



Biochemical Studies on Bacterial β -Amylase and Its Secretion

南森, 隆司

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Date of Publication)

2007-10-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0459

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000459>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	南 森 隆 司 (大阪府)
学位の種類	学 術 博 士
学位記番号	学博い第 30 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和 59 年 3 月 31 日
学位論文題目	Biochemical Studies on Bacterial β -Amylase and Its Secretion (細菌 β -アミラーゼとその分泌に関する生化学的研究)
審 査 委 員	主査 教授 西 羅 寛 教授 名 武 昌 人 教授 吉 川 三 吉 教授 金 久 武 晴

論 文 内 容 の 要 旨

細菌起源の β -アミラーゼの存在が認められたのは最近で、酵素生産量もダイズ、大麦などの植物 β -アミラーゼのそれに比して低く、実用化にも問題点があり、その酵素化学的・タンパク化学的諸性質も知られていない。一方、最近、*Bacillus* 属のタンパク分泌能が注目され、研究されはじめているが、*Bacillus* 属の β -アミラーゼ分泌過程の研究はない。

著者は、*Bacillus cereus* の生産する β -アミラーゼの分泌能を上げる目的で、高分泌型変異株の育種と、その酵素の精製を行い、酵素学的・物理化学的諸性質を調べた。さらに、精製 β -アミラーゼに対するウサギ抗血清を作成し、それをを用いて、他の β -アミラーゼとの血清学的比較研究を行った。又、 β -アミラーゼの分泌過程の研究を行う際、免疫化学的方法 (Western-Blotting method) を適応した。一方、*B. cereus* の RNA 画分を、*E. coli* K12 株のタンパク合成系で翻訳させ、生成タンパクの分離・同定を試み、分泌過程の機作を検討した。

第一章では、高 β -アミラーゼ分泌変異株の分離を目的とした。 β -アミラーゼ生産株、*B. cereus* BQ10-S1 を親株とし、その孢子懸濁液を、リファンピンを含む寒天培地上にまき、UV照射をし、リファンピン耐性のコロニー中より、 β -アミラーゼ高分泌型の変異株 *B. cereus* BQ10-S1 SpoII をえた。(菌体外の β -アミラーゼ活性が 4 倍に上昇) 又、この変異株は、 β -アミラーゼのみならず菌体外プロテアーゼの活性も増加しており、かつ、菌体外分泌タンパク量も約 4 倍増大していた。(Agric. Biol. Chem., 47(3), 609-611, (1983))

第二章では、*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の分泌する β -アミラーゼの精製と一般的性質の検討

を述べた。培養液の硫酸分画，ゲルろ過（セファデックス G-100），イオン交換法（CM-セファデックス C-50）により精製した。この精製酵素は，ディスク電気泳動的並びに，超遠心的に均一なタンパクであることが判明した。その至適 pH は 7.0 至適温度は 40 °C であった。又，可溶性デンプンを基質として用いた場合の km 値は，0.4% であり，酵素活性は 5×10^{-9} M の PCMB で失活したが同濃度の DTNB では影響をうけなかった。又，植物 β -アミラーゼは，生デンプ粉を分解できないが，本酵素は，小麦，トウモロコシの生デンプ粉を，5%，2% の率でそれぞれ分解した。

