

微生物酵素の生産性

大阪大学工学部 岡田 弘 輔

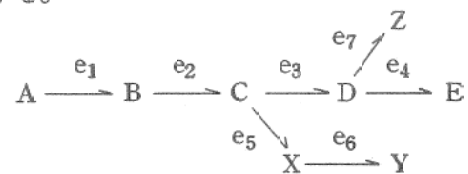
1) はじめに

人類が微生物の生産する酵素を利用するようになったのは有史以前のことで、おそらく酒を醸すことを覚えた時点まで遡れると考えられる。しかしその時点では微生物という概念も、酵素と云う概念もなく、たゞ経験的な技術だけがあり、酒造は科学の対象としてよりむしろ信仰の対象で専らパッカスや松尾大社の神々の御気嫌のまゝに成功したり、失敗したりするものであった。この神様の神聖な業務を、あのいまわしい微生物—（その兄弟の中にはチフス菌やペスト菌がおり、一昔前の流行語人間バチルスを出して下されば充分です）—の所業であることを明らかにしたのはルイ・パスツールで 19 世紀の中頃である。1871 年にパスツールが生命と結合した酵素と、生命と結合していない酵素の 2 つに分類した。このパスツールの間違っただけの考えは以後数十年間酵素学を混乱に陥入れたものであるが、現在でもやゝもすると酵素を酵素—生命力—神聖のカテゴリーに入れて考えたがる傾向がある。未知なるものに感じる未知な魅力なのであろうが酵素は今日ではもう未知なるものではなく、石油製品と同程度に既知の物質になって了っている。

昔からヨーロッパ系の酒は、でん糖糖化に穀物の α -アミラーゼを使用していたのに対して東洋系の酒では微生物特にカビを使用してきた。これは風土、気候特に湿度が大きく関係してきたと思われるが、微生物の利用技術が東洋とくに日本の特技となっているのは非常に心強いことである。

微生物を利用した生産、たとえ生産物がペニ

シリンやグルタミン酸のようなものであってもまたは酵素そのものであっても、生産性ないし収量は酵素活性の大きさを説明することができる。例えば微生物に生産物 E を A から生産する能力があるとし、その代謝経路が次のようであるとする。



その間に働く酵素をそれぞれ図のように e_1, e_2, \dots, e_7 とする。E の収量を大きくするには e_1, e_2, e_3 と e_4 の酵素活性を大きくするようにし、 e_5 と e_7 の活性を欠落させると云う割合常識的な結論になる。これを遂行するためには、
 i) 遺伝的方法（菌株の改良） ii) 生理学的方法（培養条件の検討） iii) 化学工学的的方法（培養装置） の 3 つの方法がある。この 3 つの方法は互に相乗効果を示すので、1 つの手法のみで収量を増加するのは適当でなく、同時に 3 つの手法を考える必要がある。しかし、i) の遺伝的方法では収量が 1 桁違うことは容易であり他の方法に較べて効果は大きい。

収率の増加という問題も上図でまとめられる程原理的には簡単ではあるが、実際にはそれ程単純ではなく、例えば Y が生命維持に必須な物質であれば e_5 の欠落は致死変異であり、特定の条件下（X または Y が与えられたような）でしか発育しえないことになる。この他、生命体には非常に自動制御が発達しており、この制御はその生命体にとっては非常に都合のよいものであるが、それを利用する側からは必ずしもそ

