

◆ 總 說 ◆

微生物酵素의 生産性

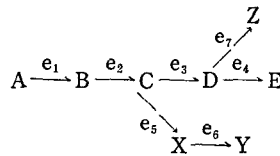
—分子遺傳學的 解析—

岡 田 弘 輔\*

1) 머 리 말

人類가 微生物이 生産하는 酵素를 利用하게 된 것은 有史以前의 일로서 아마 술 담는 법을 알게 된 時點까지 거슬러 올라갈 수 있는 것으로 짐작된다. 그러나 그 時點에서는 微生物이란 概念도 酵素라 하는 概念도 없이 다만 經驗的인 技術만 있을 뿐 酒造는 科學의 對象이라기 보다 오히려 信仰의 對象으로서 오로지 박카스스사 신령님의 기분만으로서, 成功하거나 失敗하기도 하였던 것이다. 이를 神의 신성한 業務가 그 기이한 微生物의 作用이란 것을 밝힌 것은 루이 파스투올로서 19世紀의 中葉이었다. 1871년에 파스투올은 生命과 結合한 酵素와 生命과 結合하지 않는 酵素의 둘로 分類하였다. 이 파스투올의 그릇된 생각은 그후 십수년간 酵素學을 混亂에 몰아넣었던 것이나, 現在에는 자칫하면 酵素를 生命力 즉 神聖한 Category에 넣으려고 하는 傾向이 있다. 未知世界에 대해 느끼는 未知의 魅力인지도 모르겠으나, 酵紛은 이미 오늘 날에는 未知의 것이 아니라, 石油製品과 같은 程度도 既知의 物質도 되어버리고 만 것이다.

옛부터 Europe의 술은 전분糖化에 穀物의  $\alpha$ -amylase를 使用하였는데 對하여, 東洋系의 술에서는 微生物 특히 곰팡이를 使用하여 온 것이다. 이는 風土, 氣候 특히 溫度가 크게 關係된 것으로 생각된다. 微生物을 利用한 生産에서, 예컨대 生産物이 페니실린이나 글루타민산과 같은 것, 또는 酵素 그 자체이거나, 그 生産性 또는 收量은 酵素活性의 크기로서 說明 할 수가 있다. 다시 말하여 微生物에는 生産物 E를 A에서 生物하는 能力이 있다고 할 때, 그 代謝經路는 다음과 같은 것으로 해본다.



그 때 작용하는 酵素를 각각 그림과 같이  $e_1, e_2, \dots, e_7$ 이라 한다. E의 收量을 높이기 위해서는  $e_1, e_2, e_3$  및  $e_4$ 의 酵素活性을 높이고,  $e_5$ 와  $e_7$ 의 活性을 억제시킨다는 비교적 常識的인 結論이 나온다. 이를 遂行하기 위해서는, i) 遺傳的方法(菌株의 改良), ii) 生理學的方法(培養條件의 檢討), iii) 化學工學的方法(培養裝置)의 3가지 方法이 있다. 이 3가지 方法은 서로 相乘效果를 나타내기 때문에, 하나의 手法만으로서 收量을 增加시키는 것은 適當치가 않으며, 同時에 3가지 手法를 思考할 必要가 있다. 그러나 i)의 遺傳的方法에서는 收量을 한단위 변화시키기는 容易하여, 他의 方法과 比較하여 그 效果는 크다. 收率의 增加라는 問題도 上圖에서 나타나는 바와 같이 原理的으로는 簡單하지만, 實際로는 그렇게 單純하지 않다. 例로서 Y가 生命維持에 必須的의 質이라면  $e_5$ 의 缺落은 致死變異이므로, 特定한 條件下(X 또는 Y가 주어진 상태)에서만 發育할 수 있는 것이다. 그 외에도 生命體에서는 自動制御가 꼭 發達하고 있어, 이 制御는 그 生命體에 있어서 대단히 편리하게 되어있는 것이기는 하나, 그것을 利用하는 인간측에서 보면 반드시 그렇지가 않다.

다시 말하면 위에서 E라는 生産物을 利用측에서는 大量生産은 美德일 수가 있으나, 微生物측에서 볼 때 必要以上으로 蓄積하는 것은 合成에너지의 浪費와, 그것을 合成하는 酵素蛋白質의 浪費를 意味하는 것이다. 이와 같은 浪費를 하지 않고 E가 蓄積한다면  $e_1, e_2, \dots, e_4$ 의 酵素活性을 低下시키려는 機構(最終生産物阻害)와  $e_1, e_2, \dots, e_4$ 의

\*大阪大學 工學部 發酵工學科 教授(工博)  
번역: 裴 武(K.I.S.T)

