}$ No inhibition	Cell wall
Kanamycin	2 $\mu\text{g/ml}$	Protein
Rifampicin	1 $\mu\text{g/ml}$	Nucleic acid

処理した処理菌を抗生物質の最少阻止濃度 (第2表) になるように加えたBY寒天プレート培地にまき、生育したコロニーを無作為に1%の可溶性デンプンの入ったBY寒天プレートと1%カゼインの入ったBY寒天プレートに竹くしでひろった。

i) サイクロセリン耐性株

NTG処理した *B. subtilis* 6160株をサイクロセリン200 $\mu\text{g/ml}$ を含むBY培地にうえて培養し、サイクロセリン耐性株約6000株を得た。これらの株を可溶性デンプン1%を含む寒天プレートに播いて α -アミラーゼ生産性を判定し、有望と思われるもの200株について液体培養を行った。培養液について α -アミラーゼ産生量とプロテアーゼ産生量を測定した結果、No. 108は親株の6160株より α -アミラーゼで6倍、プロテアーゼで35倍の生産性が增大していたので、これを有望株とし、CS108株と命名した。

ii) ペニシリン耐性株

NTG処理した *B. subtilis* 6160株を2 $\mu\text{g/ml}$ のペニシリンを含むBY培地で培養し、耐性株2,700株について α -アミラーゼとプロテアーゼ産生のプレート判定を行い、その内75株を液体培養したが、 α -アミラーゼ及びプロテアーゼ産生が親株より特に増大していた変異株は得られなかった。

iii) アンピシリン耐性株

NTG処理した *B. subtilis* 6160株を1 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含むBY培地で培養し、耐

性株2,700株を α -アミラーゼ産生及びプロテアーゼ産生のプレート判定を行った結果、有望株と見られる株100株について、液体培養し行い、その内No.2の株は α -アミラーゼ産生のみ親株よりかなり高い生産性を示していた。これを有望株とし、ABPC2株と命名した。

2. 蛋白質・核酸合成系に作用する抗生物質耐性変異株の α -アミラーゼ産生について

細胞壁、細胞膜合成系に作用する抗生物質と同様に、*B. subtilis* Marburg 6160株をNTG処理した菌につき、カナマイシンとリファンピシン耐性変異株の α -アミラーゼ、プロテアーゼ生産性を検討した。カナマイシン耐性変異株960株、リファンピシン耐性変異株3360株について、両酵素の生産性をプレート判定で見たが、これらの中には有望と思われる株は得られなかった。

3. α -アミラーゼ高生産性株の作出

α -アミラーゼの生産性に関与している制御遺伝子として、現在、*amyR*、*pap*、*papSAC*、*amyS*、*tmr7*の5種類が考えられている。*amyR*にはMarburg 6160株の*amyR*1、*B. natto*型の*amyR*2、*B. subtilis* var *amylosacchariticus*の*amyR*3があり、これらは対立遺伝子であると考えられている。1つの細胞に*amyR*2と*pap*とが同時に存在すると、 α -アミラーゼの生産性は相乗的に増大する現象が知られている³⁾。そこで、CS108株とABPC2株を使って α -アミラーゼ生産性に対するその他の遺伝子との相互作用を調べた。

i) ABPC2株の変異遺伝子とTM23株の変異遺伝子との相乗効果

アンピシリン耐性変異株ABPC2株は*amyR*1の遺伝子を持ち、この菌株DNAを*amyR*3、*amyS*、*papSAC*、*tmr7*の4種類の遺伝子を持つTM23株に入れて形質転換を行なった。形質転換株から420個選び、プレート判定で α -アミラーゼの生産性が上っている株(20株)について液体培養を行って α -アミラーゼ及びプロテアーゼの生産量を第3表に示す。形質転換株No.515は親株のTM23株より α -アミラーゼ生産性が著しく高いが、プロテアーゼは逆に減少している。またNo.519は α -アミラーゼの生産性は約2倍に増加しているが、プロテアーゼの生産性は親株と等しい量である。