第1表 Salmonella 菌におけるヒスチジン供給に要するエネルギー

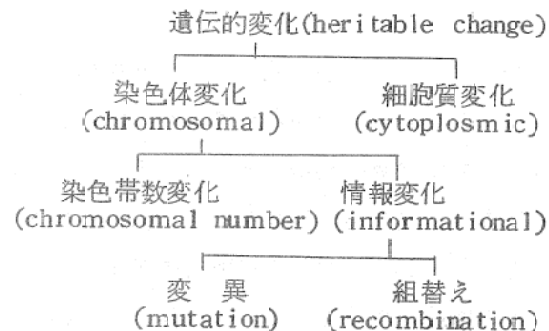
所要エネルギー (世代時間50分として)	所要エネルギー ATP換算 $\mu\text{mole/g}$ 菌体/分
I 代謝により総所得エネルギー	4000
II ヒスチジン生合成所要エネルギー	56
III 細胞内のヒスチジンを取込みに要するエネルギー	1
調節により節約されるエネルギー	
IV 調節しないときヒスチジン生合成系の消費するエネルギー	140
V 調節による節約(IV-II)	84
VI 細胞外にヒスチジンが供給されたときの節約(IV-III)	139

うではない。例えば上の例でEなる生産物は利用する側からは大量生産は美德であるが、微生物にとって必要以上に蓄積することは合成エネルギーの浪費と、それを合成する酵素蛋白質の浪費を意味するものである。このような浪費を行わないようにEが蓄積すれば e_1, e_2, \dots, e_4 の酵素活性を低下させるような機構(最終生産物阻害)と e_1, e_2, \dots, e_4 の酵素蛋白質を作らないような機構(レプレッション)が自動的に作動しているので菌株の改良にはこれらの制御を破壊する必要がある。このような制御が破壊されている個体が、つまり浪費癖のある個体が、如何に生存競争に弱いかを示したのが第1表である。この例では *Salmonella typhimurium* という細菌がアミノ酸の1種、ヒスチジン合成系制御の欠落によってどれ位の浪費をし、生存上どれ位の不利益を被るかを示している。¹⁾ 生物学的エネルギーは合成されるアデノシン三磷酸(ATP)のモル数で勘定するのが便利である。*S. typhimurium*では1g菌体は毎分4000 μmol のATPを合成しそのうちの56 μmol をヒスチジンの生合成に使用している。もし制御系が破壊されると不必要なヒスチジンが作られてその直接および間接経費は140 μmol ATPに相当する。外部にヒスチジンを与えれば勿論その運搬費(細胞内への能動輸送に要するATP)

だけですむことになる。計算結果から云うと、制御系が完全な細菌の世代時間が50分のとき、制御系が破壊されている細菌の世代時間は51.5分になる。これはもし両方の細菌を1:1の割合で混合して培養すると24日後には割合は1:100万になり、エネルギー浪費型の細胞は生存競争に敗けて了うことを示している。しかし私達醸酵屋が求めている菌とはこんな菌なのである。

2) 菌株の改良

菌株の改良が初めて系統的に行なわれた例はペニシリン生産における *Penicillium crysogenum* の改良であった。そしていろいろな手法が開発され以降の遺伝学に重要な影響を与えた。遺伝的な変化を分類すると次図のようになる。



特殊な例を除いて菌株改良に変異を使用するが、変異がどのようにして起るかを説明するた

めに最も基礎的な遺伝学の法則を説明すると、次のようなものである。

a) 遺伝子の本質はDNA(デオキシ核酸)であり、2本鎖から成っている。DNAはその構成単位はチミジール酸(T)、デオキシアデニール酸(A)、デオキシグアニール酸(G)、デオキシシチジール酸(C)の4つしかない。

b) 2本鎖中ではAとT、CとGが互に向い合って水素結合をしており、染色体の分裂などの増殖にさいしてAの相手にTを選ぶ(またはその逆) Cの相手にGを選ぶ(またはその逆)の選択によってDNAの塩基の並び方が子孫に伝えられていく。

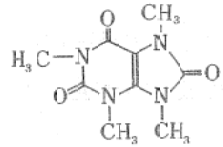
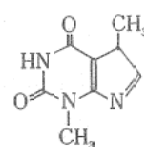
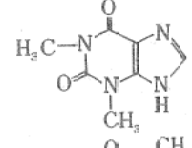
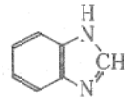
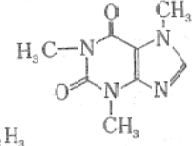
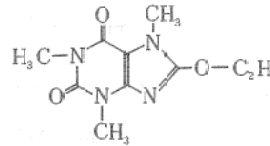
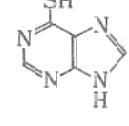
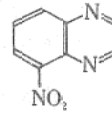
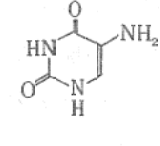
c) DNAの塩基の並び方は蛋白質のアミノ酸の並び方を決定するものであり、塩基3分子の並び方が1個のアミノ酸を決定する。