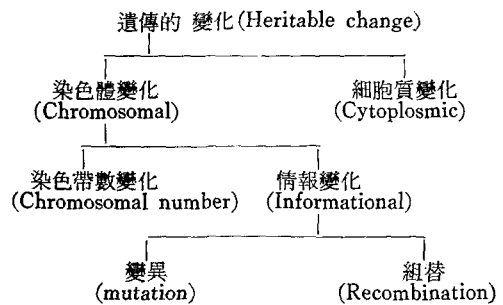
號1表 Salmonella 菌에서의 histidine 供給에 要하는 에너지

所要에너지 (世代時間 50分으로 함)	所要에너지 (ATP 換算 $\mu$ nrcl/g 菌體/分)
1. 代謝에 의한 總所得에너지	4000
2. Histidine 生合成所要에너지	56
3. 細胞內 histidine 의 利用에 要하는 에너지	1
調節에 의하여 節約되는 에너지	
4. 調節하지 않을 때 histidine 生合系の 消費에너지	140
5. 調節에 의한 節約(4-2)	84
6. 細胞外에 histidine이 供給되었을 때의 節約(4-3)	139

酵素蛋白質의 合成을 억제하려는 機構(repression)가 自動적으로 作動하고 있는 것이기 때문에 菌株의 改良에는 이들 制御를 破壞할 必要가 있다. 이와 같은 制御力이 破壞되어 있는 個體가, 즉 浪費癖이 있는 個體가, 얼마나 生存競爭에 弱한가를 나타낸 것이 第1表이다. 이 예에서는 Salmonella typhimnsium 이란 細菌이 아미노酸的 1種, Histidine 合成系制御의 缺落에 의하여 어느 정도를 浪費를 하고 있으며 生存上 얼마나 不利益을 받나를 나타내고 있는 것이다. 生物學的 에너지는 合成되는 adenosine-3-phosphate (ATP)의 mole 數로 계산하는 것이 便利하다. S. thyphimurium 에서는 1g 菌體는 每分 4000  $\mu$  mole 的 ATP 를 合成하며 그 중 56  $\mu$  mole 을 Histidine 的 生合成에 使用하고 있다. 만일 制御系가 破壞되면 不必要한 histidine 이 合成되어 그 直接 및 間接經費는 140  $\mu$  mole ATP 에 해당한다. 外部에서 Histidine 을 주면 물론 그 運搬費(細胞內에서도 能動輸送에 要하는 ATP) 만으로 족하게 된다. 記算結果부터 말하면, 制御系가 完全한 細菌의 世代時間가 50分 일 때, 制御系가 破壞되어 있는 細菌의 世代時間은 51.5분이 된다. 이것은 만일 兩方의 細菌을 1:1의 비율로 混合하여 培養하면 24日後에는 그 비율이 1:100萬이 되어, 에너지浪費型的 細胞는 生存競爭에 패배해 버림을 나타내고 있다. 그러나 우리들 達酸 酵人들이 찾은 菌이란 다음과 같은 菌인 것이다.

## 2) 菌株의 改良

菌株의 改良이 처음으로 系統的으로 行해진 예는 Penicillin 生産에서의 Penicillium crysogenum 的 改良이었다. 그리하여 여러가지 手法이 開發되어 그 후의 遺傳學에 重要한 影響을 주게 된다. 遺傳的인 變化를 分數하면 다음 그림과 같다.



特殊한 例를 제외하면 菌株改良에 變異를 利用하고 있으나, 變異가 어떻게 하여 일어나는가를 說明하기 위하여 가장 基礎的인 遺傳學的 法則을 說明하면, 다음과 같다.

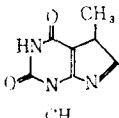
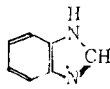

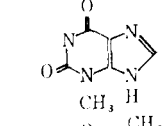
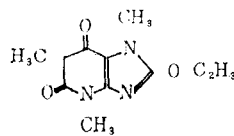

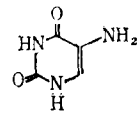

a) 遺傳子의 本質은 DNA(Deoxy 核酸)이며 그 사슬로 되어 있다. DNA는 그 構成學位는 Thymidic acid(T), Deoxyadenylic acid(A), Deoxyguanylic acid(G) Deoxycytylylic acid(C)의 4개뿐이다.

b) 두 사슬중에서 A와 T, C와 G가 서로 향하여 水素結合을 형성하고 있으며, 染色體의 分裂 등 增殖시에 A의 相對로 T를 택하고(또는 그逆) C의 相對로 G를 택하(또는 그逆)므로서 DNA의 鹽基의 암호가 子孫에 전달되어 진다.

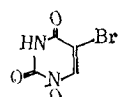
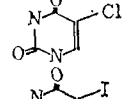
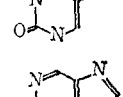
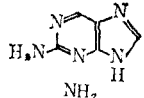
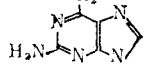
c) DNA 鹽基의 配列은 蛋白質의 아미노酸的 配列을 決定하는 것으로서, 염기 3分子配列順序가 1個의 아미노酸을 決定한다.

