蛋白質高生産菌の発見と応用に関する研究[†]

(昭和62年度日本農芸化学会賞受賞)

鵜 高 重 三

(名古屋大学農学部)

蛋白質は生体内で数えきれないほど多くの反応を触媒する酵素として、細胞膜や細胞骨核の微小管のような構造を形成する成分として、あるいはまた種々の調節物質として生命活動を具現する中心的役割をになっている高分子物質であることはいうまでもない。ひる返って、生体の利用技術であるバイオテクノロジーの面から見た蛋白質は、組換え DNA 技術で生産されるインシュリンや生長ホルモンにしても、バイオリクターに使用される固定化酵素にしても、あるいはまた食糧資源としての蛋白質にしる、それぞれ非常に魅力ある生体物質である。

生物が多様性を示す原因になっている蛋白質はまさにほとんど無限の構造と機能を持っていると考えられる。したがって蛋白質の研究はその構造や活性に関する基礎的なものから種々の利用技術まで真に膨大なものがある。このように有用な蛋白質を微生物を利用して効率よく生産しようとする研究は古くから行われているが、農芸化学の伝統を基盤として近年の分子生物学などの成果を活用しながら新しい観点より蛋白質の分泌生産を試みたのが以下に述べるわれわれの研究である。

I. 蛋白質高生産菌の検索

菌体外に酵素を生産する微生物は以前から知られていたが⁽¹⁾、その生産量はたかだか 1 g/l といわれていたので、1971 年それよりはるかに大量の蛋白質を生産する細菌の検索を試みた。全く未知の菌を検索する場合、いかに迅速に、確実に、効率よく目標とする菌を選び出す

ことができるかが問題である。そこで図 1 に示すように、種々の菌の集落を生じた寒天平板に過塩素酸のような蛋白質変性剤溶液を加えることによって集落周辺に変性蛋白質の白濁を生ずるかどうかを調べた。白濁を与える菌について液体振盪培養を行い、菌体を除いた培養液中の蛋白質含量を定量した。平板上で酸により白濁を生ずる菌が液体培養で必ずしも蛋白質を生産するとは限らなかったが、白濁を生じない菌については液体培養で蛋白質を生産する菌は見出せなかった。平板を用いれば多数の菌を異なる条件下（たとえば異なる培地組成や培養温度）で調べられる。したがってこのような寒天平板上の蛋白質生産性の有無のテストは簡便で高効率な一次検索法といえよう。

土壌などより分離した細菌、約 1200 株について組成の異なる 2 種類の平板で検索を行った結果、酸による白濁を生じた菌が約 170 株 (14%) であり、そのうち液体培養で 0.2~1 g/l 程度の菌体外蛋白質を生産したのが 75 株であった。さらに、3~5 g/l というとくに高い生産性を示す 5 菌株を発見した⁽²⁾。これら蛋白質高生産菌の 4 株は *Bacillus brevis* と同定され、1 株は *B. brevis* に近縁ではあるが新種と考えられたので、*B. proteiformans* と命名した。

最近約 2000 の種々の試料から分離した約 10 万株について上記と同様の方法でテストした結果、おおよそ 3000 菌株は集落周辺にかなり強い白濁を与え、そのうち 80 菌株は液体培養で 1.2 g/l 以上の菌体外蛋白質生産を示すことを見出した⁽³⁾。それらのうち、生産に適すと考えられる培地 5 種類を用い蛋白質の生産性をテストしたところ、5 g/l 以上の大量生産を示す菌が 37 株得られた。それらの菌株で 20 株は *B. brevis* と同定され、残りの 17 株も菌学的には *B. brevis* とかなり異なる性質を示したが、*B. brevis* と類縁種であると推定された。

これらの結果から、*B. brevis* は蛋白質生産性に強弱は

[†] Discovery of Hyper Protein-Producing Bacteria and Their Utilization to the Production of Useful Proteins.