したがって遺伝子DNA上に何等かの並び方の変更を起させるような現象が突然変異である。突然変異によって起るDNAの異常は、i)置換—DNAの1つの塩基例えばAが他の塩基(T、GまたはC)におき替ること、ii)欠落—DNA中の塩基が1つまたはそれ以上なくなること、したがってDNAは短くなる。iii)挿入—DNAの鎖中に新に1つまたはそれ以上の塩基が入ること、DNAは長くなる。iv)逆位—DNAの1部が順序が逆転することなどが起る。以上のような結果酵素蛋白質に起るであろう予想については後述する。

3) 変異誘導剤

突然変異はその名の如く自然に突然にも起っている。その確率は 10^{-8} 以下の程度である。

第2表 デオキシヌクレオチド生合成阻害による変異誘発剤

変異薬剤		阻害箇所
Ethyl urethan	$C_2H_5NHCOOC_2H_5$	プリン合成
Paraxanthine		プリン合成
Tetramethyluric acid		プリン合成
Theolromine		プリン合成
Theo phylline		プリン合成
Benzimidazole		プリン合成
Caffeine		プリン合成
8-Ethoxycaffein		チミン合成
6-Mercapto purine		プリン合成
5-Nitroquinoxaline		プリン合成
5-Amino uracil		チミン合成
Azaserine	$N_2CH_2COOCH_2CH \begin{cases} NH_2 \\ COOH \end{cases}$	プリン合成
チミン欠落		—
ウラシル大過剰添加		—

第3表 DNA中に取り込まれる変異誘発剤

核酸塩基類似体		塩基対形成相手	
		主として	まれに
5-Bromouracil		アデニン	グアニン
5-Chlorouracil		アデニン	グアニン
5-Iodouracil		アデニン	グアニン
2-Aminopurine		チミン	シトシン
2,6-Diamino purine		チミン	シトシン

つまり遺伝では情報伝達が非常によくて写し間違いは1億回に1回位しか起っていないことになる。私達は1億回に1回起る事象を待っておれないので変異を誘発させるような手段を講じる。用いられる手段は紫外線照射、化学薬剤と放射線の照射である。

紫外線照射では波長260m μ ~280m μ の紫外線照射が最も有効である。この波長の光によって細胞はどんどん死滅するが生残りの細菌中に変異株が沢山出現する。この現象は、DNA中のTが2残基互に並んでいる部分でチミン2量体が生じる。チミン2量体は一部可視光下でもとのチミンに戻るが、戻らない部分は、生物の自己治療とでも云うべき酵素が働いてチミン2量体を含む部分を切除する。その後へ修復酵素が働いてもとのDNAに修復する。つまりDNAの“つぎはり”をするが、これは割合不確実でよく間違ふ。つまり変異が起りやすいことになる。

薬剤による変異誘発の機序はいくつかある。第2表にまとめてあるのはDNAの構成単位(A, T, C, G)のうちのどれか1つ以上の合成を阻害するものである。例えば5-aminouracilを与えるとTの合成が阻害される。したがってA, G, Cは豊富にあるがTは欠乏しているという条件下でDNA合成が行なわれるので

正常ではTのあるべき位置にA, G または Cが入りこむことが起りやすくなり置換変異が起る。

第3表にまとめてある変異剤はA, T, G, Cの代りにDNA中に取り込まれるものである。代表的なものは5-bromouracil(5BU)と2-aminopurineであるが、5BUはTの代りにDNA中に取り込まれる。分裂に際してペアを組む相手としてAを選ぶが、たまに浮気をしてGを選ぶことがある。Gを相手に選ぶと変異になる。つまり5BUは安定な塩基対作成の相手が2つ以上あることが変異を起す原因となっている。