第三章では，*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の精製 β -アミラーゼの物理化学的・タンパク化学的性質を検討した。細菌 β -アミラーゼの分子量は，*B. megaterium*，*B. cereus* var *mycoides* では，35,000 前後，*B. polymyxa* No 72 で 44,000 と報告されている。しかし，それらはすべてゲルろ過法での測定値である。*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の分子量も，セファデックス G-100 を用いるゲルろ過法では 35,000 と測定されるが，それに比して，沈降係数が $4.8 S_{20w}$ と非常に高値がえられた。そこで，SDS-電気泳動法（SDS-PAGE）で測定すると，60,000，超遠心を用いた沈降平衡法では 63,500 という値が測定された。6 M の塩酸グアニジンで β -アミラーゼを変性させ，6 M 塩酸グアニジンで平衡化したセファクリル S-200 カラムでのゲルろ過法では 62,000 と推定された。次に，精製 β -アミラーゼのアミノ酸組成を調べた。システイン残基は，過ギ酸酸化法で定量的に同定し，1 分子中に 1 残基とした場合，総残基数 486 個で分子量が約 55,000 と推定された。逆に，分子量を，SDS-PAGE で測定した値（60,000）とすれば，1 分子中に 1 個の SH 基の存在が判明した。（Elluman 法による SH 基の定量並びに，Riordan 法による SH 基の定量）なお，DTNB は，SDS で β -アミラーゼタンパクを変性させた条件下でのみ反応することが判明した。これらの結果より，*B. cereus* の β -アミラーゼの分子量は約 60,000 で分子内に唯一個のシステイン残基が存在することが認められた。（Agric. Biol. Chem., 47 (5), 941-947 (1983)）

本酵素の等電点は 8.3 とアルカリ側にあり，分子内に糖鎖の存在が PAS 染色法により検出された。

第四章では，*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の β -アミラーゼに対するウサギ抗血清を作成し，細菌 β -アミラーゼの血清学的研究を行った。

B. cereus BQ10-S1 SpoII と，その親株である。*B. cereus* BQ10-S1 の β -アミラーゼは，アミノ酸組成も等しく，又，オクタロニープレート上で，免疫沈降線が完全に融合し，血清学的にも同一の酵素であることが認められた。又，*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の免疫沈降線と，*B. megaterium* strain No 32 のそれとは Spur 形成がみられ，両酵素分子内に，抗原-抗体反応に関与する類似したヘプチド鎖があると推定された。

しかし，*B. polymyxa* No 72 の β -アミラーゼや，soybean 等の植物型 β -アミラーゼは，*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の anti- β -amylase serum と，免疫反応が認められなかった。一方，本抗血清を用いて，*B. cereus* BQ10-S1 と，*B. cereus* BQ10-S1 SpoII の培養液の免疫沈澱物を調製し，そのタンパク量を Lowry 法で定量し，培地 1 ml あたりに分泌された β -アミラーゼ量を定量した。親株（BQ10-S1）では $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ であるのに対し，BQ10-S1 SpoII では， $95 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

第五章では、 β -アミラーゼ高分泌型変異株 (*B. cereus* BQ10-S1 SpoII.)の β -アミラーゼ分泌機作についての研究を行った。

^{14}C -アミノ酸を培地に添加し、一定時間培養し、その菌体外液および Cell-homogenate 液に、 β -amylase-antiserum を加え、菌体外および、菌体内免疫沈澱物を調製した。それらへの ^{14}C のとりこみを測定した結果、対数増殖期中～後期に分泌が最も盛んであることが判明した。又、免疫沈澱物を SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜にうつしかえ、蛍光抗体を用いて同定を行った結果菌体外からは、分子量 6 万の β -アミラーゼのみ同定されたが、菌体内免疫沈澱物からは、6 万の β -アミラーゼと分子量約 11-12 万の高分子タンパクの二つのバンドが検出された。この高分子タンパクの意義を調べるため、*B. cereus* BQ10-S1 SpoII から m-クレゾールおよびフェノール抽出でえた RNA 画分を、*E. coli* K12 株より調製したタンパク合成系で翻訳させ、反応液の免疫沈澱物を調製した。それを、SDS-PAGE し、ゲルを細分し、各部分への ^3H -leucine のとりこみ量を測定し、blank (RNA 無添加反応液の沈澱物) と比較した結果、分子量 10-11 万の画分に放射活性が認められた。これらのことは、 β -アミラーゼが高分子前駆体として合成され、分泌の過程で分子量約 60,000 の $\text{exo-}\beta$ -amylase に成ることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

β -アミラーゼはデンプン、グリコーゲン、デキストリンなど α -1, 4-グルカンのグルコース鎖の非還元性末端から順次 β -マルトースを分離する酵素 [E.C. 3.2.1.2, α -1, 4-Glucan maltohydrolase] である。従来、 β -アミラーゼは高等植物のみにその存在が確認されていた酵素であるが、最近、微生物にもその分布が認められてきた。