Shigezo UDAKA (Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464)

図 1 蛋白質高生産菌の検索法

あるものの、蛋白質生産能が本菌種の普遍的性質であると考えられた。*B. brevis* は土壌やミルクから分離されるがそのチャンスは非常に少ない一方、ある分離源に集中して見出される傾向が見られた。自然界のごく一部に局在していると考えられる。*B. brevis* が蓄積する菌体外蛋白質の種類やその生産条件は菌株によってかなり異なっていた。また、菌体外プロテアーゼ活性が低い菌株の多いことが *B. brevis* の特徴となっており、実際数株については蛋白質分解活性を全く検出できなかった。菌体外に蓄積した蛋白質の分解が少ないことは、これらの *B. brevis* が蛋白質の分泌生産に適していることを明らかに示している。

II. *Bacillus brevis* による蛋白質生産の培養条件

B. brevis の蛋白質生産に適した培養条件を明らかにすることは、本菌の蛋白質生産機構の解明や遺伝子操作を行ううえで必須であると考えた。種々の成分からなる培地で菌体外蛋白質生産量を調べた結果、酵母エキスや肉エキスのような栄養分は菌の増殖を著しく促進するが、蛋白質の蓄積には有効ではないこと、ポリペプトンの添加によって大量の蓄積が得られること等がわかった。ポリペプトンを含む栄養豊富な培地に L-イソロイシンやグリシンを適量加えることによって、2 日たらずの培養で 12 g/l の蛋白質蓄積が得られた(図 2)⁽⁴⁾。これまでに蛋白質高生産菌として見出され *B. brevis* に分類された菌は培養条件が適当であれば、5 g/l 以上の蛋白質生産を示したが、菌株によって蛋白質生産に適した培地組成がかなり異なることが判明した。ポリペプトン、グルコース、酵母エキスの量やマグネシウム、鉄などの無機塩の有無等が大きな影響を及ぼした。新たに分離した *B. brevis* の 1 菌株によって 20 g/l に達する菌体外蛋白質を得ているが、培養条件の最適化によって生産量が

図 2 蛋白質生産の発酵経過⁽⁴⁾

B. brevis 47 を栄養豊富な培地で好氣的に培養し、培養液の pH を 8 に制御した。●, 菌体外蛋白質, ○, 菌の生育 (乾燥菌体量 g/l); □, 生菌数; ▲, グルコース; △, アミノ酸; ×, pH; ■, 酢酸添加量 (pH 制御に使用)。

さらに増加する可能性がある。

糖と無機窒素源を主とする合成培地においては 1~2 g/l 程度の蛋白質生産量しか得られないが、対数増殖初期にバントラシンや D-サイクロセリン、ペニシリンのような細菌細胞壁ペプチドグリカンの合成阻害剤を適量添加することによって、5% グルコースを唯一の炭素源として約 9 g/l の蛋白質生産を得ることができた⁽⁵⁾。これは対糖収率約 60% に相当し、菌体内蛋白質と合せると約 80% の収率となり、組成の簡単な合成培地でも良好な収率で蛋白質生産が可能であることが示された。

III. 蛋白質生産機構

蛋白質生産機構の研究は *B. brevis* 47 について行った。本菌が菌体外に蓄積するのは主として蛋白質であり、核酸や脂質の蓄積はわずかしき認められなかった。菌体外蛋白質量は細胞内蛋白質量のおおよそ 2 倍であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析で分子量約 15 万と 13 万の 2 種類の蛋白質が菌体外蛋白質の 70~80% を占めることが明らかになった。細胞内には分子量 10 万以下の蛋白質が多く、菌体外蛋白質とは明らかに異なっているため、*B. brevis* による蛋白質の菌体外への排出、培養液中の蓄積は特定蛋白質の“分泌”によるものと推定した。

前節で述べたように、*B. brevis* 47 による蛋白質生産はバシトラシンのような細胞壁合成阻害剤によって顕著に促進され、逆に蛋白質生産促進作用を持つグリシンやポリペプトンに含まれるペプチドは細胞壁合成を阻害する結果である可能性が示唆された。したがって本菌による蛋白質生産の効率に細胞表層のペプチドグリカン層の構造が大きな影響を及ぼしているのではないかと考えた⁽⁶⁾。D-サイクロセリンによる生育阻害に抵抗性を示す菌から蛋白質非生産株が高率で得られたこともそのような考え方を支持している。また、蛋白質生産細胞と非生産細胞のペプチドグリカンの組成に差があるらしい（たとえば蛋白質非生産細胞のペプチドグリカンにはアラニン含量が生産細胞のものに比べて少ない）^(4,5)。細胞壁合成阻害剤が菌体外蛋白質の生産を促進することが他の細菌でも見出されている⁽⁶⁾。もし、ペプチドグリカン等の細胞壁構造が蛋白質の分泌効率に影響を及ぼしているとしたら、どのようなメカニズムによるのかは今後の大へん興味ある問題である。

