好アルカリ性微生物

掘越 弘毅
理化学研究所

好アルカリ性微生物の再発見

1968 年の秋のことである。筆者は培地の pH に興味を持った。教科書には、バクテリアは中性から微アルカリ性で生育させるのが普通であると書かれている。酸性の pH に関しては食品に酸性のものが多いせいとか、比較的多く研究され、好酸性微生物と名づけられている。しかし、アルカリ側ではあまり研究が行われていない。そこで筆者は、1% 炭酸ソーダを含むアルカリ性培地を作り、これに少量の土壌を入れ、37℃ で一夜培養してみた。その結果、用いた 30 種の土壌全部に pH 10.3 で生育する微生物がいることがわかった。

早速これらの微生物について研究を開始するとともに、過去の文献を調べた。1934 年オランダ人の Vedder が炭酸ソーダを含む培地に生育するバチルスがいることを報告したのがその最初である⁽¹⁾。そしてその微生物を *Bacillus alcalophilus* と名づけた。その後約 20 年間はまったく報告がなかったが、1959 年になって Kushner は、*B. cereus* をトレーニングにより pH 10.3 においても生育可能にした⁽²⁾。さらに 1961 年には *B. circulans* の 1 種が pH 11 まで生育することを示した⁽³⁾。一方、日本では 1962 年、高原、田辺らによって日本古来の“藍染め”において、pH 11 で生育する *B. alkaliphilus* によってインディゴが還元されることが報告された⁽⁴⁾。しかし、これらの報告はいずれも断片的であり、生産物や分布などについてはまったく調べられていなかった。そこで、筆者は 1969 年頃より系統的にスクリーニングを開始し、その生産物、とくに酵素について、従来のものと大きく異なっていることを明らかにした。同時にこのような微生物が世界中に広く分布していることを知った。そこで、これらの微生物群を“好アルカリ性微生物

(alkalophilic microorganisms” と名づけた⁽⁵⁾。

好アルカリ性微生物の分離

好アルカリ性微生物を分離するためには、まずアルカリ性の培地を調製せねばならない。培地の pH の調製に水酸化ナトリウムを用いると、pH が菌の生育に伴って低下してしまい目的にあまり合わない。そこで種々検討した結果、1% の炭酸ナトリウムを培地中に加えることによって、培地の pH を 10 前後に保ちうることがわかった。それ以来、好アルカリ性微生物のための培地にはすべて 1% の炭酸ソーダ、または炭酸水素ナトリウムなどを加えて pH を調節している。

微生物の生育に必要な栄養源を含む寒天培地を殺菌した後、別途殺菌した炭酸ナトリウム溶液を 1% の濃度になるように加え寒天プレートを作る (表 1)。一方、耳かき 1 ～ 2 杯の土壌を 1 ml の滅菌水に分散させて、微生物分離用の土壌試料を作る。この試料の 1 滴をアルカリ性寒天培地上に滴下し、以下定法に基づいて 30 ～ 37℃ で 1 ～ 3 日間放置し、出現したコロニーを拾いあげ、斜面培地に植え替えて保存する。

表 1 基本培地

	I-培地 (g/l)	II-培地 (g/l)
グルコース	10	
可溶澱粉		10
ポリペプトン	5	5
酵母抽出物*	5	5
K ₂ HPO ₄	1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.2
Na ₂ CO ₃	10	10
寒天	20	20

* Difco 社のものが望ましい。

好アルカリ性微生物の分布状況と環境

好アルカリ性微生物の分布は生態学の面からみても興味のある問題である。ある特殊な条件下の場所にしか存在しないのか、それとも普遍的に分布しているのか。筆者らが調べた限りでは、世界中一応どこにでも分布していると考えてよい。1gの土壤に含まれている好アルカリ性菌の数については着々とデータは集まっているが、pH 4~10の土壤中から $10^2 \sim 10^5$ 個の割合で見いだされている。通常の中性の微生物の数の1/100~1/1000程度含まれていると見てよい⁽⁶⁾。また最近になって好塩性の好アルカリ性微生物がアフリカの塩湖から見つかるなど、分布している地域はますます広がってきている。

ところで、本来アルカリ性のpHでしか生育できないはずの好アルカリ性細菌が弱酸性の土壤中でも分布しているのはなぜだろうか。さまざまな要因が複雑にからみ合っていると思われるが、この疑問に多少答えうる実験結果が2つある。その1つは好アルカリ性菌による環境の適応化である。最適生育pHを9付近に持つ好アルカリ性菌を種々のpHの培地で培養し、培地のpHの変化を調べてみると、時間とともに周囲のpHを自分のもっとも都合のよい（この場合はpH 9くらい）値に変化させてしまうことがわかった。環境に順応するというよりも、環境を自分に都合のよいように順応させてしまう（もっとも、培地の組成によってはこのようにならないこともあるが）。したがって、弱酸性土壌や中性土壌中に存在しているのもこのような環境調節機構によって、アルカリ性の小宇宙を作っているためかもしれない。