따라서 遺傳子 DNA 上에 어떠한 配列順序에 變更을 일으키게 하는 現象이 突然變異인 것이다. 突然變異에 의하여 일어나는 DNA의 異常은 i) 置換—DNA 중의 하나의 鹽基例컨데 A가 다른鹽基(T, G 또는 C)로 代置되는 것, ii) 缺落—DNA 中の 鹽基가 하나 또는 그以上 缺어지는 것, 따라서 DNA는 짧아진다. iii) 插入—DNA의 사슬속에 새로이 하나 또는 그 以上の 鹽基가 들어가므로서

第2表 Deoxynucleotide 生合成阻害에의 한變異誘發劑

變異藥劑		阻害個所
Ethyl urethan	$C_2H_4NHCOOC_2H_5$	Purine 合成
Paraxanthine		Purine 合支
Tetramethyluric acid		Purine 合成
Theolromine		Purine 合成
Theo phylline		Purine 合成
Benzimidazole		Purine 合成
Caffeine		Purine 合成
8-Ethoxycaffeine		Purine 合成
6-Mercapto purine		Tymine 合成
5-Nitroquinoxaline		Purine 合成
5-Amino uracil		Purine 合成
Azaserine		Tymine 合成
Tymine 缺落	$N_2CH_2COOCH_2CH$	—
Uracil 大過剩添加	$NH_2$ $COOH$	—

第3表 속에 들어가는 變異誘發劑

核酸鹽基類似體		鹽基對形成相手	
		主 要	副 要
5-Bromouracil		adenine	guanine
5-Bhlorouracil		adenine	guanine
5-Iodouracil		adenine	guanine
2-Aminopurine		Tymine	cytosine
2,6-Diamino purine		Tymine	cytosine

DNA는 길어진다. iv) 逆立-DNA의 일부順序가 逆轉하는 수가 있다. 以上과 같은 結果 酵素蛋白質에 일어날 수 있는 예상에 對하여는 後述하기로 한다.

### 3) 變異誘導劑

突然變異는 그 이름대로 自然히 突然하게 일어나고 있다. 그 確率의 정도는  $10^{-8}$  以下이다.

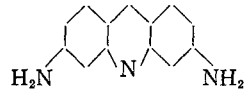
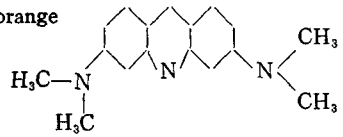
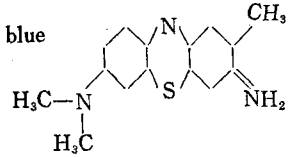
즉 遺傳에서는 情報傳達는 꼭잡되어 있어 複寫에 틀림이다 1億회에 1회정도밖에 일어나지 않고 있다. 우리는 1億회에 한번 일어나는 대상을 기다릴 수는 없기에 變異를 誘發시킬 수 있는 手段을 강구하고 있다. 사용방법은 紫外線照射, 化學藥劑와 放射線의 照射가 있다. 紫外線照射에서는 波長 260 m $\mu$ ~280 m $\mu$ 의 紫外線照射가 가장 有效하다.

이 波長의 빛에 의하여 細胞는 대부분 死滅하나 살아남은 細菌中에 變異株가 다수 出現한다. 이 現象은 DNA 중의 T가 그 殘基와 變異가 變異되어 있는 部分에서 Tyamine 그 量體가 생긴다. Tyamine 그 量體는 一部可視光下에서 원래의 Tyamine로 복귀하나 되돌아 오지않는, 생물의 自己治療라고도 할 수 있는 酵素가 작성하여 Tyamine 그 量體를 포함한 部分을 切除한다. 그 후에 修復酵素가 作用하여 원래의 DNA로 修復하게 된다. 즉 DNA의 “수선”을 하는 것인데, 이것은 비교적 不確實하여 틀리는 수가 많으나 그 결과 變異가 일어나기 쉽게되는 것이다. 藥劑에 의한 變異誘發의 機府에는 몇가지가 있다. 第2表에 정리되어 있는 것들은 DNA의 構成單位(A, T, C, G) 중의 어느 하나 以上の 合成을 阻害하는 것이다. 예컨대 5-aminouracil을 투여하면 T의 合成이 阻害된다.

따라서 A, G, C는 풍부히 있으나 는 缺乏하고 있는 條件下에서 DNA 合成이 행해지므로 正常에서 T가 있을 位置에 A, G 또는 C가 들어갈 비율이 높아진 결과 置換變異가 일어난다. 第3表에서 보는 變異劑는 A, T, G, C의 대신에 DNA中에 들어갈 수 있는 物質들이다. 代表的인 것은 5-bromouracil(5BU)과 2-aminopurine이나 5BU는 T대신 DNA 속에 들어 갈 수 있다. 分裂할 때 結合하는 相對로서 A를 택하나 때로는 변덕을 이트켜 G를 택하는 수가 있다. G를 상대로 태하면 變異하게 된다.