これらの知見から、本菌の細胞表層構造の形態的解析により蛋白質の生産機構を明らかにする手がかりが得られるのではないかと考え、細胞の超薄切片について電顕観察を行った⁽⁷⁾。その結果、増殖細胞の表層に存在する3層の細胞壁のうち、最外層の2層が対数増殖後期になると細胞から離脱し始め、定常期にはほぼ完全に2層の構造体を失った細胞となることが見出された（図3）。蛋白質の生産は表層の変化が起こる時期に始まり、定常期に蛋白質の分泌が盛んに起こった。一方、蛋白質非生産変異株や高濃度のマグネシウム塩添加によって蛋白質生産が抑制された菌ではそのような表層変化が起こらなかった。さらに、対数増殖期の細胞を集め微アルカリ性緩衝液に懸濁することによって2層の表層物質が容易に細胞から離脱することがわかり、表層を構成する物質の分析を行うことができた。その結果、最外層の2層は2種類の蛋白質からなっており、それらはゲル電気泳動像によって本菌が培養液中に大量に蓄積する主要蛋白質と分子量が一致することがわかった。また、アミノ酸組成、ペプチドマッピング、免疫化学的反応等の解析から、表層蛋白質と主要菌体外蛋白質とが同じであることが明らかとなった⁽⁸⁾。ただし、分子量の異なる2つの蛋白質は免疫化学的に全く異なり、遺伝子も違うことが示唆され、後に実証された。

2層の蛋白質層の内側にある薄い層は、分離・精製し

図3 蛋白質生産菌の表層構造

種々の生育期における細胞の超薄切片像⁽⁷⁾。Aは対数増殖期の細胞で、左上の拡大図から明らかなように outer wall (OW), middle wall (MW), inner wall (IW) の3層構造により覆われているが、増殖が進むにつれて3層から1層構造に大きく変化し（B→C→D→E）、定常期後期にはIW 1層で覆われた細胞（E）になり、蛋白質を盛んに分泌する。CMは細胞質膜。また、蛋白質を盛んに分泌している時期に、Fのような多層構造が一部に観察されることがある。図中の棒の長さは200 nm。

た画分の分析からペプチドグリカン層であると結論した。この層に、尿素で可溶化してから精製した表層蛋白質を加えた後、尿素を除くと細胞壁構造体を再構成することができた⁽⁹⁾。生細胞の表層においても、再構成した細胞壁においても蛋白質は六角格子状の結晶構造体を形成しており、本菌の細胞表層の物理的、化学的強化に役立っているものと推定された。このような蛋白質層が細胞表層構造の一部となっている例は、グラム陽性、陰性を問わず、いくつかの菌種に存在することが知られている⁽¹⁰⁾。

以上述べてきた知見から、本菌では本来細胞壁蛋白質

として生合成され表層結晶構造体を形成する蛋白質が、増殖の定常期になると過剰合成の抑制機構から解除され高効率で生合成、分泌が継続して行われ、細胞表層にとどまることなく菌体外蛋白質として大量に培養液中に蓄積するという、*B. brevis* による蛋白質生産機構のモデルを提唱したい。

IV. *B. brevis* の遺伝子操作

組換え DNA 技術を用いることにより、異種遺伝子の発現も可能になったので、*B. brevis* の有する蛋白質生産能を活用し、種々の有用蛋白質を高効率で生産することを目標として研究を行った。新しい菌で遺伝子操作を行うには、宿主菌の形質転換法とその菌に安定に保持され、選択マーカーを持ったプラスミド・ベクターが必要である。その他の種々の問題を解決することによって、蛋白質高生産菌 *B. brevis* を用いる新しい宿主・ベクター系を開発することができた。