もう1つは、微生物どうしの相互作用に関する実験である。好アルカリ性微生物が土壌中で生育してゆくためには、数の上でははるかに多い通常の微生物（neutrophilic microorganisms）との相互関係を考えなければならない。この問題については直接実験することは困難である。そこで次のようなモデル実験を行ってみた。材料としてpH 4~5でよく生育する麹カビ（*Aspergillus oryzae*）と、pH 6~8でよく生育し、麹カビを溶菌させる力のある*B. circulans*⁽⁷⁾、それにpH 7.5以下では生育のきわめて悪い好アルカリ性*Bacillus*の1株をpH 5.5に調製した培地に植菌し、培養してみた。

まず最初に麹カビが生育し、3~4日頃になると自己

消化のため培地のpHが若干高くなるとともに*B. circulans*が生育を始め、溶菌酵素を作り、麹菌を溶かしてしまう。そのため培地のpHはますます高くなり、pH 8くらいになると今までまったく生育できなかった好アルカリ性バチルスが生育を始める。結果として、pH 5の培地中に好アルカリ性細菌が生育したことになる。このような現象が土壌中でも起こっていて、一見酸性に思われる土壌中にも好アルカリ性微生物が生育しているのではないかと考えられる。

菌体内 pH

多くの好アルカリ性微生物の生育のための最適pHは10付近であり、これが今までよく知られてきた微生物群と大きく違っている点である。菌体内pHは微生物の生命現象を維持するための細胞内の反応の重要なパラメーターの1つであり、菌体内外にpH勾配を形成しイオンや基質の移動に影響を与える。微生物の菌体内pHは直接測定が困難なため、種々の間接的方法が考えられている⁽⁸⁾。好アルカリ性微生物の菌体内pHについても種々のデータがあり、通常の状態ではpH 7~8程度と考えてよい。*Micrococcus* sp. No. 31-2の α -ガラクトシダーゼは細胞質に存在し作用最適pHを7.5に持つ⁽⁹⁾。一方、好アルカリ性*Bacillus*より抽出したリボソームやtRNAなどで構成した無細胞タンパク質合成系において、アミノ酸のとり込みの最適pHは8.2~8.5にあり、比較対象とした*B. subtilis*のそれより0.5高いだけであり、大きな差は認められない⁽¹⁰⁾。その他、いくつかの菌体内酵素⁽¹¹⁾およびタンパク質合成系のpHに対する挙動からみても、菌体内pHが中性付近に保たれていることを示している。したがって、好アルカリ性という性質は環境と菌体との境界をなす細胞表層にあることを示唆している。

培地の pH、膜輸送系と生育

好アルカリ性*Bacillus* No. 8-1の生育に必要なグルコース、酢酸、アミノ酸などの栄養物の菌体内へのとり込みはすべてpH 9~10で最大となり、本菌株の生育および生産物の1つであるアルカリプロテアーゼ生産の最適pH 9~10とよく一致している⁽¹²⁾。またグルタミン酸の量によって生育が大きく支配される変異株*Bacillus* sp. No. 2~6を*Bacillus* sp. No. 8-1よりUV（紫外線）

図1 Na^+/H^+ 逆輸送系と $\text{Na}^+/\text{substrate}$ symporters が Na^+ に関して共通のサブユニットを持つと仮定した Krulwich らのモデル

照射によって作り、同様な実験を行なったところ、pH 7 と 9 における生育速度の差は菌体内にとり込まれるグルタミン酸の量に支配されていることがわかった⁽¹³⁾。さらにこの輸送系を研究するためには、アミノ酸の代謝の影響を除いてやる必要がある。一般的には非代謝性のアミノ酸 α -アミノイソ酪酸 (AIB) を用いるのが普通である^(14,15)。好アルカリ性 *Bacillus* の細胞内への AIB のとり込み量は培地の pH が 7 から 9 に上昇するにつれ約 2 倍になる。その際に Na^+ が存在するとさらにとり込み量は大幅に増大する。NaCl 0.2 M で最大値を与え、NaCl のない場合の 20 倍にもなる。また、 K^+ 、 Li^+ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Rb^+ などにはまったくその作用がなかった。またこれらの対陰イオンも直接関係がない。このように好アルカリ性 *Bacillus* が Na^+ と高い pH を要求することは、本実験に用いた菌株以外にも、他の国の研究者によって発見された好アルカリ性細菌においても認められている^(16,17)。

また、膜小胞を用いた実験でも、セリンや AIB のとり込みが Na^+ の濃度勾配と膜電位によって促進されることを示している⁽¹⁸⁾。 Na^+ が輸送系の担体と基質との親和力を高める働きをすることは、生細胞や膜小胞での能動輸送においてよくみられる現象である。この担体は基質の細胞内からの受動的排出にも必要である。好アルカリ性菌の 1 つ *B. alcalophilus* の細胞内からの AIB の排出に Na^+ が必要であることは、AIB と Na^+ との共輸送を示しているものである。一方、 Na^+/H^+ 逆輸送系をもたない変異株 *B. alcalophilus* KM や *B. firmus* RAB では、AIB の輸送は H^+ との共輸送で行なわれ