즉 5BU는 安定한 鹽基雙作成的 相對가 둘 以上이다 것이 變異를 이트키는 原因이 되는 것이다.

第4表 色素의 變異誘發劑

變異藥劑	構造
Proflavin	
Acridine orange	
Toluidine blue	

第5表에는 變異劑가 되는 色素를 정리하였다. 이들 色素에 어떻게 變異를 이트키나 하는것은 現在不明하나 缺落變異가 일어나기 쉬운 것은 알려져지고 있다.

第5表에는 DNA와 反應하여 修飾을 이트키는 것들이 정리되어 있다. 脫아미노 反應이나 알킬化되어 不安하게 되어 알킬化 purine이 DNA에서 떨어진다. 이어 鹽基가 떨어진 主鎖部分이 不安定하여 加水時解를 쉽게 당하게 된다. 그 後의 修復時의 잘못이 變異인 것으로 일단 說明되고 있다.

放射線으로서 變異를 誘發하는 것은  $\alpha$ - $\beta$ -,  $\gamma$ -(x-), 陽子線, 速中性子線 등이다.  $\alpha$ -線은 射程에 倏 조밀하게 이온쌍을 만든다. 線源에 따라 다른긴하나 空氣中에서는  $\alpha$  粒子는 7~8cm 나를 뿐이긴 하나 1cm當 6萬 ion 쌍을 만드므로 遺傳子가 飛程上에 있을 때는 變異가 일어나기 쉽다. 그러나 飛程은 水中에서는 미크론 單位이므로 使用하기 어렵다  $\beta$ -線은  $^{32}P$ 의  $\beta$ 線으로 Al板 800mg/cm<sup>2</sup>의 貫通力만 지닌다. 이온쌍은 空氣中에서 그 飛程上에 따라 43( $^{32}P$ ), 120( $^{14}C$ ), 900( $^3H$ ) 程度이다.  $\gamma$ -線 또는 x-線의 이온쌍의 生成은 前2者와 비하여 월등히 적으나 貫通性이 좋으므로 變異에 쓰이는 수가 많다. 照射量(D)과 變異株의 出現頻度(M)와의 사이에는 다음과 같은 關係가 있다.

$$M=CD$$

死滅曲線은


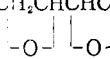
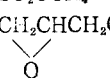

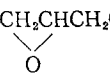
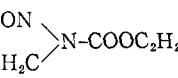
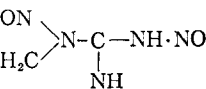

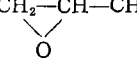
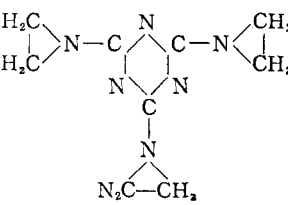
$$dN/dt = -kN$$

$$N = N_0 e^{-kt} = N_0 e^{-k'D}$$

N : 生存菌數

t : 照射時間

第 5 表 DNA 와 反應하여 修飾하는 變異誘發劑

變異藥劑	構 造	
亞磁酸鹽	NO <sub>2</sub>	脫아미노反應
Hydroxylamine	NH <sub>2</sub> ON <sub>2</sub>	uracil 環分解
Hydrazine	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	pyrimidine 環의 分解
酸	H	[purine 鹽基의 分解 DNA 主鎖의 加水分解]
Azaserine	N <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH 	alkylation
Bis(β-chloroethyl)sulfide (nitrogenmustard)	S <sub>1</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	"
Butyl chlosoethyl	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl	"
Diazomethane	N <sub>2</sub> CH	"
Diepoxybutane	CH <sub>2</sub> CHCHCH <sub>2</sub> 	"
Diethyl sulfate	SO <sub>2</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	"
Dimethyl sulfate	SO <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	"
Eplechlorohydrin	CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> Cl 	"
Ethyleneimine	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> 	"
Ethyl eshansulfste	C <sup>2</sup> H <sub>4</sub> OSO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	"
Ethyl methansulfate	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	"
Formaldehyde	CH <sub>2</sub> O	"
Glycidol	CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> OH 	"
N-Methylbis(Chloroethyl) amine	CH <sub>2</sub> NC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	"
Methyl methanesulfate	CH <sub>3</sub> OSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	"
N-Nitroso-N-methyl urethan	ON 	"
N-methyl-N-nitro N-Nitrosoguanidine	ON 	"
Phenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	
β-Propiolactone	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO 	
Propylene oxide	CH <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> 	
Triethylene melamine		alkylation

No : 初發菌數      D : 照射線量  
k, k' : 定數

#### 4) 變異株의 酵素生産

以上과 같이하여 變異株가 취득되었다 하여도 그 變異株의 酵素가 質 또는 量에서 어떻게 變異하고 있나 하는 점은 變異를 이끈 部位 및 이끄는 方法에 의하여 틀려진다. 더욱이 酵素蛋白質中の 아미노酸 變化에 의하여 活性이 어떻게 變化하나 하는 점은 일층 雜問題이다. 우리의 最終目標은 所望의 酵素活性에서 突然變異를 설계하여, 그것을 効果의으로 遂行하는 것이나, 아직 그것은 먼 未來의 일이다.