1. 形質転換法

グラム陽性菌の形質転換には、プロトプラスト化した後ポリエチレングリコール (PEG) 存在下で DNA を導入する方法が一般に用いられている。*B. brevis* についても同様の方法を試みたところ、プロトプラストから通常の桿状細胞への再生がきわめて悪く使用できなかった。他の既知の方法も試みたが成功しなかった。

前述した本菌の表層構造を考慮し、細胞を覆っている蛋白質層を除いてから DNA の細胞中への導入を試みた。細胞壁蛋白質を取り除く条件、すなわち細胞を pH 7.5 ~ 8.5 のトリス緩衝液中に懸濁し 37°C、1 時間保温した後、プラスミド DNA の添加、PEG 処理によって高率の形質転換に成功した。蛋白質層を除去した細胞から元の生菌への再生も容易に起こり、形質転換株は 1 日ないし 2 日間で得られた⁽¹¹⁾。形質転換率は 1 µg DNA 当たり 10⁴ 程度のことが多いが、改良を加えることによって 10⁵ ~ 10⁶ の転換株を得ることもできた。細胞を懸濁するトリス緩衝液中にマグネシウム塩を加えたり、緩衝液の pH を 7.0 にすると蛋白質が表層から離脱しないことがすでにわかっているが、それらの条件下では形質転換も起こらないことが明らかとなり、蛋白質層が DNA 導入を阻害していることが強く示唆された。この新しい形質転換法をトリス-PEG 法と命名した。

この方法は *B. brevis* 47 に関して検討したもので、他の *B. brevis* 株については必ずしも形質転換株が得られ

ていない。方法の一部を変更して成功した場合もあった⁽¹²⁾。

2. ベクター

枯草菌のベクターとして繁用されているブドウ状球菌由来のプラスミド、pHW 1 (pC 194 にエリスロマイシン耐性遺伝子を連結したもの) や pUB 110 が *B. brevis* でもベクターとして使用できることがわかった⁽¹³⁾。また、*B. brevis* に存在するプラスミドを検索した結果、481 株に 2.3 キロベースのプラスミドを見出し、それにエリスロマイシン耐性遺伝子を連結することによって pHY 481 を作製した⁽¹³⁾。pHY 481 は薬剤による選択圧なしに *B. brevis* 細胞に 50 世代以上の長期間にわたって安定に保持されることがわかった。このプラスミドをベクターとして用いれば薬剤を加えることなく大規模培養が可能であろう。

pHY 481 の細胞当りのコピー数は数個と少ないので、コピー数の増加を図った。pHY 481 を有する細胞の薬剤耐性度の増加等を選択の手段として、プラスミドのコピー数増加をもたらし宿主変異株⁽¹⁴⁾と温度変化によってコピー数が増える変異プラスミドを得ることに成功した。このようにして得られるコピー数の増加は数倍から 10 倍程度であり、宿主とプラスミドの両変異を組合せることによってコピー数はさらに増加した。

3. 宿主としての特性

形質転換法を確立し、ベクターを見出したので *B. brevis* の遺伝子操作が行えるようになった。そこで *B. brevis* が蛋白質の生産に本当に適した宿主であるかどうかを、異種細菌の分泌性蛋白質遺伝子を導入して検討した。

高温菌 *B. stearothermophilus* の α-アミラーゼ遺伝子をクローン化し、その遺伝子を pUB 110 に連結して得た pBAM 101 を *B. brevis* 47 に導入した。*B. brevis* 47 は全くアミラーゼを生産しないが、形質転換株は大量 (約 0.5 g/l) の好熱性アミラーゼを生産するようになり、同じプラスミドを有する枯草菌より 5 倍程度高い産生性を示した⁽¹⁵⁾。これは *B. stearothermophilus* に比較しても高い生産性であり、*B. brevis* が蛋白質の生産に適した宿主であると考えられた。*B. brevis* におけるアミラーゼの生産は、その遺伝子にもともと存在するプロモーターや翻訳、分泌に必要な領域が *B. brevis* 細胞で効率よく働くことを示した。一方、そのような高効率アミラーゼ生産を得るには、多量のアミラーゼ生成による

図4 *B. brevis* 47 の細胞表面蛋白質（主要菌体外蛋白質と同じ）遺伝子の構造、並びに発現の模式図
MWP, middle wall 蛋白質; OWP, outer wall 蛋白質; P, プロモーター領域; SD, リボソーム結合部位; IR, inverted repeat 部位。

