

【195】

氏名(本籍)	なか 中	ざわ 澤	きよし 潔	(静岡県)
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	博	乙	第	666号
学位授与年月日	平成	3年	3月	25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
審査研究科	生物科学研究科			
学位論文題目	Studies on the signal peptide of <i>Bacillus subtilis</i> alpha-amylase and the secretion of the biologically active mouse interferon-beta by <i>Bacillus subtilis</i> secretion vectors. (枯草菌 α -アミラーゼ・シグナルペプチドとそれを用いたマウス・インターフェロン β の分泌に関する研究)			
主査	筑波大学教授	理学博士	山	根 國 男
副査	筑波大学教授	理学博士	柳	沢 嘉 一 郎
副査	筑波大学教授	理学博士	平	林 民 雄
副査	筑波大学助教授	農学博士	田	仲 可 昌

論 文 の 要 旨

近年の生物科学の研究の発展により、高等動植物の微量成分、人体で機能している微量タンパク質、生物発生の過程で一過的にしか発現されない物質など、これまで解析できなかった物質についても研究が可能となってきた。免疫学、細胞生物学、発生学上重要なタンパク質を解析するとき、十分な試料を得るために遺伝子工学の技術は必須なものとなってきている。そこで、微量タンパク質の生産を目的とし、タンパク質の菌体外分泌能が非常に旺盛な枯草菌を用いて分泌生産系を作った。

材料として、枯草菌の代表的な菌体外酵素である α -アミラーゼの分泌に必要なシグナルペプチドを用いるため、まず遺伝子工学の宿主として最も良く利用されている大腸菌での分泌能を検討した。大腸菌 β -ラクタマーゼを指標酵素として解析するため、酵素構造遺伝子を種々の長さの α -アミラーゼ・シグナルペプチドをコードするDNAの下流に連結させた。 β -ラクタマーゼは内膜と外膜の間にあるペリプラズムへ枯草菌の場合よりも短い28アミノ酸よりなるシグナルペプチドで分泌することが明らかとなった。一方枯草菌では33アミノ酸からなるシグナルペプチドが最も分泌能が高かった。また α -アミラーゼを指標酵素とした場合、枯草菌は大腸菌に比べて約100倍高い分泌能を示した。これらの結果、タンパク質の菌体外への分泌生産には枯草菌を宿主とした系が有効であることが分かった。

そこで枯草菌分泌ベクターを開発し、動物由来微量タンパク質の分泌生産の一例としてマウス・インターフェロン β の分泌を研究した。遺伝子工学的方法によりマウス・インターフェロン β

cDNA を種々の分泌ベクター中の α -アミラーゼ・シグナルペプチドの下流に連結させ、枯草菌を形質転換させた。形質転換株の選択には独自に開発したコロニー・ウエスタン法を用いて、効率よく行った。とくにインターフェロン- β のN末端のアミノ酸配列が異なっていると推定されるものを10種類構築し、N末端の構造と生物活性について比較検討した。その結果N末端付近のアミノ酸配列が生理機能と密接に関係していることが明らかになった。天然型インターフェロン- β と同じポリペプチドを分泌生産すると考えられるプラスミドによる場合よりも、より有効にインターフェロン- β を分泌するものを得ることもできた。しかし、今後の問題として、さらにプロモーター、宿主、培養方法の改良によって分泌量を増大させる可能性はまだ残されていることもわかった。また *in vitro* mutagenesis などの方法によって、インターフェロン- β 分子の構造と生物活性との関係の研究も今後行われねばならないことも明かとなった。

審 査 の 要 旨

本研究は枯草菌における α -アミラーゼの分泌に必要なシグナルペプチドを明かにし、分泌ベクターを構築し、マウスでは極微量しか合成できないインターフェロン- β を枯草菌を宿主に分泌生産することができた。これらの結果はタンパク質の膜透過の機構の研究を進めるうえで有効であり、また遺伝子工学の利用に関する新しい事実であり、高く評価されるものである。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。