今後の実験にはこのアンピシリン耐性変異株No.515とNo.519を515株、519株と命名して用いることにした。

第3表

TM23株のアンピシリン耐性形質転換株の α -アミラーゼ、プロテアーゼの生産性*

	Plate		Medium (U/ml)	
	Amy	Pro	Amy	Pro
if. No. 501	+	+	1,072	16.7
502	sup	+	1,447	37.5
503	+	sup	851	315.0
504	sup	sup	1,523	68.3
505	+	+	1,021	33.3
506	+	sup	766	342.0
507	+	+	1,064	54.2
508	sup	sup	1,651	347.2
509	sup	+	1,319	50.0
510		sup	851	141.7
511	sup	+	1,379	54.4
512	sup	+	1,489	36.7
513	sup	+	1,445	27.8
514	sup	+	1,277	33.9
515	sup	+	1,736	50.0
516	+	sup	1,021	381.1
517	sup	sup	1,702	363.9
518	sup	sup	1,276	347.8
519	sup	sup	1,830	375.6
520	sup	+	1,489	91.7
TM 23			936	376

*BY+4% Starch medium, 30C, 48hrs.
Amy = アミラーゼ、Pro = プロテアーゼ

ii) CS108株のDNAによる515株及び519株の形質転換

ABPC 2株をTM23株へ形質転換させて得た α -アミラーゼ高生産性株515株と519株に、

第4表

519株のサイクロセリン耐性形質転換株の α -アミラーゼ、プロテアーゼの生産性*

tf. No.	Plate		Medium (Units/ml)	
	Amy	Pro	Amy	Pro
B 1	sup	sup	2,275	748
B 2	+	sup	784	255
B 3	+	sup	1,020	242
B 4	sup	+	1,333	478
B 5	sup	+	1,412	608
B 6	+	sup	1,765	664
B 7	+	sup	2,000	720
B 8	sup	+	1,427	456
B 9	+	sup	157	840
B10	+	sup	1,349	460
B11	+	sup	1,569	459
B12	+	sup	4,565	1,160
B13	+	sup	1,020	424
B14	+	sup	1,020	263
B15	sup	+	1,412	370
B16	sup	+	706	85
B17	sup	+	1,569	585
B18	sup	+	784	50
B19	+	sup	235	1,144
B20	sup	+	1,058	203
CS. 108	+	sup	55	905
519	sup	+	1,867	528

*BY + 4% Starch medium, 30C, 48hrs.
Amy = アミラーゼ, Pro = プロテアーゼ

CS 108株のDNAを導入して形質転換すれば、制御遺伝子の相乗効果により、さらに高い α -アミラーゼ産生変異株が得られると考えられ形質転換を行った。サイクロセリン耐性になった形質転換株について α -アミラーゼ生産性を調べたところ515株から得られたものでは注目すべきものは見出されなかった。一方、519株からは600個を無作為に選び α -アミラーゼのプレート判定を行った結果、その内18個が有望であったので液体培養を行った。

第4表に示すごとく No. B12は約4,500 u/mlの α -アミラーゼを生産していた。このNo. B12をB12株と命名した。このB12株はこれまでに得た菌株の中で一番多量に α -アミラーゼを生産するが、この株をさらに高い生産性を持たせるために、例えば、プロテアーゼの合成の低い変異株を作れば、これまでプロテアーゼ合成に使用されていた

第5表 TM23株のサイクロセリン耐性形質転換株の α -アミラーゼ、プロテアーゼの生産性*

tf. No.	Plate		Medium (Units/ml)		tf. No.	Plate		Medium (Units/ml)	
	Amy	Pro	Amy	Pro		Amy	Pro	Amy	Pro
601	+	+	902	404	620	sup	+	936	220
602	sup	+	1,872	246	621	sup	sup	2,255	872
603	+	sup	932	638	622	sup	sup	979	568
604	+	sup	851	496	623	sup	sup	2,213	511
605	+	sup	681	554	624	+	sup	1,532	864
606	sup	+	1,106	219	625	sup	sup	1,532	334
607	sup	sup	1,787	254	626	sup	+	1,447	255
608	+	+	766	371	627	+	+	1,064	389
609	sup	sup	1,362	2,075	628	sup	sup	1,404	1,118
610	+	sup	1,958	636	629	+	sup	511	514
611	+	+	510	425	630	sup	sup	2,792	1,135
612	sup	sup	1,575	383	631	sup	+	834	1,455
613	sup	+	681	423	632	+	sup	723	327
614	sup	sup	1,762	400	633	sup	+	1,549	198
615	+	sup	1,617	404	634	sup	+	530	193
616	sup	+	1,660	367	635	+	sup	2,681	692
617	+	sup	1,277	455					
618	+	sup	1,294	1,146	CS. 108	+	sup	52	650
619	+	+	1,515	383	TM. 23	sup	sup	936	376

*Culture condition BY + 4% Starch medium, 30C, 48hrs.