る。以上のことから、Krulwich らは Na^+/H^+ 逆輸送系と AIB などの輸送系は、 Na^+ の移動に関して共通のサブユニットを持つとしてモデルを提出している (図 1)⁽¹⁹⁾。

この他に興味のある現象として、 Na^+ とべん毛の運動の関係がある。*B. alcalophilus* や *B. firmus* RAB, *Bacillus* sp. No. 8-1 などはべん毛を持っていて活発に運動する。この際のエネルギーは中性菌の場合と同様の proton motive force であろうか。これらの微生物については、pH 9~10.5 で運動が活発であり、pH 7 ではそれがほとんどないこと、 Na^+ が必要なこと、膜電位をイオノフォアで消去してしまうと Na^+ があっても運動性がないことがわかった。これらの結果から、好アルカリ性細菌のべん毛回転運動のためには、膜電位と Na^+ の存在 (sodium motive force) が必要であると考えられる⁽²⁰⁾。Hirota らは好アルカリ性細菌を用いて定量的に細菌の運動と sodium motive force の関係を調べている^(21,22)。これらの点について興味のある読者は秋葉ら⁽²³⁾、北田⁽²⁰⁾の総説を参照されたい。

好アルカリ性微生物の生産する酵素

1) *Bacillus* 属好アルカリ性菌とその酵素

好アルカリ性微生物と酵素生産に関する研究の第一報は、1971 年の *Bacillus* sp. No. 221 のプロテアーゼに関するものであった⁽²⁴⁾。No. 221 菌は 1% Na_2CO_3 を含む pH 10 のアルカリ性培地を用いて土壌より分離された細菌で、好気性有孢子桿菌であることから *Bacillus* 属細菌と判断された。しかし本菌は pH 11 付近でも生育できるのに対して、pH 7 になると生育が非常に悪くなる。このことから筆者は、このような生育特性をもつ微生物を“好アルカリ性 (alkalophilic)”微生物と呼ぶことにした。生産されたプロテアーゼは最適作用 pH を 11.5~12 に持ち、pH 13 でも十分な活性を持つ、従来のものとは異なったアルカリプロテアーゼであることがわかった。酵素の結晶標品を用いて、活性中心のアミノ酸配列、物理学的性質などの研究も行なわれた⁽²⁵⁾。この他に酢酸を資化してアルカリプロテアーゼを生産する No. 8-1 菌 (前述の物質輸送系の研究に用いられている) など多数の菌が見いだされた^(13,26)。

アルカリアミラーゼは好アルカリ性菌を用いることによって初めて発見されたものである⁽²⁷⁾。*Bacillus* sp.

図 2 アルカリ性発酵によって生産されたアミラーゼの pH-活性曲線

No. A-40-2 は 1% Na_2CO_3 を含む pH 10 のアルカリ性培地 (Ⅱ-培地) で最適作用 pH を 10.0~10.5 に持つ糖化型 α -アミラーゼを生産した。これ他に多数の好アルカリ性のアミラーゼ生産菌が分離された。これらの微生物は多くの場合、いくつか (2~4 種くらい) のア

表 2 各種 CGT の性質

	最適 pH	安定 pH	熱安定性 (Ca^{2+}) (+)(-)	収 率 (%)
<i>B. macerans</i>	0.5~5.7	8.0~10.0	50 —	~50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.2	—	— —	—
<i>B. stearothermophilus</i>	5.0~5.5	5.5~8.8	70 65	50
<i>B. megaterium</i>	5.0~5.7	7.0~10.0	— 55	62
<i>B. circulans</i>	5.2~6.1	7.5~9.0	— 50	—
<i>B. No.38-2</i>	4.5~9.0	6.0~10.0	70 60	75~80

ミラーゼを同時に作る。その比率はあまり培養条件によって変わらないため、粗酵素液の pH-活性曲線から 4 種のタイプに分類した (図 2)⁽²⁸⁾。生産物について検討した結果、グループ 1 を除いてほとんどすべてのアルカリアミラーゼが澱粉からサイクロデキストリンを作っていることがわかった。特にグループ 3 に属する好アルカリ性 *Bacillus* sp. No. 38-2 菌は多量にサイクロデキストリン生産酵素 (cyclomalto-dextrin glucanohydase, CGTase) を作り出すことがわかった^(29~33)。この菌をⅡ-培地中で 37℃ で 3 日間好氣的に培養し、除菌、アセトン処理などを経て酵素粉末を作る。CGTase によるサイクロデキストリン生産のための pH-活性曲線は、3 種の酵素を含むためブロードである。また本酵素は、収率が従来のもものと比較してきわめて高いのみならず、 Ca^{2+} 存在下で約 70℃ までその活性を十分に保持した。比較のためいくつかの他の酵素の性質を示す (表 2)。

