

551 麹菌 *Aspergillus oryzae* ヌクレアーゼ S1 遺伝子 (*nucS*) の構造解析

○李 秉魯、北本 勝ひこ、山田 修、熊谷 知栄子 (醸試)

【目的】 S1 mapping として知られる転写開始点の決定には、*A. oryzae* 由来のヌクレアーゼ S1 が使用される。今回、ヌクレアーゼ S1 遺伝子の構造解析とその大量生産を目的として遺伝子をクローン化し *nucS* と命名した。また、遺伝子発現についても検討中であるので併せて報告する。

【方法と結果】 ヌクレアーゼ S1 のアミノ酸配列をもとに合成したオリゴヌクレオチド・プライマーを用いて PCR によって得た約 0.8 kb の DNA 断片をプローブとして、*A. oryzae* RIB 40 のゲノミック・ファージ・ライブラリーから 3 株のポジティブクローンを得た。これらはいずれも PCR 増幅断片と共通の制限酵素断片を有していた。PCR 増幅断片とハイブリダイズする 2.1 kb の *SalI* 断片と 1.2 kb の *EcoRI* 断片の塩基配列を決定したところ、塩基配列から予想されるアミノ酸配列は 20 アミノ酸からなるシグナル配列の後 267 アミノ酸からなる配列が Iwamatsu¹⁾ らにより報告されている成熟タンパク質とアミノ酸 1 個だけが異なるほかはまったく同じ配列を有していた。*nucS* は 49, 50 bp からなる 2 つのイントロンを含んでいた。*nucS* の発現については *nucS* を多コピー導入した *A. oryzae* の形質転換株、と *nucS* のプロモーターを強力なグルコアミラーゼ (*glaA*) プロモーターで置換した形質転換株についてヌクレアーゼ S1 の生産性を検討中である。

1) Iwamatsu et al. (1991) J. Biochem., 110, 151-158

Molecular cloning and sequencing of the nuclease S1 gene from *Aspergillus oryzae*

○Byung Rho LEE, Katsuhiko KITAMOTO, Osamu YAMADA, Chieko KUMAGAI
National Research Institute of Brewing

【Key Words】 nuclease, molecular cloning, expression

552

ルシフェラーゼ遺伝子を用いた麹菌 (*A. oryzae*) 遺伝子発現の解析
— 米麹製麹中のアミラーゼの発現動向 —

○山田 修、北本勝ひこ、熊谷知栄子 (醸試)

【目的】 その高感度性と測定の簡易さから動植物において広く使われているルシフェラーゼが、麹菌 (*A. oryzae*) においても有効なレポーター遺伝子であることを我々はすでに報告している。今回はこのルシフェラーゼの高感度性を利用した米麹製麹中の各種酵素発現モニタリング系の開発を目的として、アミラーゼを指標に形質転換麹菌の作成、形質転換麹菌による米麹の製麹、活性測定系の検討を行ったので報告する。

【方法及び結果】 胞子の形成がよく *niaD*⁻ をマーカーとして持つ *A. oryzae* *niaD300* を形質転換用宿主とし、*A. oryzae* の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) 及びグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*) のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を作成し形質転換を行った。サザン解析の結果、形質転換体の約 6 割が相同的組み換えにより 1 コピーのルシフェラーゼ融合遺伝子をゲノム中へ組み込んでおり、また菌体内にルシフェラーゼ活性を発現していた。これらの形質転換体より胞子を調製し α -米による米麹の製麹を行ったところ、液体窒素中で破碎、抽出することにより麹 1 粒から菌体内ルシフェラーゼの活性測定が可能であり、ルシフェラーゼにより各種酵素発現のモニタリングが可能なが確認された。さらに、より簡易なルシフェラーゼ活性の測定方法及び米麹製麹中のアミラーゼの発現動向についても報告する。

Monitoring of amylase gene expression during koji making using the luciferase gene as a reporter gene

○ Osamu Yamada, Katsuhiko Kitamoto, Chieko Kumagai (NRIB)

【Key Words】 luciferase, amylase gene expression, koji