機構や素材を α -アミラーゼ合成に振り向けることができれば、 α -アミラーゼ生産量はプロテアーゼ生産量の分だけ増加することもあり得ると考えられる。そこでB12株をNTG処理して得た変異株11,470個の菌株からプレート判定で α -アミラーゼのハローが大きく、プロテアーゼのハローの小さい株(7個)を液体培養してその生産性を調べた。その結果、プロテアーゼのハローの小さくなった株はその生産能も親株の \sim 1/2へと減少しているが、反面、 α -アミラーゼ生産能は増加せず、親株と同じか、又は少し減少して、この試みは成功しなかった。

iii) CS108株の変異遺伝子とTM23株の変異遺伝子との相乗効果

サイクロセリン耐性変異株CS108株はAmyR1の遺伝子を持ち、この菌株のDNAをTM23株に形質転換を行い、420個の形質転換株の中から、プレート判定で α -アミラーゼ産生が増大していると思われる株35株を液体培養した。

結果は第5表の如くであり、形質転換株No.630とNo.635は親株のTM23株より、 α -アミラーゼで約3倍、プロテアーゼで約2倍の生産性が増大していた。次に、これまでに得られた代表的な菌(ABPC2株、CS108株、515株、519株、630株、635株)及びTM23株について、

アクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルを1%デンプンの入った寒天プレート上に並べ37℃、一夜保温した後、ゲルを除いて、デンプン寒天プレートにヨード溶液を噴霧した。結果は第3図に示す如くである。ABPC2株とCS108株は泳動速度が遅く、ここでは示していないが

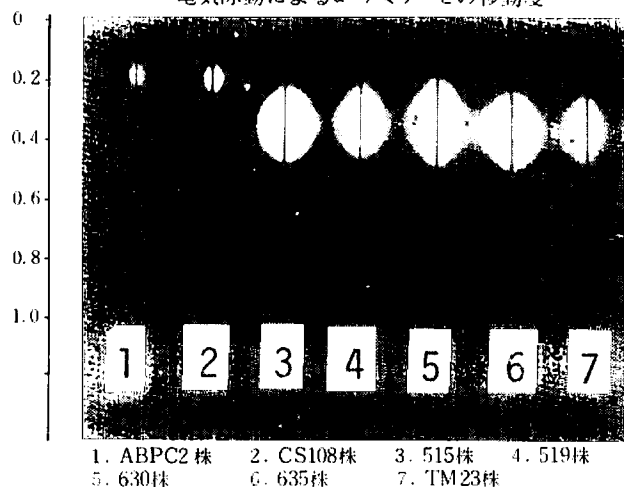
6160株の α -アミラーゼと同じであった。515株、519株、

630株、635株の α -アミラーゼは親株であるTM23株の α -アミラーゼと同じ泳動速度を示していた。したがって、これらの菌株の生産する α -アミラーゼは*Bacillus subtilis* var *amylosacchariticus*の α -アミラーゼと同じ構造のものと考えられる。