本論文は、細菌 β -アミラーゼの工業的生産用優良菌株の分離、生産される β -アミラーゼの物理化学的、酵素化学的諸性質の精査ならびにその分泌機構に関する生化学的研究をまとめたものであり、これまで知見の不十分であった細菌 β -アミラーゼの分野における研究成果として高く評価できるいくつかの知見を提示している。その成果を要約すると次のとおりである。

- 1) 土壌から分離された野生株 *Bacillus cereus* BQ10 の紫外線照射変異株 *Bacillus cereus* BQ10-S1 を親株として、さらに紫外線照射による変異誘起処理とリファンピン耐性によって孢子形成能欠損変異株 *Bacillus cereus* BQ10-S1 SpoII (BQ10-S1 SpoII) を分離した。BQ10-S1 SpoII は野生株にくらべて約 100 倍の酵素を生産し、培養後期での β -アミラーゼの失活現象はなく、長時間にわたって安定であることを示し、工業的生産菌株として有望であることを明らかにした。
- 2) BQ10-S1 SpoII の β -アミラーゼを精製して電気泳動的、超遠心的に均一な酵素標品を得た。この精製酵素標品を用いて β -アミラーゼの酵素化学的諸性質を明らかにし、他の細菌及び植物の β -アミラーゼと比較してその違いを示した。とくに、SH 試薬による酵素阻害実験から酵素 1 モル当り 1 個の SH 基の存在することを確認し、また、従来検討されていなかった生デン

ブンに対する分解作用を調べ、BQ10-S1 SpoII の β -アミラーゼは生デンプンを分解する事実を指摘した。

3) 従来、細菌 β -アミラーゼの分子量はゲル濾過法で測定され 35,000 ~ 44,000 の範囲内とされてきたが、BQ10-S1 SpoII の酵素標品の沈降係数が 4.8 S_{20, w}であることから、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、沈降平衡法、アミノ酸分析法による分子量の測定を行い、ゲル濾過法で測定された分子量について再検討し、その結果、細菌 β -アミラーゼの分子量は約 6 万であることを明らかにした。

4) BQ10-S1 SpoII の β -アミラーゼに対するウサギ抗血清を調製し、二重拡散法で β -アミラーゼの血清学的性質について研究した。その結果、本変異株の β -アミラーゼは親株の β -アミラーゼと血清学的にも同一の酵素であり、また、本変異株と *Bacillus megaterium* の β -アミラーゼには共通の抗原決定基の存在することを認めた。しかし、*Bacillus polymyxa*、大麦及び大豆の植物型 β -アミラーゼには本抗血清との免疫反応は認められなかった。さらに、本変異株は親株の約 4 倍の蛋白質高分泌型の変異株であることを免疫学的に証明した。

5) BQ10-S1 SpoII を ¹⁴C-アミノ酸混合物を含む培地で培養し、その生育菌体内及び菌体外の抗血清による蛋白質の沈澱物の放射活性を測定し、ついでこの沈澱物を蛍光抗体を用いて同定する Western-Blotting 法で調べる *in vivo*での実験、及び本変異株菌体から調製した RNA-画分と *Escherichia coli* K12 から調製した蛋白質合成系を用いる *in vitro*の実験から、本変異株の β -アミラーゼは菌体内で分子量約 11 ~ 12 万の前駆体様蛋白質が先づ合成され、分泌に際して分子量約 6 万の β -アミラーゼになるものと推定される興味ある実験結果を示した。

以上のように、本論文は細菌の生産する β -アミラーゼについて、高酵素分泌型細菌の分離、細菌 β -アミラーゼの生化学的、免疫学的手法による諸性質とその分泌機構を巾広く研究したものであり知見の不十分な β -アミラーゼの研究分野において高く評価される重要な知見を得たものとして、基礎的及び応用的価値ある集積であると認める。

よって、論文提出者の南森隆司は、学術博士の学位を得る資格があると認める。