表 3 *Bacillus* 属の好アルカリ性菌株と生成酵素の性質

菌 株	最適 生育 pH	生育 pH 範 囲	酵 素	最 適 作用 pH	分子量 ($\times 10^4$)	等電点 (pH)
No.221 [ATCC 21522]	10	~11	プロテアーゼ	11.5	3.0	>9.4
			β -1,3-グルカナーゼ	8.5	3.6	4.1
No.8-1	9	8~11	プロテアーゼ	11.0		
No. A-40-2 [ATCC 21592]	10	8~11	アミラーゼ	10.5	7.0	
No. P-4-N	10	7~11	ペクチナーゼ	10.0	6~7	
No. K-12-5	10	7~11	β -1,3-グルカナーゼ	5.5~8.0	4.0	3.5
No. C-59-2	10	7.5~11	キシラナーゼ	6.0~8.0		6.3
No. Ku-1	10	7~11	カタラーゼ	10.0		
No.201-1	10		ブルナーゼ	8.5~9.0	9.2	2.5
No.38-2 [ATCC 21783]	10	7.5~11	サイクロデキストリングリコシル トランスフェラーゼ	4.5~9.0	8.8	5.4
No.7-5	9	6~11	α -ガラクトシダーゼ	6.5	31.2	
No.170	9	6~11	β -ラクタマーゼ	6.0~7.0	3.2~3.5	>5.6
No. C-11	11	8~11	ヘミセルラーゼ	7.0		
NRR L B-3881	9.5		アミラーゼ	9.2		
R K 9	9.7	7.5~	ポリガラクトチュロン酸リアーゼ	10.0		

さらに筆者らは本酵素を用いて世界で初めて本格的なサイクロデキストリン生産に成功した。その後世界中でサイクロデキストリンの工業的生産、その利用についての研究が始まり、数多くの用途が見いだされてきている。詳細は誌面の都合で省略するが、従来の *B. macerans* の酵素と違って無溶媒で多量にサイクロデキストリンを作る酵素の発見が一つの新しい工業の誕生へとつながっていった。好アルカリ性微生物の有用性を示した例ということができる。

このように、1% NaHCO_3 または 1% Na_2CO_3 を含むアルカリ性培地と好アルカリ性微生物との組み合わせであるアルカリ性発酵法により、これまでにない新しい性質や特徴を持つ酵素が生産されることがわかった。また前述のように、自然界、特に土壤中に好アルカリ性微生物が広く分布していることもわかったため、その後も同様の手法を用いて微生物の分離と、酵素生産の研究を行なった。研究の対象は、ペクチナーゼ⁽³³⁾、 β_1 -グルカナーゼ^(34,35)、キシラナーゼ⁽³⁶⁾、カタラーゼ⁽³⁷⁾、プルナーゼ⁽³⁸⁾、 α -ガラクトシダーゼ^(39,40)、 β -ラクタマーゼ^(41~43)、セルラーゼ⁽⁴⁴⁾、ヘミセルラーゼ⁽⁴⁵⁾などに及んだ。これらの酵素は最適作用 pH や安定 pH をアルカリ側に持つ、あるいは広い作用 pH を持つなどの特徴を備えている。特にこれまで微生物菌体内にしか生産されなかったカタラーゼをはじめとしていくつかの酵素が、アルカリ性発酵法によって多量に菌体外で作られることが明らかになった。この現象が後に述べる大腸菌からの遺伝子生産物の菌体外生産へとつながってゆく。分離菌と酵素およびそれらのいくつかの性質を表 3 にまとめて示す。

2) 菌体内酵素とその生産菌

Bacillus 属細菌による酵素の生産に関する研究と並行して菌体内酵素についても研究した。 α -ガラクトシダーゼ生産菌として *Micrococcus* 属細菌、脱水素酵素を生産

菌として *Corynebacterium* 属細菌など、*Bacillus* 属以外の好アルカリ性細菌が分離された。 α -ガラクトシダーゼの生産菌 No. 31-2^(39,40)はグラム陽性、孢子非形成、非運動性、DNA の GC 含量 72%、好気性の球菌であることから、*Micrococcus* 属と同定された。pH 7~11 の広い範囲で生育できるが、pH 9~10 において最大の生育、および酵素生成を示す。これらの酵素の性質については表 4 にまとめておく。