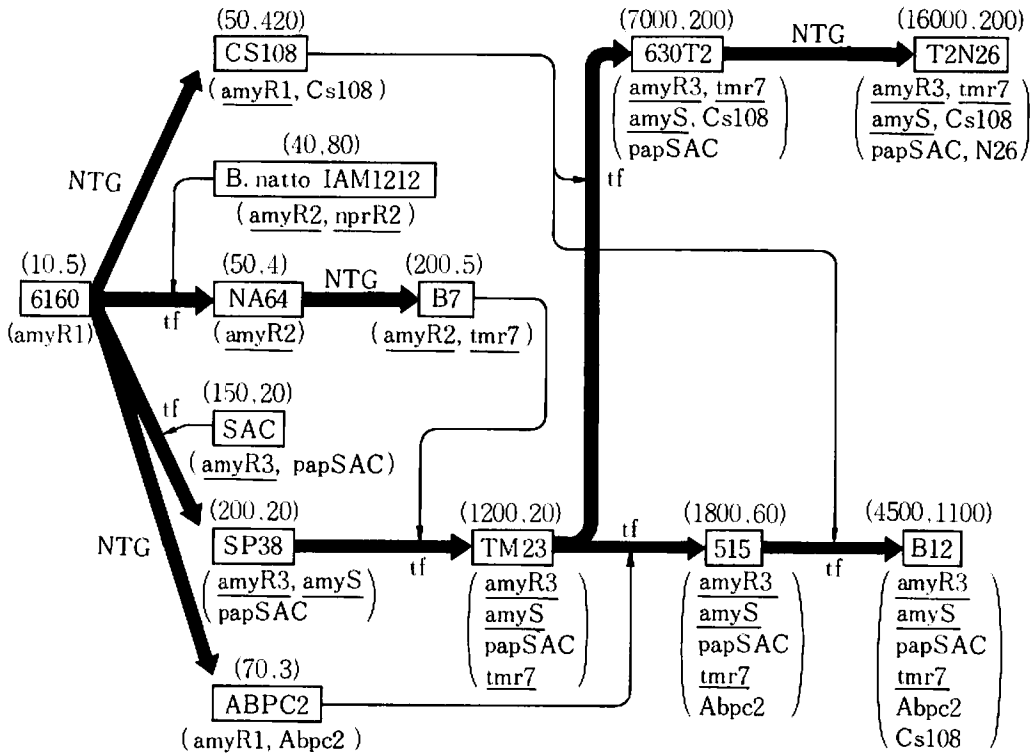
iv) 630T2株のNTG処理による α -アミラーゼ高生産変異株(T2N26株)の単離

α -アミラーゼ高生産変異株の一つである630株(2790 u/ml)を抗生物質ツニカマイシンの5 μ g/mlを含む寒天プレート上に播き、単胞子分離を行って得た株の中に、これまでで一番多い α -アミラーゼ生産性(6964 u/ml)を持つ株が得られ、しかも、プロテアーゼ生産性を \sim 1/2に減少していた。この株を630T2株と命名した。この630T2株が生産する α -アミラーゼ生

第3図 各菌株のPH9.3-緩衝液ポリアクリルアミドゲル電気泳動による α -アミラーゼの移動度



第4図 枯草菌T2N26株の作出経路



□内は株名、()内の前の数字は培地1ml当たりのα-アミラーゼ生産量、後の数字はプロテアーゼ生産量、各株が含むと想像される生産制御遺伝子を□下の()内に示す。
 tf : 形質転換法による導入、NTG : N-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる突然変異の誘発。

産性をさらに増大させるため再度NTG処理を行った。処理菌はOD550 m^u (島津比色計スペクトロニック20)が、0.600になるまでBY培地で培養し、1%カゼインを含む寒天プレートでプロテアーゼのハローが親株の630T2株より小さくなったと思われる菌株を約6,000個の中から420個選び、その中からα-アミラーゼ産生のプレート判定で増大していると思われる菌株39個を液体培養を行い、α-アミラーゼの生産量を測定した。その結果を第6表に示す。この中にはα-アミラーゼ高生産性を持つ株、1万単位以上の株が9個あった。中でもNo.26は13600 u/mlもの生産性を示し最高であった。また、プロテアーゼ生産性は親株に比べ多少増減しているが、α-アミラーゼ産生の増大率から見るとほとんど変化していないと考えられる。このNo.26の菌株をT2N26株と命名した。この株を数回繰り返してα-アミラーゼの生産性を測定すると15,000~20,000 u/ml生産し、その量は培地1mlにつき結晶α-アミラーゼを約2mgも生産していることになる。この生産性は親株6160株の1,500~2,000倍も高くなっていることになる。また、T2N26株を作出した経路を第4図に示す。