變異部位 및 變異樣式과 酵素活性 關係를 理解하기 위하여 그림 1에 Monod 와 Jacob<sup>2)</sup>의 假設을 說明하면 다음과 같다.

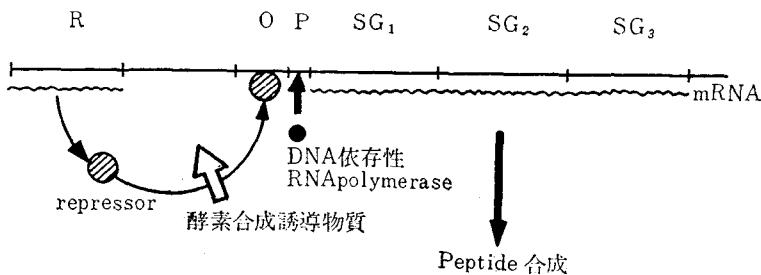
DNA 는 그 기능으로 分類하여 構造遺傳子 operator, promoter, regulator 등의 各遺傳子로 되어 있다. 構造遺傳子의 部分은 그 酵素의 아미노酸配列이 쓰여진 部分으로서 前述한 바와 같이 3鹽基組로 하나의 아미노酸을 記錄하고 있다. 그 외에 終止記號가 있다. 道常構造遺傳子는 數個가 모여서 하나의 集團을 이루고 있고 하나의 operator 遺傳子의 制御下에 있으며 operon 이라 불려진다. 이 operator 는 構造遺傳子와 隣接하며 一部가 promoter 라 불려지는 部分으로 되어 있다. promote 一部分은 DNA 依存性 RNA-polymerase 이란 酵素의 第一次作用點으로서 여기서 酵素가 結合하여 messenger-RNA(mRNA)의 合成이 시작된다. mRNA 는 DNA 의 情報를 RNA 에 復寫한 것으로 靑寫眞은 ribosome 이란 工場에서 酵素蛋白質合成의

情報로서 使用된다. 調節遺傳子의 部分에서는 regulator(蛋白質일수도 있고 核酸일수도 있다)를 合成하며 이 物質은 operator 部에 結合하면 mRNA 合成이 阻止된다. 그러나 regulator 는 誘導物質과 結合하면 그 이상 operator 部에 結合하지 않는다. 즉 mRNA 가 合成되고 그후 酵素가 合成된다.

以上과 같이 變異라 하여도 構造遺傳子 operator, promoter, regulator 의 各遺傳子上에서 이러한 變異는 각각 다른 表現型을 취하게 된다.

構造遺傳子上의 變異 : 構造遺傳子上의 置換變異는 그 酵素蛋白質의 아미노酸의 置換을 일으킨다. 예컨대 DNA 上의 AAA 의 Code 는 mRNA 에서 U-UU 를 意味하고 蛋白質의 配列中 phenylalanine 을 指定한 것인데 ATA 일때는 Tyrosine 에, ACA 에서는 Cystine 에, AGA 에서는 serine 에 각각 아미노酸變化가 이어난다. 이 變化가 酵素活性에 주는 영향은 (1) 그것이 활성중심이면 효소활성이 없어진다. (2) 活性은 있으나, 低活性, 低基質親和性 低耐熱性 등의 효소를 생산한다. (3) 特히 變化는 없다. 등이 있을 수 있으나 現在의 酵素學의 知識으로 先예견 할 수 없다.

構造遺傳子上의 置換變異가운데 새로히 TTA 와 TCA 가 생기는 경우는 예외이다. mRNA 上에 U-AA 와 UGA 가 생겨서 이 記號는 終止符에 해당한다. 따라서 그 點에서 peptide 合成이 끝나므로서 짧은 peptide 가 合成된다. 보통 이와 같은 中대한 變化를 받은 효소는 不法性인 것이나, 그 밖에 polarity 란 현상이 있다. 이것은 같은 operon 에 속하는 一群의 효소는 같은 mRNA 에 轉寫되는데 上位의 構造遺傳子에 UAA 또는 UGA 가 생겨, peptide 合成이 끝난 후, 다음 효소단백의 peptide-



R : 調節遺傳子  
O : operator 遺傳子  
P : promoter gene  
SG<sub>1</sub>, SG<sub>2</sub>, SG<sub>3</sub> : 構造遺傳子

第 1 圖 Jacob 와 Monod 의 假說에 의한 遺傳子調節 Model

合成開始信號까지 距離가 생긴다. 이 距離를 ribosome 이 移行하는 동안에 脫落을 이르기 쉽다. 즉 下位에 있는 효소가 생성되기 어려워진다. 즉 終止記號가 나온 단백질의 活性은 ○이 될뿐 아니라, 下位の 효소활성이 저하하게 된다.