3) 筆者ら以外の研究

筆者がこの研究を始めて以来、国内外からも好アルカリ性微生物を利用した酵素生産について研究が発表されている。土壌から分離された *Bacillus* HRRLB-3831 によるアミラーゼの生産⁽⁴⁶⁾、デンマークの Novo 社からのアルカリプロテアーゼの生産⁽⁴⁷⁾、*Bacillus* sp. RK 9 によるポリガラクトチュロン酸リアーゼ⁽⁴⁸⁾、また *Bacillus* sp. によるエラスターゼなどがあるが⁽⁴⁹⁾、最近になってリグニンを分解する好アルカリ性細菌まで見いだされている。また *Streptomyces* に属する好アルカリ性の一菌株⁽⁵⁰⁾は、1% Na_2CO_3 を含む pH 10.5 のアルカリ性培地でアルカリプロテアーゼを生産した。酵素の最適作用 pH は 12.3、安定 pH は 5~11.0 にある。この酵素は前述の *Bacillus* sp. No. 221 のアルカリプロテアーゼと同じく pH 13 または 0.2 N NaOH 溶液中でも活性を失わない。土壌から見いだされたアルカリリパーゼ生産菌 26.1 B は *Pseudomonas nitroreductus* nov. var. thermotoleran と同定された⁽⁵¹⁾。本菌は pH 5.5~9.0 の間で生育できるが、酵素生産は pH 8.2~8.7 の時に最大となる。酵素の最適作用 pH は 9.5、安定 pH 5~11.0 であった。

好アルカリ性微生物の間接的利用法

好アルカリ性微生物は前述したようにきわめて興味ある性質を持っている。このことは換言すると、ユニーク

表 4 菌体内酵素とその生産菌の性質

酵 素	最適作用 pH	安定 pH	分子量 ($\times 10^4$)	特 徴	生 産 菌	最適生育 pH
α -ガラクトシダーゼ	7.5	7.5~8.0	36.7	Inducible	<i>Micrococcus</i> sp. No.31-2	10
β -ガラクトシダーゼ	6.5	5.5~9.0	18.5	Inducible	<i>Bacillus</i> sp. No.C-125	10
マルトース脱水素酵素	10.2	6.0~10.0	4.0	NAD-依存性	<i>Corynebacterium</i> sp. No.93-1	10
	10.2	6.0~8.0	>4.5	NADP-依存性	〃	
グルコース脱水素酵素	9.8	6.0~8.0	>5.1	NAD-依存性	〃	

な遺伝子、たとえば酵素生産や、細胞表層形成に関係した遺伝子を持っているということである。しかし 1980 年、筆者らが遺伝子組換え実験を始めるまでは、遺伝学的研究はほとんど行なわれておらず、わずかにアルカリプロテアーゼの生産量を増大させるために UV 処理や NTG (強力な変異誘起剤であるニトロソグアニジン) 処理が行なわれただけであった。したがって、好アルカリ性菌を DNA の供給源として用いることはいろいろな点で学問的、応用的興味をそそる。すなわち、

① 遺伝子組換えによって、中性菌によるアルカリ酵素の生産が可能になる。特に好アルカリ性菌自身によって作らせた場合、少量しかできないマイナー成分を多量に作らせることができる。

② 従来の菌と違った生体膜の成分のクローニングが可能になる。

③ 従来の微生物では菌体内酵素とされていた酵素が、菌体外で作られている場合がある。このことは物質の分泌の研究の一つのモデルとなる。

いずれにしても、好アルカリ性細菌の DNA を中性菌 (大腸菌、枯草菌など) に導入してやると、宿主の菌の性質が変わる可能性があると思われる。この考えが後述の大腸菌へ分泌能力を与える研究へとつながった。

好アルカリ性細菌の生産する菌体外酵素遺伝子のクローニング

1) ペニシリナーゼ遺伝子

好アルカリ性 *Bacillus* sp. No. 170 は 3 種のペニシリナーゼ I, II, III を菌体外に生産する。分子量は I, II が 2.6 万, III が 2.4 万であり, pH 安定性は III がもっとも高く, pH 10 でも安定であった。また III が Zn^{2+} で活性化されることからみて、クラス B と呼ばれる種類に属するペニシリナーゼであることがわかった。しかし III は生産量がきわめて少なく全体の 1/10 くらいしか作られていない。そのためタンパク質的性質を研究するために本酵素のクローニングを試みた。その結果、大腸菌中にク

ローニングすることに成功したのみならず、分離した DNA 中に pMB9 中の *kil* 遺伝子を活性化させるプロモーターを含んでいたため、生産されたペニシリナーゼが菌体外に分泌されるという“おまけ”までついた⁽⁵²⁾。このことについては後に述べる。

好アルカリ性 *Bacillus* sp. No. 170 の DNA を抽出し、制限酵素 *Hind* III で切断した後にプラスミドベクター pMB9 の *Hind* III サイトに入れる通常のショットガン法を用いた。*E. coli* HB 101 に導入した後、ペニシリン耐性株中よりプラスミド pEAP2 を分離した。

