

347 偏性嫌気性糸状菌 *Neocallimastix frontalis* による
cellulolytic enzymes の生産 (広大院・工・分子生命)

○村上誠、中島田豊、柿菌俊英、西尾尚道

【目的】 *Neocallimastix frontalis* は草食動物のルーメン内に生息する偏性嫌気性糸状菌であり、植物バイオマス由来の高分子を分解資化する能力を有している。そこで本研究においては植物バイオマスの主要構成成分を基質とし、本菌による cellulolytic enzyme の生産について検討した。

【方法】 供試菌株としては *N. frontalis* (ATCC76100) を用いた。培地は cellulose を基質とした複合培地を用い、培養は完全嫌気条件下、39℃、pH6.9 で行った。菌体増殖は水素生産量から見積もり、酵素活性 (Avicelase, CMCase, Xylanase, β -glucosidase) は DNS 法により、発酵生産物は GC、HPLC によりそれぞれ測定した。

【結果】 まず、植物バイオマスを構成する種々の物質について、その分解活性を検討したところ、cellulose において最も高い酵素 (CMCase, Xylanase) 活性が得られた。次に、種々の cellulose 濃度で本菌を培養したところ、4.0 (g/l) 以上で高い増殖、酵素活性が得られたが、それ以上の濃度では pH が大きく低下し、cellulose の残存がみられた。そこで pH を本菌における至適領域 (6.9) に制御し、その酵素生産について検討である。

Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*

○Makoto Murakami, Yutaka Nakashimada, Toshihide Kakizono and Naomichi Nishio
(Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ.)

【Key words】 *Neocallimastix frontalis*, cellulolytic enzyme, biomass, rumen

348 *Trichoderma reesei* 由来低分子量エンドグルカナーゼ (EGL) の
大腸菌における大量発現

○森 一樹、多田 幸治、熊谷 博道、野川 優洋、岡田 宏文、
森川 康 (長岡技科大・生物、旭硝子)

【目的】我々は既に *Trichoderma reesei* が生産する低分子量エンドグルカナーゼ (EGL) の遺伝子のクローニング、大腸菌および酵母での発現を行っている¹⁾。今回は EGL の部位特異的変異体を構造と機能の研究に用いるために、大腸菌を宿主として EGL の最適な発現条件を検討した。

【方法および結果】発現ベクターに挿入する *egl* 構造遺伝子はシグナル配列を取り除いた成熟 EGL のものを用いることとし、*T. reesei* QM9414 株の cDNA を鋳型とした PCR 増幅によって取得した。増幅産物を tac プロモーターまたは T7 プロモーター下流に配置した 3 種類のプラスミドを作成した。得られたプラスミドを用いて 5 種類の大腸菌を形質転換した。

大腸菌形質転換体を液体培地で IPTG を添加して培養した後、菌体破砕液について CMCase 活性を測定した結果、tac プロモーター使用の高コピー数プラスミドと大腸菌 JM109 株の組合せで最大活性 56mU/mL-culture を得た。しかし、この条件下で EGL は正常な折り畳みがなされた活性型が少なく、大量の封入体を形成していた。封入体を可溶化・再生する条件を検討したところ、尿素で可溶化した後に尿素濃度を低下させリフォールディングさせることによって、524mU/mL-culture の活性を得ることができた。

1) 多田ら、1996 年度日本農芸化学会講演要旨集 p141

Expression of a low molecular mass endoglucanase (EGL) of *Trichoderma reesei* in *Escherichia coli*

○Kazuki Mori, Kouji Tada, Hiromichi Kumagai, Masahiro Nogawa,
Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa
(Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. technol., Asahi glass)

【Key Words】 *Trichoderma reesei*, *Escherichia coli*, endoglucanase, expression