V) α-アミラーゼ生産性の時間的経過と菌体外酵素蛋白質分析

α-アミラーゼ高生産変異株の作出での主な菌株 (6160株、CS108株、TM23株、630T2

第6表 630T2株よりの変異株の α -アミラーゼ、プロテアーゼ生産性*

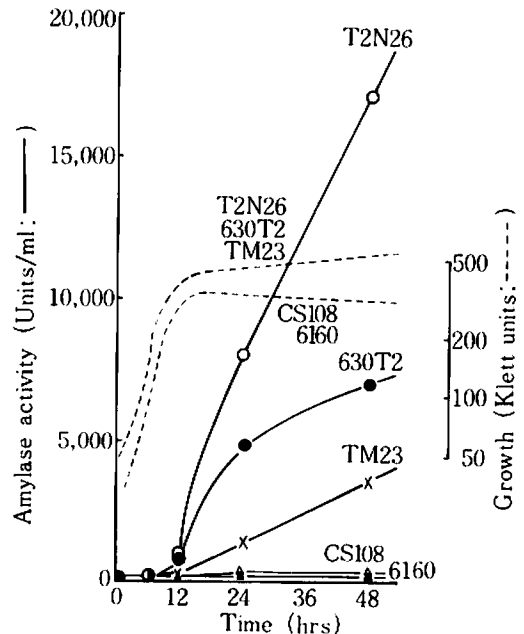
	Plate		Medium (Units/ml)			Medium (Units/ml)		Medium (Units/ml)	
	Amy	Pro	Amy	Pro		Amy	Pro	Amy	Pro
NTG. No. T2N	1	sup +	2,142	110	NTG. No. T2N	21	sup +	12,500	210
	2	sup +	4,071	187		22	sup +	4,562	184
	3	sup +	4,357	182		23	sup +	4,179	181
	4	sup +	2,250	195		24	sup +	11,818	281
	5	sup +	3,821	200		25	sup +	8,977	217
	6	sup +	2,750	161		26	sup +	13,636	206
	7	sup +	4,464	156		27	sup +	10,113	170
	8	sup +	2,179	232		28	sup +	3,864	224
	9	sup +	3,714	200		29	sup +	4,392	155
	10	sup +	1,679	236		30	sup +	4,607	211
	11	sup +	3,393	190		31	sup +	12,045	137
	12	sup +	1,607	164		32	sup +	3,500	141
	13	sup +	4,571	237		33	sup +	1,107	11
	14	sup +	4,536	133		34	sup +	10,909	202
	15	sup +	1,393	96		35	sup +	12,500	236
	16	sup +	4,500	160		36	sup +	2,821	102
	17	sup +	10,000	154		37	sup +	11,138	192
	18	sup +	4,107	192		38	sup +	4,357	256
	19	sup +	2,893	84		39	sup +	3,750	231
	20	sup +	3,035	56					
					630T2	sup +	6,964	212	

*BY + 10% Starch medium, 30°C, 48hrs.

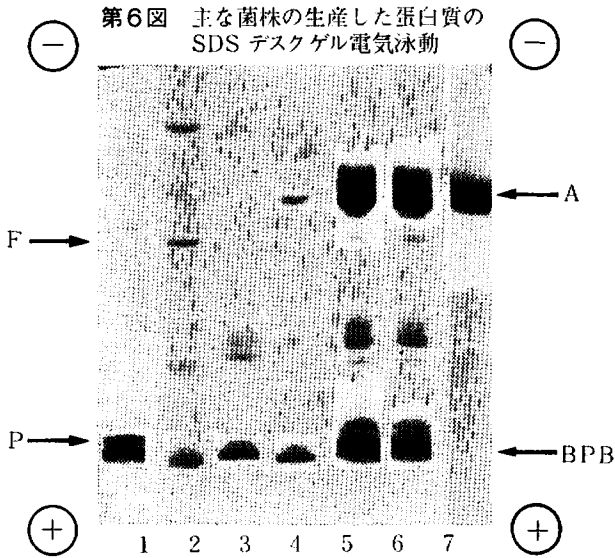
株、そして T2N26株) の培養時間と α -アミラーゼ生産性を検討した。その結果を第5図に示すごとく、30°C、48時間培養では親株の6160株とCS108株の α -アミラーゼ生産量はそれぞれ10 u/mlと60 u/mlで顕著に低い。一方、一つの細胞の中に α -アミラーゼの制御遺伝子を少なくとも6ヶ導入していると思われる変異株T2N26株は16,000 u/mlの α -アミラーゼを生産する。また、図には示していないがT2N26株を30°C、72時間培養すると、25,000 u/mlも生産する。また、この培地には結晶 α -アミラーゼ2.5mg/mlの溶液に匹敵する。^{22) 21)}

次に、6160株、CS108株、TM23株、630T2株及びT2N26株の菌体外蛋白質の成分をSDSディスクゲル電気泳動で分析した。その結果を第6図に示す。

第5図 各菌株における α -アミラーゼ生産性の時間経過と成育状態



6160株とCS108株は、BY培地で培養した。この二つの株をABY培地で培養すると、 α -アミラーゼ生産が少ないので、培地中のデンプンによって α -アミラーゼ活性の測定が出ない。TM23株、630T2株、そしてT2N26株は、ABY培地で培養した。