第4表には変異剤となる色素をまとめてある。これらの色素によってどうして変異が起るのか現在不明であるが欠落変異が起りやすい事は知られている。

第5表にはDNAと反応し修飾を起すものがまとめてある。脱アミノ反応やアルキル化剤が有名で特にN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineやethylene imineは常用の変異誘発剤である。特に前者は致死作用が少く誘発効果は大きい。また現在知られている最も効果的な発癌剤でもある。アルキル化と変異との関係は未知の点も少くないが推定では、i) DNA主鎖のりん酸基がアルキル化されPが triester となり加水分解され易くなること。ii) プリン塩基(AとG)の7の位置がアルキル化され不安

第4表 色素の変異誘発剤

変異薬剤	構造
Proflavin	
Acridine orange	
Toluidine blue	

第5表 DNAと反応し修飾する変異誘発剤

変異薬剤	構造	作用
亜硝酸塩	NO ₂	脱アミノ反応
Hydroxylamine	NH ₂ OH	ウランシ環分解
Hydrazine	NH ₂ NH ₂	ヒリミジン環の分解
酸	H ⁺	プリン塩基の分解 DNA 主鎖の加水分解
Azaserine		アルキル化
Bis(β-chloroethyl sulfide (ナイトロゲンマスタード)	S(C ₂ H ₄ Cl) ₂	*
Bethyl chloroethyl	C ₂ H ₅ -S-C ₂ H ₄ Cl	*
Diazomethane	N ₂ CH ₂	*
Diepoxybutane		*
Diethyl sulfate	SO ₂ (OC ₂ H ₅) ₂	*
Dimethyl sulfate	SO ₂ (OCH ₃) ₂	*
Epichlorohydrin		*
Ethyleneimine		*
Ethyl eshansulfate	C ₂ H ₅ OSO ₂ C ₂ H ₅	*
Ethyl methansulfate	C ₂ H ₅ OSO ₂ CH ₃	*
Formaldehyde	CH ₂ O	*
Glycidol		*
N-Methylbis(Chloroethyl) amine	CH ₃ N(C ₂ H ₄ Cl) ₂	*
Methyl methane-sulfate	CH ₃ OSO ₂ CH ₃	*
N-Nitroso-N-methyl urethan		*
N-methyl-N'-nitro-N'-Nitrosoguanidine		*
Phenol	C ₆ H ₅ OH	*
β-Propiolactone		*
Propylene oxide		*
Triethylene melamine		アルキル化

定となり、7-アルキル化プリンが DNA から外れる。次いで塩基が外れた主鎖部分が不安定で加水分解されやすくなる。この後の修復時の間違いが変異になると一応は説明されている。

放射線として変異を誘発するものはα-, β-, γ-(X-), 陽子線, 速中性子線などである。α-線は射程に非常に密にイオン対を作る。線源にもよるが、空気中ではα粒子は7~8cm飛ぶのみであるが1cm当り6万 ion 対を生じるので遺伝子が飛程上にあれば変異が起りやすい。しかし飛程は水中ではミクロン単位であるので使いにくい。β-線は³²Pのβ線でA1板800 mg/cm²の貫通力しかない。イオン対は空気中でその飛程にそって43(³²P), 120(¹⁴C), 900(³H)程度である。γ-線またはX-線はイオン対の生成は前二者に比して遙に少ないが貫通性がよいので変異に使用されることがある。大量照射が必要である。照射量(D)と変異株の出現頻度(M)との間に次のような関係があり