Bacillus sp. No. 170 由来の *Hind* III 断片中の *Dra* I 断片にペニシリナーゼ遺伝子がコードされていることがわかったので、その塩基配列を Sanger の M13 法で決定した。その結果を図 3 に示す⁽⁵³⁾。大変興味のあることに、Lampen らが同じ頃にクローニングした中性の *B. cereus* のクラス B 酵素とほとんど同じ配列である。この点については目下検討中である。

2) セルラーゼ遺伝子のクローニング

セルラーゼは通常複数の、しかも分離精製しにくい酵

図 3 ペニシリナーゼの塩基配列

素から成り立っている。好アルカリ性 *Bacillus* 属の生産するセルラーゼも同様で、*B. pasteurii* に属する N-4 菌のものは少なくとも 4 つ以上の酵素群から成る⁽⁴⁴⁾。そこで筆者らはセルラーゼ遺伝子を大腸菌にクローニングし、それら酵素についての性質を調べることを試みた。

N-4 菌から DNA を取り、pBR 322 を用いて大腸菌 *E. coli* HB 101 中にクローニングした。その結果、セルラーゼ遺伝子を含むプラスミド pNK 1 と pNK 2 が得られた⁽⁵⁴⁾。そしてそのおのおのは 488, 409 個のアミノ酸を含むタンパク質をコードしていることがわかった。さらに両者ともに似た塩基配列を持っているのみならず、pNK 1 の C 末端に約 60 個のアミノ酸からなる同方向の繰り返し配列がある。このことは分子進化といった面からみても大変に興味のあることである⁽⁵⁵⁾。さらに最近になって、好アルカリ性 *Bacillus* sp. No. 1139 のセルラーゼもクローン化され、その全塩基配列も決定された⁽⁵⁶⁾。

これら 3 種のセルラーゼのアミノ酸配列を調べてみると、4～8 個のアミノ酸の配列が一致している部分がある。一方、中性菌のセルラーゼ、たとえば *Clostridium* の耐熱性酵素⁽⁵⁷⁾と比較すると相同性 (homology) はまったく認められない。目下のところ、活性発現とアミノ酸配列との関連について研究を行なっている。なお、これら 3 種のセルラーゼはいずれも大腸菌の内膜と外膜の間にあるペリプラズムや細胞質に分布しており、菌体外へは分泌されない。

3) キシラーナーゼのクローニング

好アルカリ性 *Bacillus* sp. C-125 菌は、最適作用 pH を 6 付近に持つメジャーな酵素キシラーナーゼ N と pH 6～11 の広い範囲で活性を持つマイナーな酵素キシラーナーゼ A とを作る⁽⁵⁸⁾。このキシラーナーゼ A は従来から筆者らが行なっているアルカリ酵素の研究の面からみて大変に興味があるが、培養条件を変えてもその生産量は増えなかった。この遺伝子をクローン化し大腸菌に導入したところ、大量に作られるのみならず、またもや大腸菌の菌体外に分泌されるという幸運にめぐまれた。このキシラーナーゼ遺伝子を含むプラスミド pCX 311 の制限酵素地図を図 4 に示す⁽⁵⁹⁾。キシラーナーゼ遺伝子は塩基配列の分析結果から 2.6 kbp の *Hind* III 断片にあるが、それとは別に活性発現、分泌のためには 2.0 kbp の *Hind*

図 4 菌体外キシラーナーゼ遺伝子を持つプラスミド pCX 311

III 断片が不可欠である。目下、2.0 kbp 断片の作用についてはまったく不明である。

この他に好アルカリ性の *Aeromonas* sp. 菌の生産するキシラーナーゼも pBR 322 を用いて大腸菌中にクローニングされた。本酵素は分子量 135,000 ときわめて大きく、最適作用 pH は 8 である。また、大腸菌ではまったく細胞外へ分泌されないが、後述の分泌ベクターによって充分菌体外に生産されることもわかった。

大腸菌からタンパク質を菌体外に分泌させるベクター

大腸菌の内膜をタンパク質が通過し、ペリプラズムにたまるためには、そのアミノ末端に 20～40 個くらいのアミノ酸から成る分泌シグナルペプチドの必要な場合が多い。このシグナルペプチドは内膜通過の時シグナルペプチダーゼによって切断され、タンパク質は外膜を通過することはできない。そこでペリプラズムにたまったタンパク質を外に出させるためにはいくつかの方法が考えられる。

- ① 外膜が leaky になった変異株を用いる方法：通常この変異株は物理的に弱いので工業的に用いることは困難である。
- ② 外膜に含まれているタンパク質と結合させて外へ出す方法：水島らによって開発された方法であり、外膜の *omp F* タンパクとオピオイドペプチドであるエンド

図 5 分泌ベクターの作り方

ルフィンとを結合させ菌体外に作ることに成功している⁽²⁰⁾。しかし、結合させるタンパク質分子の大きさなどに制約があるようで、今後の発展が期待される。

③ バクテリオシンの能力を利用する方法：コリシン、クロアシンなどのバクテリオシンはマイトマイシン C によって誘導され、その際に溶菌を伴ったバクテリオシンの放出がみられる。