各菌は30℃、48時間培養

1. 市販のアルカリ性プロテアーゼ
 2. 6160株
 3. CS108株
 4. TM23株
 5. 630T2株
 6. T2N26株
 7. 精製した α -アミラーゼ
- BPB : 1,6-ホルムフェノールブルーのマーカー

6160株に見られるバンドの矢印Fは分子量約36,000の鞭毛の蛋白質である²⁴⁾。また矢印Aは α -アミラーゼのバンドであるが、6160株とCS108株はその生産量が少ないため確認できない。しかし、TM23株ではうすいバンドとして現われ、630T2株とT2N26株では濃い大きなバンドとして α -アミラーゼ生産量の多い事が認められる。また、630T2株とT2N26株のバンドを比較すると、ほとんど同じように見えるが、T2N26株

のみ、少量の試料で電気泳動を行ったためである。矢印Pはアルカリ性プロテアーゼでCS108株、630T2株とT2N26株にバンドとして現われる。

5. 考察

枯草菌が菌体外酵素の一つである α -アミラーゼを合成するには、その構造遺伝子に基づきm-RNAがリボソーム上で蛋白質に翻訳され、さらに(あるいは同時に)細胞膜、細胞壁を通過して培地に分泌される過程を経なければならないはずである。これには数多くの制御遺伝子が関与しうるはずである。一つの細胞に α -アミラーゼ生産制御遺伝子を複数導入することによってその生産性は相乗効果を示して増大している²²⁾(第7表)。本研究では*B. subtilis* 6160株をNTG処理して、細胞膜、細胞壁、蛋白質合成および核酸合成に関与する抗生物質、ペニシリン、サイクロセリン、アンピシリン、カナマイシン、リファンピシン等に耐性な突然変異株を

第7表 α -アミラーゼの生産性に関係する各種遺伝子とそれらの相乗効果

Strain	Regulatory genes						Production of α -amylase (U/ml)
	amyR3	tmr7	amyS	papSAC	abpc2	csl08	
TM23	●	●	●	●			1,200
515	●	●	●	●	●		1,800
630	●	●	●	●		●	2,700
B12	●	●	●	●	●	●	4,600

● : The regulatory gene is assumed to be included in the strain.

選択し、それらの菌株の中で α -アミラーゼ生産性の増大する菌株を検討した。その結果、サイクロン耐性菌からCS108株、アンピシリン耐性菌からABPC2株が生産する α -アミラーゼ生産性はそれぞれ親株の

6160株の5倍と7倍の生産性を示した。また、プロテアーゼ生産性はCS108株で親株6160株の80倍の生産性を示したが、ABPC2株は親株6160株とほとんど同じであった。他の抗生物質耐性変異株からは α -アミラーゼ生産性が親株より増大している菌株は得られなかった。そこで、CS108株とABPC2株でそれらの変異についてDNAによる形質転換法で変異遺伝子の解析を試みた。CS108株ではサイクロセリン耐性と α -アミラーゼ、プロテアーゼ高生産性は関係がないが、しかし α -アミラーゼとプロテアーゼの両者の高生産性は分離しないことがわかった。ABPC2株ではアンピシリン耐性と α -アミラーゼ高生産性とは分離することがわかった。

CS108株とABPC2株のDNAを用いてTM23株へ形質転換したところ、前者からは約3倍の α -アミラーゼ高生産変異株630株と635株の2菌株を得、後者からも約3倍の α -アミラーゼ生産性を示す515株と519株の2菌株を得た。次に、この515株と519株にサイクロセリン耐性を導入する目的でCS108株のDNAを用いて形質転換したところ、515株より α -アミラーゼ生産性が増大したB12株を得た。630株をツニカマイシン耐性かどうか確かめるため単胞子分離したところ、 α -アミラーゼの高生産を有する株、630T2株を得た。これらのB12株と630T2株につき、 α -アミラーゼ生産性をさらに高めるため、NTG処理したが、B12株では有変異株は得られなかった。しかし、630T2株からは α -アミラーゼの生産性が著しく増大したT2N26株を得た。このT2N26株を作出した経路を要約すると第4図のごとくである。