$$M = C D$$

死滅曲線は

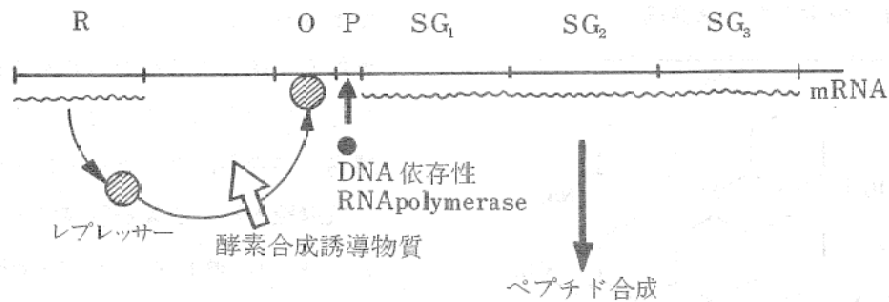
$$dN/dt = -kN$$

$$N = N_0 e^{-kt} = N_0 e^{-k'D}$$

N: 生存菌数 ; t: 照射時間
N₀: 初発菌数 ; D: 照射線量
k, k': 定数

4) 変異株の酵素生産

以上のようにして変異株が得られたとして、その変異株の酵素が質または量の点でどのように変異しているかは変異を起した部位および起し方によって違ってくる。しかも酵素蛋白質中のアミノ酸変化によって活性がどう変化するかという事はさらに難問題である。私達の最終目標は所望の酵素活性から突然変異をデザインし、それを効果的に遂行することであるがまだまだ先の事のようなのである。変異の部位ないし変異様式と酵素活性の関係を理解するために第1図に



R : 調節遺伝子
 O : オペレーター遺伝子
 P : プロモーター
 SG₁、SG₂、SG₃ : 構造遺伝子

第1図 Jacob と Monod の仮説による遺伝子調節モデル

Monod と Jacob²⁾の仮説を説明しておく次のようである。

DNA はその働き方から分類して構造遺伝子、オペレーター、プロモーター、レギュレーターなどの各遺伝子からなっている。構造遺伝子の部分はその酵素のアミノ酸配列を書いている部分で前述のように8塩基対で1つのアミノ酸を記録している。ほかに終止記号がある。通常構造遺伝子は数個集って1つの集団となっており、1つのオペレーター遺伝子の制御下にありオペロンと呼ばれている。オペレーター部は構造遺伝子と隣接しておりその一部がプロモーターと呼ばれる部分になっている。プロモーター部分は DNA 依存性 RNA-polymerase なる酵素の第1次作用点であり、ここに酵素が結合してメッセンジャー RNA (mRNA) の合成が始まる。

mRNA は DNA の情報を RNA に写したものでこの青写真はリボソームなる工場で作成される。調節遺伝子の部分ではレギュレーター(蛋白質のこともあるし核酸のこともある)を作っており、この物質はオペレーター部に結合すると mRNA 合成が阻止される。しかしレギュレーターは誘導物質と結合するともはやオペレーター部に結合しなくなる、つまり mRNA が合成されて酵素が作られるようになる。以上のように変異と云っても

構造遺伝子、オペレーター、プロモーター、レギュレーターの各遺伝子上で起った変異はそれぞれ違った表現型を取るようになる。

構造遺伝子上の変異 : 構造遺伝子上の置換変異はその酵素蛋白のアミノ酸の置換になる。例えば DNA 上の AAA のコードは mRNA で UUU を意味し、蛋白質の配列中フェニールアラニンを指定したものであるが ATA になればチロシンに ACA になればシスチンに AGA になればセリンにそれぞれアミノ酸が変化する。この変化が酵素活性に与える影響は、(1)それが活性中心ならば酵素活性がなくなる。(2)活性はあるが、低活性、低基質親和性、低耐熱性などの酵素を生産する。(3)特に変化がない。などがあるが現在の酵素学の知識では予見できない。

構造遺伝子上の置換変異のうち、新に TTA と TCA が生じるものは例外である。mRNA 上に UAA と UGA が生じこの記号は終止符に相当する。したがってその点でペプチド合成が打切られ短いペプチドが合成される。通常このような重大な変化をうけた酵素は不活性であるが、その他に polarity という現象がある。これは同じオペロンに属する一群の酵素は同じ mRNA に転写されるが、上位の構造遺伝子に UAA または UGA が生じ、ペプチド合成が終