③について、コリシン E1 の場合は Col E1 プラスミドの *kil* 遺伝子が、クロアシン の場合は Clo DF13 プラスミドの *H* 遺伝子が、バクテリオシンの分泌に関係があることが最近になって明らかになってきた。そこでマイトマイシンを用いずに適当なプロモーターを用いることによって、溶菌することなく菌体外分泌を可能にすることが理論上可能である。前述のペニシリナーゼが菌体外に多量に分泌されることに注目し、挿入断片の 2 kbp *Hind* III 断片の核酸塩基配列、および用いた pMB9 ベクターについて数多くの実験を行なった結果、pMB9 (Col E1 のコリシン E1 構造遺伝子、およびプロモーターを持っていないプラスミドベクター) の *kil* 遺伝子が 2 kbp 中のプロモーター (Ex-プロモーター) によって活性化されていることがわかった⁽⁶¹⁾。

そこで筆者らは、この Ex-プロモーターを pMB9 の休眠状態にある *kil* 遺伝子の upstream に挿入し、さらにその upstream の適当なサイトに目的とするタンパク質 (シグナル

表 5 大腸菌より分泌された例

タンパク質	ベクター	分泌比率 (%)
ペニシリナーゼ		
<i>Bacillus</i> sp. No.170	pMB9+Ex-プロモーター	90
	pMB9	5~10
セルラーゼ		
<i>Bacillus pasteurii</i>	pMB9+Ex-プロモーター	70
	pMB9	10
<i>Bacillus</i> sp. 1139	pMB9+Ex-プロモーター	93
	pMB9	6
	pBR 322	5
キシリナーゼ		
<i>Aeromonas</i> sp. 212	pMB9+Ex-プロモーター	62
	pMB9	8
	pBR 322	5

ペプチドを持った) の構造遺伝子とそのタンパク質発現のためのプロモーターをつないだ (図 5)。表 5 に示すように Ex-プロモーターがない場合はまったく外部に分泌されないのに対して、Ex-プロモーターを入れると 70~90% もの酵素タンパクが分泌される⁽⁶²⁾。この方法では 135,000 もの大きな分子量のキシリナーゼも分泌可能であることを示している。なお、ペリプラズムに存在する他のタンパク質も一緒になって分泌されているようである。*kil* 遺伝子のために外膜の透過性が増大する理由はあまりはっきりとはしないが、Col E₂ の lysis-gene (溶菌遺伝子) がホスホリパーゼ (リン脂質分解酵素) A を活性化するといわれているので、この場合も同じようなことが起こり、細胞膜に何らかの変化を起こしているのかもしれない。

しかし、この分泌ベクターの導入によって、従来あまり工業的には用いられなかった大腸菌から工業的に菌体外にタンパク質を作ることができることの可能性が示されたといっても過言ではないと思う。単なるプロモーターの挿入といっても、15 年間にわたる好アルカリ性微生物の研究がなかったら、このプロモーターは分離できなかったらと思うと、筆者はこの大腸菌からの分泌ベクターも新しい「好アルカリ性微生物の世界」からの一つのプレゼントと考えたい。

*

好アルカリ性細菌の発見から、その利用、分泌ベクターの作り方など、あまりに多岐にわたっているため、好アルカリ性微生物の特徴を読者に充分説明できない。そこで興味のある方は 1982 年までの部分は文献 5) を、それ以外の箇所はいくつかの総説 (文献 20) など) をも