生育阻害を受けない *B. brevis* の変異株を宿主とし、生産に適した培養条件の設定が必要であった。

また、最近新たに分離した *B. brevis* HPD 31 株に pBAM 101 を導入した場合、3 g/l のアミラーゼ生産が得られた⁽¹²⁾。これは適切な条件下における培養のゆえもあるが、HPD 31 株の宿主としての優秀性を示していると考えられる。

4. 発現・分泌ベクターの作製

遺伝子の効率よい発現には強力なプロモーターによる転写と適切な翻訳が行われなければならない。そこで大量に分泌生産される細胞壁蛋白質の遺伝子に存在する高効率発現調節部位を *B. brevis* における異種遺伝子の発現に活用することを試みた。

B. brevis 47 の細胞壁蛋白質遺伝子のクローン化はまず大腸菌の系を用いて、細胞壁蛋白質 (CWP) の抗体と反応する形質転換株を検索することによって行った。その結果、2 種類の CWP の一部をコードする DNA 断片を有するプラスミドを得ることができ⁽¹⁶⁾、その断片をもとに“gene walking”の手法で全 CWP 遺伝子の遺伝子地図を作製することに成功した(図4)。しかし、CWP 遺伝子の 5' 末端領域のクローン化は大腸菌のさまざまな系を用いても成功しなかったが、枯草菌を宿主として初めて可能となった⁽¹⁷⁾。枯草菌では異種 DNA が不安定なことが多いが、*B. brevis* の DNA は安定に保持される場合が多いことがその後も経験されている。CWP

遺伝子と隣接する領域を含む 7500 スクレオチドに及ぶ全配列を決定し各領域の機能を解析した結果、5' 側に存在する強力なプロモーターより転写が始まり、隣接する 2 つの構造遺伝子が単一のメッセンジャー RNA として転写され (すなわちオペロンを形成している)、リボソーム結合部位とシグナル配列などがそれぞれ効率のよい翻訳と分泌に作用していることを解明した^(18,19)。

このような CWP 遺伝子のプロモーター領域、翻訳開始部位、シグナル配列を含む DNA 断片をエリスロマイシン耐性遺伝子を持つ多コピープラスミド pHT 1 に導入し、*B. brevis* における発現分泌ベクター pNU 200 を構築した(図5)。ただし、異種蛋白質を効率よく分泌生産するのに、pNU 200 の場合のようにプロモーターからシグナル配列まで全部を利用することは必ずしも必要ではない。細菌由来の分泌性蛋白質の場合には翻訳開始部位やシグナル配列が *B. brevis* で十分働くと考えられ、CWP 遺伝子のプロモーターのみをその遺伝子の上流に連結すれば十分である。

CWP 遺伝子のプロモーター領域は転写開始部位の解析から 5 箇所つながって存在し、独特なスクレオチド配列を持っていることが明らかになった⁽¹⁷⁾。これらのプロモーターをそれぞれ単独に含む DNA 断片、あるいは複数のプロモーターを含む DNA 断片を調製した後、プロモーターを欠失させたアミラーゼ遺伝子上流に挿入してアミラーゼ生産量を調べた(図6)。このようにして

図 5 発現分泌ベクター pNU 200 の構造

塩基配列中の 1~5 は転写開始点を示す。SD 1 と SD 2 はリボソーム結合部位。SD 2 の下流の下線部分はシグナルペプチドと考えられる領域。ermC, エリスロマイシン耐性遺伝子。

図 6 *B. brevis* 47 細胞表面蛋白質遺伝子のプロモーター領域 DNA 断片のアミラーゼ生産に及ぼす影響

pTA 1~9 は図に示すそれぞれの DNA 断片を pHY 4833 にのっているプロモーター欠失 α -アミラーゼ遺伝子 (*B. licheniformis* 由来) の上流に挿入したプラスミド。これらのプラスミドを *B. brevis* 47 に導入し、培養後上澄液のアミラーゼ活性を測定した。P 1~P 5 は図 5 に示した転写開始点から推定されるプロモーター部位。