ってから、次の酵素蛋白のペプチド合成開始信号まで距離が生じる。この距離をリボソームが移行する間に脱落を起しやすい。つまり、下位の酵素が生産されにくくなる。つまり終止記号を生じた蛋白質の活性が0になるだけでなく下位の酵素活性が低下する。

構造遺伝子上の欠落変異は欠落塩基の数によって効果が異って来る。大きい欠落では酵素活性はなくなる。一般に $3 \times n$ 個の塩基対の欠落で n 個アミノ酸の少ない蛋白になる。 $3n \pm 1$ 個の欠落の場合には所謂 frame shift の現象がおこる。今 mRNA の段階で

A G C A A U G G A A

であったとする。(AGC)はセリン、(AAU)はアスパラギン、(GAA)はアルギニンを意味する。いま左端のAが欠落すると読みわくが(GCA)(AUG)(GAA)となりこれはアラニン・メチオニン・グルタミン酸となり全く違った蛋白質になる。その他新しい読みわくでUA A または UGA が生じる可能性が $1/32$ ある。これが生じると前述の polarity を生ずる。

構造遺伝子の挿入変異は欠落変異と同様であるがアミノ酸数は増加する。frame shift および polarity は同様である。

プロモーター遺伝子における変異では2つの事象が主として起る。その1つは mRNA の生産量に関係する、つまり DNA 依存性 RNA 合成酵素と親和性が増加または減小する様な変異がおこると合成酵素蛋白質が量的に変化する。もう1つはプロモーター部位は $2', 3'$ -環状アデニール酸(cAMP)が結合する部分であり、cAMP と結合しているときのみ mRNA 合成が可能であるような酵素群がある。いわゆる "catabolite repression" を受ける酵素群であり、代謝調節に関係する酵素に通常見られるものである。

オペレーター部位での変異 酵素合成の自動制御の中心部であり、次に述べるレプレッサー

遺伝子と密接に関係している。調節遺伝子の生産物レプレッサーがこの部分に結合すると mRNA の合成が停止し、外れると mRNA が合成され酵素合成が開始される。オペレーター部位の変異でレプレッサーが結合しなくなると調節できなくなり、何時でも最大量の酵素蛋白質を作るようになる。このような完全な失調型から部分的な失調型まで色々の程度の変異株がある。

調節遺伝子での変異 レプレッサーが蛋白質であることも、また核酸関連物質であることもある。乳糖加水分解酵素の調節遺伝子は唯1つであり、¹⁾(大腸菌)レプレッサーは蛋白質であるが、ヒスチジン合成の酵素系においては調節遺伝子が少くとも5ヶ知られており、³⁾最終的に調節作用を持っているものはヒスチジル転移RNA であると云われている。

5) 酵素生産性

現在の遺伝学から見た酵素生産量支配の可能性を見て来た。種々の変異によって酵素生産が変化しうるのは前述の通りである。第6表にオペレーター遺伝子や種々の調節遺伝子の変異がヒスチジン合成酵素の生産性を変える様子を示しておく。His O はオペレーター 遺伝子であり、His S, His T, His R, His W, His U は何れも調節遺伝子である。

第6表 ヒスチジン調節遺伝子変異株のヒスチジン合成酵素量

菌 株	ヒスチジン添加培地	最少培地
野 生 株	0	(1.0)
His O 1202		6.7
His O 1242	13.0	14.6
His S 1210	1.1	5.5
His S 1211	3.8	10.0
His T 1504	8.8	9.4
His R 1223	6.8	7.0
His U 1817	12.0	9.5
His W 1825	6.7	7.6

