

157

*Aspergillus ficuum* K5株に由来するフィターゼの*Pichia*酵母でのクローニングと細胞外生産

(岡山理大・工・応化) ○大谷 賢次、鑑 正喜、滝澤 昇、浄原 法蔵

【目的】家畜飼料である大豆粕やトウモロコシ中にはフィチンとしてリンが多量に貯えられているが、豚や家禽はフィチン体リンを分解利用することができない。フィチン体リンの利用効率を高めることは家畜から排出物中のリンに起因する環境汚染の改善に役立つと考えられる。その方法の1つとして、飼料に加水分解酵素フィターゼを添加することでフィチン体リンが有効に家畜に利用されることが示されている。フィターゼの代表的な生産菌株としては、*Aspergillus niger*, *A. ficuum*, *A. niger* var. *awamori* 等が挙げられるが、なかでも*A. ficuum* K5株がフィチン酸分解に強い活性を持つ。本研究では*A. ficuum* K5株におけるフィターゼ遺伝子を酵母*Pichia*に導入することでフィターゼの培養液中への分泌生産を目的とした。

【方法および結果】*A. ficuum* K5株のフィターゼ遺伝子(PhyA)は、二ヶ所のエキソン(49bp, 1369bp)と一ヶ所のイントロン(109bp)より形成され、シグナル配列と構造遺伝子を持つ。今回、イントロンが削除されたフィターゼ遺伝子をPCRで作製し、*Pichia*を宿主とするベクターでシグナル配列を持つpPIC9に組み込み、組換えプラスミドpHST9を作成した。このpHST9で酵母*Pichia pastoris* GS115株に形質転換しST9株を作成した。このST9株はフィターゼを培養液中に分泌生産した。現在、このST9株より生産されるフィターゼについての諸性質を検討し、その精製を行っている。

Cloning of the pyrase gene of *Aspergillus ficuum* K5

in *Pichia pastoris* and extracellular production of the recombinant enzyme

○Kenji Ootani, Masaki Abumi, Noboru Takizawa, Hohzoh Kiyohara

(Dept. Appl. Chem., Okayama Univ. Sci.)

【Key words】*Aspergillus ficuum* K5, *Pichia pastoris*, フィターゼ, 分泌生産

158

*Rhodococcus* sp. PN1株の4-ニトロフェノール酸化酵素遺伝子のクローニングと塩基配列の解析

(姫路工大・工・応化)

○阿部由克、新原さなえ、深津哲也、武尾正弘、根来誠司

【目的】*Rhodococcus* sp. PN1株は4-ニトロフェノール(4-NP)及びフェノールで誘導される2種の酸化経路で4-NP及び3-ニトロフェノール(3-NP)をそれぞれ分解できる。これらの経路には、ニトロフェノール類を酸化し得る酵素が複数存在するため、代謝物の分析だけでは完全な酸化経路の同定が難しい。本研究では、この2種の酸化経路の詳細を理解するために、PN1株から4-NP及び3-NPの初期酸化に関与する遺伝子群のクローニングを行い、それらの遺伝子の解析を行ったので報告する。

【方法及び結果】PN1株から抽出した全DNAを制限酵素*Pst*Iで消化し、同酵素で消化した*Rhodococcus-E. coli*シャトルベクターpK4と結合させ、PN1株の遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーをエレクトロポレーション法により、*Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674株へ導入したところ、約5000個のコロニーが得られた。これらのうちの2株は3-NPを含む寒天培地上で褐色がかったオレンジ色の物質を蓄積した。この2株を用いて、4-NP及び3-NP分解試験を行ったところ、両者とも4-NP及び3-NPをほぼ化学量論的に4-ニトロカテコールに変換できることがわかった。組換えプラスミドの制限酵素分析により、両者には異なるフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子がクローン化された可能性が示唆された。現在、この2種類の遺伝子の塩基配列の解析を進めている。

Cloning and sequencing of 4-nitrophenol oxygenase genes of *Rhodococcus* sp. PN1.

○Yoshikatsu Abe, Sanae Niihara, Tetsuya Fukatsu, Masahiro Takeo, Seiji Negoro

(Dept. Appl. Chem., Himeji Institute of Technol.)

【Key Words】4-nitrophenol, *Rhodococcus*, oxygenase, cloning, sequencing