構造遺傳子上的 缺落變異는 缺落鹽基의 數에 따라, 效果가 달라진다. 큰 缺落에서는 酵素活性은 없어진다. 一般的으로  $3 \times n$  個의 鹽基對의 缺落에서는  $n$  個 아미노酸이 적은 단백질이 나오게된다.  $3n \pm 1$  個의 缺落의 場合 경우는 所謂 frame shift의 現象이 이어나온다.

지금 mRNA 의 단계에서

AGCAAUGGAA

와 같은 配列이라 한다(AGC)는 Serine 을(AAU)는 asparagine 을, (GGA)는 glycine 을 의미한다. 지금 左端의 A가 缺落하면 解讀單位가 (GCA) (AUG) (GAA)가 되어 이것은 alanine · methionine · glutamic acid 가 되어 전혀 다른 단백질이 형성된다. 그 밖에 새로운 解讀單位로서 UAA 또는 UGA 가 생길 가능성이 1/32 있다.

이 현상이 이어나면 前述의 polarity 가 생기게 된다.

構造遺傳子의 搜入變異는 缺落變異와 비슷하나 아미노酸數는 增加한다. frame shift 및 polarity 에서도 같은 現象을 나타낸다.

promoter 遺傳子에 이어나는 變異에서는 두가지 현상이 주로 나타난다. 그 하나는 mRNA 의 生産量에 관계하는 즉 DNA 依存性 RNA 合成酵素와 親和性이 증가 또는 감소하는 變異가 이어나면 合成酵素蛋白質이 量的으로 變化한다.

그 다음것은 promoter 部位는 2', 3'環狀 adenylic acid (cAMP)가 結合하는 部分으로서 cAMP 와 結合하고 있을 때만 mRNA 合成이 可能한 酵素群이 있다. 소위 말하는 "Catabolite repression"을 받는 酵素群으로서 대사조절에서 관계하는 효소에 보통 볼 수 있다.

operator 部位에서의 變異 酵素合成의 自動制御에서의 中心部로서 다음에 말하는 repressor 遺傳子와 밀접하게 관계하고 있다. 調節遺傳子의 生産物 repressor 가 이 部分에 結合하면 mRNA 의 合成이 停止하며, 떨어지면 mRNA 가 合成되어 효소합성이 開始된다. operator 部位의 변이로서 repressor 가 결합 못하게되면 조절할 수 없게되어 언제나 최대량의 효소단백질을 합성하게 된다. 이와 같이 完全한 失調型으로부터 部分的인 失調型까지 여러

정도의 변이주가 있다.

調節遺傳子에서의 變異 repressor 가 단백질일수도 있고 또 核酸關連物質일 경우도 있다. 乳糖가수분해 효소의 조절유전자는 오직 하나있어<sup>1)</sup>(大腸菌) repressor 는 단백질이나 Histidine 合成의 酵素系에서는 조절유전자가 적어도 5 個 알려지고 있어 最終的으로 調節作用을 가진것은 histidy/ 轉移 RNA 라고 한다.

### 5) 酵素生産性

지금까지의 遺傳子에서 본 효소생산량 支配의 가능성을 살펴 보았다. 여러 變異에 의하여 효소생산을 변화시킬 수 있음을 前述한 바와 같다. 第6 表에서는 operator 유전자나 여러 종의 조절 유전자의 變異가 histidine 合成酵素의 生産性을 바꿀 수 있음을 나타내고 있다.

His O 와 operator 유전자이며 His S, His T, His R, His W, His U 는 모두 조절유전자들이다.

第6 表 Histidine 調節遺傳子變異株의 Histidine 合成酵素量

菌 株	Histidine 添加培地	最少培地
野 生 株	0	(1.0)
His O 1202		6.7
His O 1242	13.0	14.6
His S 1210	1.1	5.5
His S 1211	3.8	10.0
His T 1504	8.8	9.4
His R 1223	6.8	7.0
His U 1817	12.0	9.5
His W 1825	6.7	7.6

Promoter 유전자의 生産性에 대한 作用은 Bacillus subtilis 의 形質轉移의 實驗에서 잘 나타나고 있다<sup>4)</sup>. Bacillus subtilis 168 은  $\alpha$ -amylase 生産性定數 20의 것이다.