プロモーター遺伝子の生産性に対する作用は *Bacillus subtilis* の形質転移の実験でよく示されている。⁴⁾ *Bacillus subtilis* 168 は α -amylase 生産性定数 20 のものである。同じく 3212 株は生産性定数 1 のもので、両方の α -amylase は電気泳動上の性質が異なる。(つまり、アミノ酸配列が違っている。) 168 株から α -amylase の構造遺伝子部分に変異が生じ α -amylase 活性のない変異株 168 amy⁻ 株を作る。この株はプロモーター一部は生産性定数 20 (P₂₀) と欠損した amylase 構造遺伝子 (amy⁻) をもっている。これに 3212 株から作成した DNA を用いて transformation を行った結果を第 7 表に示す。3212 株の P₁ と amylase 構造遺伝子の部分を受取ったもの、P₂₀ はそのままで構造遺伝子の欠損部のみを受取ったもの種々が現われる。

第 7 表 3215 株 (P₁・amy⁺) の DNA により 168 P₂₀ amy⁻ 株から得られた形質転移株の性質

P ₁ のもの	amylase プラス株	
	P ₂₀ のもの	
	3215 株型の amylase を作るもの	168 株型の amylase を作るもの
30	6	9

6) 遺伝子用量説

同じ酵素を生産する構造遺伝子が 2 つ以上あれば酵素生産性はそれぞれの遺伝子に特有の生産性の和で示される。*Saccharomyces cerevisiae* のマルターゼは重複遺伝子支配をうけ構造遺伝子 M₁, M₂, M₃, M₄ があり、うち 1 つが優性であれば maltase プラスとなる。この 4 つの遺伝子の組合せで生産性の変化をしらべた結果を第 8 表に示す。⁵⁾ こゝでは相和の法則が成立することがわかる。この他大腸菌に乳糖代謝系の遺伝子をフェージで重複させたときも同様の結果になる。

第 8 表 酵母の maltase 生産性と遺伝子型

遺 伝 子 型	酵 素 生 産 性	
	測定値	計算値
M ₁ M ₁ m ₂ m ₂ m ₃ m ₃ m ₄ m ₄	2090	
m ₁ m ₁ M ₂ M ₂ m ₃ m ₃ m ₄ m ₄	300	
m ₁ m ₁ m ₂ m ₂ M ₃ M ₃ m ₄ m ₄	1000	
m ₁ m ₁ m ₂ m ₂ m ₃ m ₃ M ₄ M ₄	1100	
M ₁ m ₁ M ₂ m ₂ M ₃ m ₃ m ₄ m ₄	1625	1700
M ₁ m ₁ m ₂ m ₂ M ₃ m ₃ m ₄ m ₄	1450	1550
M ₁ m ₁ M ₂ m ₂ m ₃ m ₃ m ₄ m ₄	1280	1200
m ₁ m ₁ m ₂ m ₂ M ₃ m ₃ M ₄ m ₄	950	1050
m ₁ m ₁ M ₂ m ₂ m ₃ m ₃ M ₄ m ₄	790	700

7) *Bacillus subtilis* における特殊例

通常の酵素においては mRNA は合成されてから酵素合成に使用され、数分後には分解されて行く。しかし *B. subtilis* の α -amylase の例ではその寿命が非常に永いと考えられている。⁶⁾ このような例は赤血球のヘモグロビン合成をはじめ、*B. subtilis* の蛋白分解酵素、麹菌などのカビの amylase や蛋白分解酵素など細胞外へ分泌される一連の酵素がそうである。mRNA の長寿命説の根拠となった実験を専門的になるが列記しておく

i) *B. subtilis* の α -amylase 生産はふつうの蛋白合成とは比例せず、他の一般蛋白質とは違った速度式に従っている。

ii) アミノ酸から蛋白質を合成する段階を阻害すると、 α -amylase 生産は確実に阻害される。阻害の方法は、puromycin や chloramphenicol のような抗生物質、5-fluorophenylalanine のようなアミノ酸類似物質を添加したとき、またはロイシン要求性の変異株をロイシン欠の培地に移したときいずれも同じ結果が得られている。この条件では一般蛋白質の合成も停止され増殖もむろん止る。

