

氏名	寶 徳 献		
学位の種類	学 術 博 士		
学位授与番号	博甲第 784 号		
学位授与の日付	平成元年 9 月 30 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)		
学位論文題目	STUDIES ON RESTRICTION ENDONUCLEASES PRODUCED BY THE GENUS <u>ACIDIPHILUM</u> 「 <u>Acidiphilium</u> 属細菌の生産する制限酵素に関する研究」		
論文審査委員	教授 田野達男	教授 鈴木幸雄	教授 田中英彦
	教授 奥 八郎	教授 土屋友房	

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究において Acidiphilium 属好酸性細菌の多くの株に制限酵素が存在することを初めて明らかにした。精製に先立ち制限酵素のスクリーニング方法を確立した。分類同定が行われた 5 株について検討した結果、そのうち 3 株に活性が見られた。それらを部分精製し 16R と 22M 株の生産する酵素が共に PvuI のイソチゾマーであることを明らかにした。分離源の異なる両菌は生理学的な性質も類似しており進化の点からも興味深い。重金属耐性を示す未同定の 65 株についてスクリーニングを行った結果、内 27 株に制限酵素活性が見い出された。その中に大量に制限酵素を生産する 28H 株を発見した。28H 株から制限酵素 AfaI を電気泳動的に均一に精製した。本酵素の諸性質を詳細に検討した。本酵素は分子量 30,000 のモノマー酵素であった。AfaI の認識切断部位を検討し、5'-GTAC-3' の 4 塩基を認識し T と A の間を切断する RsaI のイソチゾマーであることを明らかにした。RsaI との比較検討を行った結果、本酵素は RsaI より熱に対して比較的安定であり、更に AfaI の生産量が RsaI の 100 倍であることから実用化されるに至った。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

寶 徳 献 は Acidiphilium 細菌の重金属耐性機構について研究を進める過程で、本菌中に強い制限-修飾系が存在することを見出した。本菌は 1980 年に発見された比較的新しい好酸性従属栄養細菌であり、生育が速く容易に純粋培養ができるなどの利点がある。この点に着目して Acidiphilium 属細菌における制限酵素の検索及びそれら酵素の精製と性質

について検討を行い、次のようにまとめた。

1) *Acidiphilium* 属細菌の菌体を従来の超音波破碎法，フレンチプレス処理法とは異なり，Brij58で穏やかに溶菌した後，遠心分離により得られる上澄を用い，的確に制限酵素を探知する方法を確立した。この方法により酸性鉱山廃水，河川水から分離した菌株中，既に分類同定された5株，および種が未同定の重金属耐性株65株についてスクリーニングを行い，前者からの3株，後者からの27株に制限酵素活性を見出した。2) *A. facilis* 16株と22M株から *Afa*16RIと *Afa* 22MIを分離精製し，性質を検討した結果，両酵素は相互イソチゾマーであると同時に *Pvu*I のイソチゾマーであって，5'-CGATCG-3'の6塩基対を認識し，TとCの間を切断する活性を持つことを明らかにした。しかし，前者がスター活性を示すのに対し，後者にはそれが認められず，異なった性質を有しながら互いにイソチゾマーであることを明らかにした。3) *A. facilis* 28Hから制限酵素を硫酸ストレプトマイシン処理，硫酸分画，各種クロマトグラフィーにより電気泳動的に均一に精製し，*Afa* Iと命名した。この酵素は分子量約30,000 Daであって，5'-GTAC-3'の4塩基を認識し，TとAの間を切断する *Rsa* I のイソチゾマーであり切断部位も同一であった。しかし，本酵素は *Rsa* I より熱に対して安定であり，更に生産量が *Rsa* I の100倍であることなどから実用化されるに至っている。制限酵素は遺伝子操作に不可欠の酵素であり，現在150種余り800以上の制限酵素が知られている。しかし，制限酵素生産菌にとって，自身のDNAをその生産する制限酵素の攻撃から守ることが必要であり，酵素遺伝子の発現調節などの問題が複雑に絡んで制限酵素を多量に生産する菌は少ない。こうした理由から制限酵素が均一に精製された例は極めて少なく，広範に利用されているわりには諸性質について不明な点が数多く，本論文はこれらの問題点の解明に資するものとする。本学位審査委員会は，上記の論文内容，参考論文を総合的に審査した結果，学術博士の学位に値するものと判定した。