T2N26株中に含まれている α -アミラーゼ生産性に関与している制御遺伝子としては、*amyR* 3、*tmr* 7、*amyS*、*papSAC*、*cs108*、*n26*の6種類が存在すると考えられる。また、T2N26株のDNAを親株の6160株に与えても、T2N26株に比敵する程の α -アミラーゼを多量に生産する形質転換株は今のところ得られていない。この理由は、このような多くの制御遺伝子を同時に獲得する確率が低いためか、あるいは、何か未知の特別の理由があるのか今のところ不明である。

T2N26株の生産する糖化型 α -アミラーゼの力価(15,000 u/ml以上)は今まで知られている福本の*B. subtilis* var *amylosacchariticus*の生産量(約200 u/ml)をはるかに上廻るものであり、また、工業的に用いられている*B. amyloliquefacience*の生産する α -アミラーゼ力価にも勝るものであり、このT2N26株の応用的価値もあるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、暖かいご理解とご協力を頂いた故初代河野タカ学長、また、ご指導・ご鞭撻を頂きました東京大学名誉教授丸尾文治先生(現在日本大学教授)に深甚の謝意を表します。また研究を進めるに当たり、度々有益な御助言を頂いた東京大学渋谷勲助教授(現在埼玉

大学教授) および、直接懇切丁寧に御指導頂いた東京大学応用微生物研究所山根國男博士(現在筑波大学助教授)に感謝の意を表します。

本研究を続けるに当り、御助力と御支援を頂いた下関女子短期大学の諸先生方に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 上林 明、醸酵協会誌27, 337 (1969)
- 2) J. Spizizen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 44, 1072 (1958)
- 3) N. Sueoka, H. Yoshikawa, *Genetics.*, 52, 747 (1965)
- 4) S. Yuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 182 (1968)
- 5) S. Yuki and Y. Ueda, *Jpn. J. Genet.*, 43, 121 (1968)
- 6) K. Yamaguchi, M. Matsuzaki and B. Maruo, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 97 (1969)
- 7) K. Yamaguchi, Y. Nagata and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 119, 410 (1974)
- 8) K. Yamaguchi, Y. Nagata and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 119, 416 (1974)
- 9) Y. Yoneda, K. Yamane and B. Maruo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 765 (1973)
- 10) Y. Yoneda and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 124, 48 (1975)
- 11) C. Ayusawa, Y. Yoneda, K. Yamane and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 124, 459 (1975)
- 12) J. Fukumoto, T. Yamamoto and K. Ichikawa, *smf. Enzmechem. (Tokvo).*, 7, 104 (1952)
- 13) 米田祐康他、日本農芸化学会 50年度講演集 456頁 (1975)
- 14) T. Sasaki, M. Yamasaki, Y. Yoneda, K. Yamane, A. Takatsuki and G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 70, 125 (1976)
- 15) K. Kadowaki, J. Hosoda and B. Maruo, *Biochim. Biophys. Acta.*, 103, 311 (1965)
- 16) H. Fuwa, *J. Biochem (Tokyo)* ., 41, 583 (1954)
- 17) M. Nakamura, *J. Agr. Chem. Sci. (Japanese)* ., 23, 586 (1959)
- 18) U. K. Laemmli, *Nature.*, 227, 680 (1970)
- 19) H. Saito and K. Miura, *Biochim. Biophys. Acta.*, 72, 619 (1963)
- 20) H. Yoshikawa, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 65, 206 (1970)
- 21) E. A. Adelberg, M. Mandel and G. Chein Ching Chen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 788 (1965)
- 22) K. Hitotsuyanagi, K. Yamane and B. Maruo, *Agric. Biol. Chem.* 43, 2343 (1979)
- 23) B. Maruo, K. Yamane, Y. Yoneda and K. Hitotsuyanagi, *Proc. Jpn. Acad.*, 54, 435 (1978)
- 24) D. Ayusawa, Y. Yoneda, K. Yamane and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 124, 459 (1975)
- 25) T. Sasaki, M. Yamasaki, B. Maruo, Y. Yoneda, K. Yamane, A. Takatsuki, and G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 125 (1976)
- 26) S. Nomura, K. Yamane, T. Sasaki, M. Yamasaki, G. Tamura and B. Maruo, *J. Bacteriol.*, 136, 818 (1978)