iii) mRNA 合成を阻害しても α -amylase 生産は止まらないが、一般蛋白質合成は阻害され増殖も阻害される。mRNA を合成阻害する

方法は actinomycin D を添加すること、uracil 要求菌を作り uracil 欠の培地に移すことなどによって行なわれるが同じ結果になる。

mRNA の他の阻害剤 rifampin の効果については種々異論があったが最近この薬剤の致死効果が非常に大きい事から共通解釈が成立つようになった。

IV) 同調培養(各細菌が一せいに細胞分裂を開始するように同調させたもの)では通常の酵素は世代時間中一回増加するのみであるが、 α -amylase は何時でも増加しつづける。

V) α -amylase の mRNA が安定であるという仮説から求めた速度式

$$E = k \int_{t-\theta}^t x \cdot dt \quad \dots (1)$$

ただし、 t : 培養時間 x : 菌体量

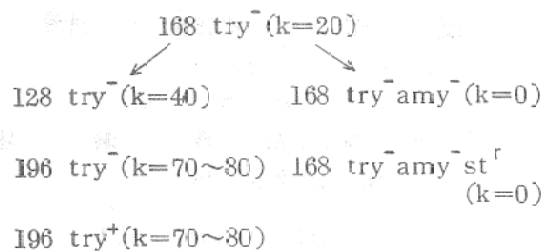
k : 定数 θ : mRNA の平均寿命

E : α -amylase 生産量 $t-\theta$ が負になるときは 0 とする

に非常によく一致する。

したがって酵素生産性を決定する因子は k と θ の 2 つになる。今まで述べて来た事はすべて k に関連したことであったが、新に θ という項が加わったことになる。変異によって θ の値が変化して生産性が上昇するような事が充分考えられる。著者の研究室の結果では未だ θ が変化した例がないが、将来において充分可能であろう。

以上の量支配の他に未知の支配機構が存在するらしい。前述の *B. subtilis* 168 から出発して二段階の変異によって α -amylase 生産性の優れた株をとる。



この 3 つの株の培養経過を (1) 式に従ってプロットするとこの傾斜が k 値となる。168 株→128 株の変異は hap 遺伝子 128 株→196 株の変異は hap 遺伝子で起ったとする。168 株から変異によって α -amylase 生産性は 4 倍になったことを意味するが、この間の変異によって酵素蛋白質は変化をうけていない。⁷⁾ θ の値も不変でたゞ k 値が変わっただけである。168 try⁻ amy⁻ st^r を受納菌とし、196 try⁺ の DNA を用いて形質転移をすると、amylase の構造遺伝子が導入されると同時に hap 遺伝子が導入された菌がとれ $k=50$ 位の株が出現する。この導入菌の protease は 168 株に較べると約 30 倍生産性が向上しており、その他バクテリオファージ PBS 1 に対する耐性を獲得し、運動性がなくなり、さらに鞭毛が欠けている。⁸⁾ このような多現象の遺伝子が酵素生産性を量的に支配していることは全く未知であり、今後の課題であろう。

文 献

- 1) Martin R.G., Magdasarian M., Ames, B.N. and Roth J.: "Metabolic Regulation and Enzyme Action" Sols and Grisolia Ed. pl Academic Press, New York (1969)
- 2) Jacob, F and Monod, J.: Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 193, 389 (1961)
- 3) Lewis, J.A., and Ames, B.N.: J. Mol. Biol., 66, 131 (1972)
- 4) Sekiguchi, J., and Okada H.: J. Bact. (投稿中)
- 5) Gorman, J., Tauro, P., La Barge, M. and Halvorson, H.O.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 43 (1964)
- 6) Kinoshita, S., Okada, H. and Terui, G.: J. Ferment. Technol., 46, 427 (1968)
- 7) Sekiguchi, J. and Okada, H.: J. Ferment. Technol. 50, 801 (1972)
- 8) Sekiguchi, J., Takada, N. and Okada, H.: J. Bact. (投稿中)