또한 3212株는 生産性定數 1의 것으로서 兩者의  $\alpha$ -amylase 는 電氣泳動上的 性質이 다르다. 즉, 아미노酸 配列이 다른 것이다. 168株에서  $\alpha$ -amylase 의 구조유전자부분에 變異가 이어나  $\alpha$ -amylase 活性이 없는 變異株 168 amy 株를 만든다.

이 株는 promoter 部는 生産性定數 20(P20)과 缺擇한 amylase 구조유전자 (amy)를 가지고 있다. 여기에 3212株에서 만든 DNA 를 사용하여 transformation 시킨 결과를 第7 表에 나타낸다. 3212株의 P<sub>1</sub> 과 amylase 구조유전자의 部分을 받아들일 것

P<sub>20</sub>은 그대로나 구조유전자의 缺擇部만을 받아들인 것등 여러가지가 나타난다.

第7表 3215株(P<sub>1</sub> amy<sup>+</sup>)의 DNA에 의하여 168 P<sub>20</sub> amy<sup>-</sup>株에서 얻어진 形質轉移株의 性質

Amylase +株	
P <sub>1</sub> 인것	P <sub>20</sub> 인것
3215株型의 1mylase를 만드는 것	168株型의 amylase를 만드는 것
30	6
	9

### 6) 進傳子用量說

같은 효소를 生産하는 구조유전자가 2개 이상 있으면 효소생산성은 각각의 유전자에 特有한 生産性的의 합으로 나타난다. Saccharomyces cerevisial의 maltase는 重複유전자支配를 받는 것으로 구조유전자 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>가 있고, 그중 하나가 優性이면 maltase 陽性이 된다. 이들 4개의 유전자의 組合으로서 生産性的의 變化를 조사한 결과를 第8表에 나타난다. 그의 大腸菌의 乳糖代謝系의 遺傳子를 phage로서 重複시켰을 때도 같은 결과를 나타낸다.

第8表 酵母의 maltase 生産性的과 遺傳子型

遺傳子型	酵素生産性	
	測定值	計算值
M <sub>1</sub> M <sub>1</sub> m <sub>2</sub> m <sub>2</sub> m <sub>4</sub> m <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	2090	
m <sub>1</sub> m <sub>1</sub> M <sub>2</sub> M <sub>2</sub> m <sub>4</sub> m <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	300	
m <sub>1</sub> m <sub>1</sub> m <sub>2</sub> m <sub>2</sub> M <sub>3</sub> M <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	1000	
m <sub>1</sub> m <sub>1</sub> m <sub>2</sub> m <sub>2</sub> m <sub>3</sub> m <sub>3</sub> M <sub>4</sub> M <sub>4</sub>	1100	
M <sub>1</sub> m <sub>1</sub> M <sub>2</sub> m <sub>2</sub> M <sub>3</sub> m <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	1625	1700
M <sub>1</sub> m <sub>1</sub> m <sub>2</sub> m <sub>2</sub> M <sub>3</sub> m <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	1450	1550
M <sub>1</sub> m <sub>1</sub> M <sub>2</sub> m <sub>2</sub> m <sub>3</sub> m <sub>3</sub> m <sub>4</sub>	1280	1200
m <sub>1</sub> m <sub>1</sub> m <sub>2</sub> m <sub>2</sub> M <sub>3</sub> m <sub>3</sub> M <sub>4</sub> m <sub>4</sub>	950	1050
m <sub>1</sub> m <sub>1</sub> M <sub>2</sub> m <sub>2</sub> m <sub>3</sub> m <sub>3</sub> M <sub>4</sub> m <sub>4</sub>	790	700

### 7) Bacillus subtilis에서의 特殊例

通常의 酵素에 있어서는 mRNA는 合成되어 酵素合成에 사용되면 數分後에는 分解되어 버린다.

그러나 B. subtilis의 α-amylase의 例에서는 그 壽命이 꽤 긴것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 이러한 例는 赤血球의 Hemoglobin 合成을 비롯하여 B. subtilis의 단백질분해효소, 麴菌 등의 곰팡이의 amylase나

단백분해효소 등 細胞外에 分泌되는 酵素들이 그러하다.

mRNA의 長壽命說의 根據가 된 實驗을 약간 전문적인 내용이나 例記하여 보면

(1) B. subtilis의 α-amylase 生産은 보통의 蛋白合成과는 比例하지 않고 他의 一般蛋白質과는 다른 速度式에 따른다.

(2) 아미노酸에서 단백질을 合成하는 단계를 阻害하면 α-amylase 生産은 確實히 阻害된다.