プロモーターの強弱を推定した結果、上流から一番目のプロモーター様のヌクレオチド配列は大腸菌や枯草菌で強い活性を示すプロモーターのコンセンサス配列とほぼ一致していたが *B. brevis* における活性は非常に弱かった。図5および図6からわかるように、コンセンサス配列と異なる独特の配列を持つ3番目のプロモーター等が強い活性を示した。なぜCWPの発現のために複数のプロモーターが存在するのか、それらのプロモーターが発現の調節、たとえば増殖時期によって異なる機能を持っているかどうか等、興味ある今後の課題である。

5. 異種蛋白質の生産

B. brevis を宿主として、前述のような発現・分泌ベクターを用いCWPのプロモーターを活用して細菌や高等動物の蛋白質の生産を試みた。異種細菌の遺伝子の場合には、予想どおりの強い発現とその蛋白質の大量分泌が得られた。*Bacillus* 属細菌の α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、サイクロデキストリン合成酵素、大腸菌の β -ラクタマーゼについて検討した結果、0.5 g/l ないしそれ以上の蓄積が認められた。前述の α -アミラーゼの例からも明らかのように、宿主である *B. brevis* の菌株を変えたり、培養条件の最適化を図ることによって、細菌の蛋白質に関しては数 g/l の生産量を得るのはあまり困難ではないと考えられる。

一方、高等動物の遺伝子の場合には、その蛋白質生産量のこれまでの最高が約 10 mg/l で、細菌蛋白質の 100 分の 1 程度である。量は少ないけれども *B. brevis* の系で分泌生産される動物蛋白質は正しい立体構造を持つ可溶性蛋白質であることが、酵素の比活性や生物活性の測定から示されている。また、生産された蛋白質の分解がほとんどないことも western blotting で判明した。ブタペプシノーゲンの例を図7に示す。

これまで、高等生物の遺伝子産物を細菌の宿主・ベクター系で生産させると細胞中に不溶性の封入体となるか⁽²⁰⁾、分解を受ける⁽²¹⁾例が多く、活性のある酵素蛋白質の生産を得る例は少ない。菌体外プロテアーゼを検出できない *B. brevis* を使用すれば、一度蓄積した蛋白質が分解を受けることはほとんどない。したがって動物蛋白質の生産量が非常に少ないのは、細胞内の生成効率が悪いか分泌過程に障害があると考えられるがいまだ原因は明らかではない。しかし、動物蛋白質の生産量が多いと思われる菌の生育が悪いことから、膜透過の障害がその蛋白質の生産を低くする原因ではないかと推定される。

図7 *B. brevis* で分泌生産されたペプシノーゲンの酸性下における自己触媒的活性化

SPc, ブタのペプシノーゲン; SS 100, pNU 200 (図5)の *B. brevis* 47 表層蛋白質遺伝子の 5' 側領域シグナル配列下流にペプシノーゲン cDNA を連結したもの。ペプシノーゲンとペプシンの分子量はそれぞれ 4 万と 3.5 万。それらの蛋白質をゲル電気泳動後、western blotting により検出した。

いずれにせよ、今後に残された大きな問題である。酵母を宿主として動物蛋白質の生産ができる例がいくつか報告されているが^(22,23)、蛋白質の分泌過程において真核細胞と原核細胞とは、前者に糖類の付加反応があること以外に基本的差異があるのだろうか。

おわりに

医薬用蛋白質をはじめ種々の有用蛋白質は分泌性のものが多く、それらの効率よい大量生産方法の確立は世界的緊急課題である。この問題の解決にわれわれの開発した *B. brevis* による蛋白質生産系を活用したいと願っている。*B. brevis* は抗生物質であるグラミジシンSの生産菌として古くから研究されている菌であるが、ミルクやチーズからも分離されており人畜に無害な菌であることも、有用蛋白質の生産に適している。

しかしながら、有用蛋白質、とくに高等生物の蛋白質を実用的規模で生産するためには、宿主としての *B. brevis* やベクターの改良、培養条件の改善などによる生産収率の向上、培養液中からの蛋白質の分離・精製法の確立等、今後解決しなければならない問題が多々残されている。