参照されたい。大変に幸運と偶然に満ちたようなストーリーになってしまったが、最後にペニシリンを発見したFlemingの言葉を引用して終りとする。

——偶然はそれを待ちうけている人へのみ来る——

文 献

- 1) A. Vedder : *Ant. van Leeuwenhoek*, 1, 141 (1934).
- 2) D. J. Kushner & T. A. Lisson : *J. Gen. Microbiol.*, 21, 96 (1959).
- 3) M. E. Chislett & D. J. Kushner : *J. Gen. Microbiol.*, 24, 187 (1961).
- 4) 高橋義昌, 田辺 脩 : 醸酵研報告, 21, 145 (1962).
- 5) K. Horikoshi & T. Akiba : "Alkalophilic Microorganisms", Japan Scientific Societies Press, Springer-Verlag, N. Y. (1982).
- 6) 掘越弘毅 : 科学, 44, 558 (1974).
- 7) K. Horikoshi & S. Iida : *Nature*, 181, 917 (1958).
- 8) W. J. Waddell & R. G. Bates : *Physiol. Rev.*, 49, 285 (1969).
- 9) Y. Ikura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1359 (1979).
- 10) Y. Ikura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 753 (1978).
- 11) K. Ohta, A. Kiyomiya, N. Koyama & Y. Nosoh : *J. Gen. Microbiol.*, 86, 259 (1975).
- 12) M. Kitada & K. Horikoshi : *J. Ferment. Technol.*, 54, 579 (1976).
- 13) M. Kitada & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2273 (1979).
- 14) P. T. S. Wong, J. Thompson & R. A. MacLeod : *J. Biol. Chem.*, 244, 1016 (1969).
- 15) K. Ring, H. Ehle & B. Foit : *Biochim. Biophys. Acta*, 433, 615 (1976).
- 16) N. Koyama, A. Kiyomiya & Y. Nosoh : *FEBS Lett.*, 72, 77 (1976).
- 17) A. A. Guffanti, P. Susman, R. Blanco & T. A. Krulwich : *J. Biol. Chem.*, 253, 708 (1978).
- 18) M. Kitada & K. Horikoshi : *J. Biochem.*, 87, 1279 (1980); *ibid.*, 88, 1759 (1980).
- 19) A. A. Guffanti, D. E. Cohn, H. R. Kaback & T. A. Krulwich : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1481 (1981).
- 20) 北田牧夫 : 発酵と工業, 42, 12 (1984).
- 21) N. Hirota, M. Kitada & Y. Imae : *FEBS Lett.*, 132, 278 (1981).
- 22) N. Hirota & Y. Imae : *J. Biol. Chem.*, 258, 10577 (1983).
- 23) 秋葉暁彦, 北田牧夫, 掘越弘毅 : 発酵と工業, 39, 118 (1981).
- 24) K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1407 (1971).
- 25) K. Watanabe & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 715 (1977).
- 26) M. Kitada & K. Horikoshi : *J. Ferment. Technol.*, 54, 383 (1976).
- 27) K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1783 (1971).
- 28) M. Yamamoto, Y. Tanaka & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1819 (1972).
- 29) N. Nakamura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 953 (1976).
- 30) N. Nakamura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 953 (1976).
- 31) N. Nakamura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1647 (1976).
- 32) N. Nakamura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1785 (1976).
- 33) K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 285 (1972).
- 34) K. Horikoshi & Y. Atsukawa : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1449 (1973).
- 35) K. Horikoshi & Y. Atsukawa : *Biochim. Biophys. Acta*, 384, 477 (1975).
- 36) K. Horikoshi & Y. Atsukawa : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2097 (1973).
- 37) Y. Kurono & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2565 (1973).
- 38) N. Nakamura, K. Watanabe & K. Horikoshi : *Biochim. Biophys. Acta*, 397, 188 (1975).
- 39) T. Akiba & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1845 (1976).
- 40) T. Akiba & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1851 (1976).
- 41) T. Sunaga, T. Akiba & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1363 (1976).
- 42) T. Sunaga, T. Akiba & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 477 (1979).
- 43) T. Akiba & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2741 (1980).
- 44) K. Horikoshi, M. Nakao, K. Kurono & N. Sashihara : *Can. J. Microbiol.*, 30, 774 (1984).
- 45) Y. Ikura & K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1373 (1977).
- 46) E. W. Boyer & M. B. Ingle : *J. Bacteriol.*, 110, 992 (1972).
- 47) K. Aunstrup, H. Otlrup, O. Andresen & C. Dambmann : 第4回国際発酵学会議, 京都, 1972.
- 48) C. T. Kelly & W. M. Fogarty : *Can. J. Microbiol.*, 24, 1164 (1978).
- 49) Y. Tsai, M. Yamasaki, Y. Y-Suzuki & G. Tamura : *Biochemistry Int'l.*, 7, 577 (1983).
- 50) T. Nakanishi, Y. Matsumura, N. Minamiura & T. Yamamoto : *Agric. Biol. Chem.*, 38, 37 (1974).
- 51) N. Watanabe, Y. Ota, Y. Minoda & K. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1353 (1977).
- 52) T. Kudo, C. Kato & K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, 156, 949 (1983).
- 53) C. Kato, T. Kudo, K. Watanabe & K. Horikoshi : *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3317 (1985).
- 54) N. Sashihara, T. Kudo & K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, 158, 503 (1984).
- 55) F. Fukumori, N. Sashihara, T. Kudo & K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, in press.
- 56) F. Fukumori, T. Kudo, Y. Narahashi & K. Horikoshi : *J. Gen. Microbiol.*, in press.
- 57) P. Beguin, P. Cornet & J.-P. Aubert : *J. Bacteriol.*, 162, 102 (1985).
- 58) H. Honda, T. Kudo, Y. Ikura & K. Horikoshi : *Can. J. Microbiol.*, 31, 538 (1985).
- 59) H. Honda, T. Kudo & K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, 161, 784 (1985).
- 60) K. Nagahari, S. Kanaya, K. Munakata, Y. Aoyagi & J. Mizushima : *EMBO J.*, 4, 3589 (1985).
- 61) T. Kobayashi, C. Kato, T. Kudo & K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, in press.
- 62) C. Kato, T. Kobayashi, T. Kudo & K. Horikoshi : *FEMS Lett.*, in press.