阻害方法은 puromycin 이나 chloramphenicol 과 같은 抗生物質, 5-fluorophenylalanine Leucine 과 같은 아미노酸類似物質을 添加하였을 때 또는 Leucine 要求性的의 變異株를 leucine의 培地에 옮겼을 때 등 어느 경우나 같은 結果를 얻을 수 있다. 이 조건에서는 一般蛋白質의 合成도 停止되어 增殖도 또한 停止한다.

(3) mRNA 合成을 阻害하여도 α-amylase 生産은 停止하지 않으나 一般蛋白質合成은 阻害되며 증식도 阻害된다. mRNA를 合成阻害하는 方法은 actinomycin D를 첨가하거나 uracil 要求菌을 만들어 uracil 缺의 배지에 옮기는 등의 方法에 의하여서 할 수 있다. mRNA의 다른 阻害劑 rifampin의 效果에 대해서는 여러 異論이 있었으나 最近이 藥劑의 致死效果는 꽤 크다는 사실에서 公同 해석이 나오게 되었다.

(4) 同調배양(각 세균이 일제히 세포분열을 開始하게끔 同調시킨것)에서는 道常의 酵素는 世代時間中 一回增加할뿐이나 α-amylase는 언제나 增加를 계속한다.

(5) α-amylase의 mRNA가 安定하다는 假說에서 求한 速度式에 잘 一致한다.

$$E = k \int_{t-\theta}^t x \cdot dt \dots (1)$$

단 t: 培養時間 x: 菌體量  
k: 定數 θ: mRNA의 平均壽命  
E: α-amylase 生産量 t-θ가 負로 될때는

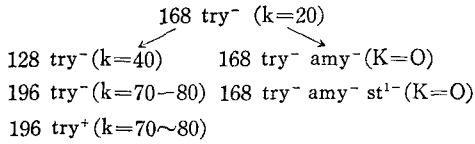
0라 한다.

따라서 酵素生産性的을 決定하는 因子는 k와 θ의 두개가 된다. 지금까지 말해 온것은 모두 k에 關連한 것들이었으나 새로이 θ라는 項이 불어난 것이다.

變異에 의하여 θ의 價가 變化하여 生産性的이上昇한다는 것은 充分히 생각할 수 있다. 著者의 研究室 結果에서는 아직 θ가 變化한 例는 없으나 앞으로는 充分히 있을 수 있는 일이다.



이상의 量支配의에도 未知의 支配機構가 존재할 수 있다. 前述의 *B. subtilis* 168에서 出發하여 2 段階의 變異에 의하여  $\alpha$ -amylase 生産性이 우수한 株를 취한다.



이들 3개 株의 배양경과를 (1)式에 따라 plot 하면 이 傾斜가 k 値가 된다. 168株→128株의 變異는 hnlp 遺傳子, 128株→196株의 變異는 hap 遺傳子로 이러한 것으로 한다. 168株에서 變異에 의하여  $\alpha$ -amylase 生産性은 4 倍로 될것을 意味하나 그 사이의 變異에 의하여 酵素蛋白質은 變化를 하지 않고 있다<sup>7)</sup>.

$\theta$  値도 不變이며 다만 k 値가 변했을 뿐이다. 168  $\text{try}^- \text{ amy}^- \text{ st}^1$  를 受納菌으로 하여 196  $\text{try}^+$  의 DNA 를 사용하여 形質轉移를 하면 amylase 의 構造遺傳子가 導入됨과 同時에 hap 遺傳子가 導入된 菌이 취득되어 k=50 정도의 菌株가 出現된다. 이 導入菌의 protease 는 168 株에 비하면 約 30 倍 生産性이 向上하고 있으며 그외에 bacteriophage PBS 1 에 대한 耐性を 獲得하여 운동성이 없어지고 더욱이 鞭毛가 없어진다<sup>8)</sup>.

이와같이 多現象의 遺傳子가 酵素生産性を 量的으로 支配하고 있음은 전혀 未知의 영역으로서 今後の 課題라 할 수 있다.

## 文 獻

- 1) Martin R.G., Magdasaria M., Ames, B.N. and Roth J.: "Metabolic Regulation and Enzyme Action Sols and Grisolia Ed. pl Academic Press. New York(1969)
- 2) Jacob, F and Monod, J.: Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 193, 389(1961)
- 3) Lewis, J.A., and Ames, B.N.: J. Mol. Biol., 66, 131(1972)
- 4) Sekiguchi, J., and Okada H.: J. Bact. (投稿中)
- 5) Gorman, J., Tauro, P., La Barge, M. and Halvorson, H. O.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 43(1964)
- 6) Kinoshita, S., Okada, H. and Terui, G.: J. Ferment. Technol., 46, 427(1968)
- 7) Sekiguchi, J. and Okada, H.: J. Ferment. Technol. 50, 801(1972)
- 8) Sekiguchi, J., Takada, N. and Okada, H.: J. Bact. (投稿中)