一方、蛋白質の高生産活性を有する *B. brevis* は、CWP の分泌機構や細胞からの離脱機構の研究に役立つ

ばかりでなく、アミラーゼのような分泌性蛋白質の膜透過機構やその調節機構を研究するのに大へん優れた対象であると考えられる。これらは興味深い基礎研究であると同時に応用にも結びつく研究であろう。蛋白質分子の任意のアミノ酸を部位特異的変異により改変したり、欠失させることは遺伝子工学の発展で容易に行えるようになった。それによって蛋白質の構造と機能がいかなる影響を受けるかを研究するには、改変蛋白質の大量調製が必要である。*B. brevis* による蛋白質の効率的分泌生産の確立によって、種々の改変蛋白質の生産が容易になり、蛋白質工学の発展や蛋白質自身の利用の促進につながると考えている。

以上の研究は名古屋大学農学部食品工業化学科培養工学教室を中心として、塚越規弘、山形秀夫両博士、坪井昭夫氏はじめ多数の共同研究者の努力と協力によって行われたものであり、これらの方々に深甚なる謝意を表わします。また、本研究の遂行にあたりさまざまな御鞭撻と御援助をいただいた諸先生、先輩諸兄に心から厚く御礼申し上げます。

- (1) A. R. Glenn : *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**, 41 (1976).
- (2) S. Udaka : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 523 (1976).
- (3) 高木広明, 門脇 清, 鵜高重三 : 第 35 回アミノ酸核酸シンポジウム講演要旨, 1986, p. 43.
- (4) S. Miyashiro, H. Enei, Y. Hirose and S. Udaka : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 105 (1980).
- (5) S. Miyashiro, H. Enei, K. Takinami, Y. Hirose, T. Tsuchida and S. Udaka : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2297 (1980).
- (6) Q. Zhang, N. Tsukagoshi, S. Miyashiro and S. Udaka : *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 293 (1983).
- (7) H. Yamada, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **148**, 322 (1981).
- (8) H. Ohmizu, T. Sasaki, N. Tsukagoshi, S. Udaka, N. Kaneda and K. Yagi : *J. Biochem.*, **94**, 1077 (1983).
- (9) A. Tsuboi, N. Tsukagoshi and S. Udaka :

- J. Bacteriol.*, **151**, 1485 (1982).
- (10) U. B. Sleytr and P. Messner : *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 311 (1983).
- (11) W. Takahashi, H. Yamada, K. Yamaguchi, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **156**, 1130 (1983).
- (12) 高木広明, 相馬 明, 門脇 清, 鵜高重三 : 昭和 62 年度日本農芸化学会講演要旨集, 1987, p. 27.
- (13) H. Yamagata, W. Takahashi, K. Yamaguchi, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1069 (1984).
- (14) H. Yamagata, K. Nakagawa, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1076 (1985).
- (15) N. Tsukagoshi, S. Iritani, T. Sasaki, T. Takemura, H. Ihara, Y. Idota, H. Yamagata and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **164**, 1182 (1985).
- (16) N. Tsukagoshi, R. Tabata, T. Takemura, H. Yamagata and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **158**, 1054 (1984).
- (17) H. Yamagata, T. Adachi, A. Tsuboi, M. Takao, T. Sasaki, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **169**, 1239 (1987).
- (18) A. Tsuboi, R. Uchihi, R. Tabata, Y. Takahashi, H. Hashiba, T. Sasaki, H. Yamagata, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *J. Bacteriol.*, **168**, 365 (1986).
- (19) 坪井昭夫, 打樋利英子, 佐々木卓治, 山形秀夫, 塚越規弘, 鵜高重三 : 第 9 回日本分子生物学会年会講演要旨集, 1986, p. 312.
- (20) Y. Kawaguchi, N. Shimizu, K. Nishimori, T. Uozumi and T. Beppu : *J. Biotechnol.*, **1**, 307 (1984).
- (21) T. Shioza, K. Nakazawa, N. Tashiro, K. Yamane, K. Yanagi, M. Yamasaki, G. Tamura, H. Saito, Y. Kawade, T. Taniguchi : *Gene*, **34**, 1 (1985).
- (22) A. J. Brake, J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela and P. J. Barr : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 4642 (1984).
- (23) Y. Nakamura, T. Sato, M. Emi, A. Miyano-hara, T. Nishide and K. Matsubara : *Gene*, **50**, 239 (1986).