

3F10-3 シイタケ EST データベースの構築

水津 拓三、松田 英幸、○川向 誠
(島根大生資科・生命工)

【目的】シイタケ (*Lentinus edodes*) は担子菌類に属し、酵母等と近縁種である。食用キノコとしても日本人である我々に非常になじみ深いシイタケはこれまでに抗ガン物質や難分解性物質分解酵素など注目すべき有用物質を含む事が知られてきた。我々はこれまでにシイタケ由来のアデニル酸シクラゼ結合タンパク質 CAP やそれに結合する 14-3-3 遺伝子の解析などを行ってきた。しかしながらまだまだ個々の遺伝子の解析は他の生物種に比べるとあまり進んでいないのが現状である。そこで我々は cDNA ライブラリーを作製し、そこに含まれる各遺伝子の網羅的な部分配列の取得を目的とした。

【方法・結果】シイタケの一株菌糸由来の cDNA を作製し、酵母ツーハイブリッド用ベクターに組み込んだライブラリーについてランダムに配列決定を行い、それを EST (Expressed Sequence Tag) データベースとした。最も頻繁に取得された遺伝子はハイドロフォービンをコードしているクローンであった。その他、代謝酵素類、リボゾームタンパク質類、ユビキチン関連タンパク質、低分子量 G タンパク質などに相同性が認められる遺伝子 172 個を含む計 746 個のシイタケ EST を構築し、さらに継続して行っている。

Construction of EST database of *L. edodes*

Takumi Suizu, Hideyuki Matsuda, ○ Makoto Kawamukai
(Life & Env. Sci., Shimane Univ.)

Key words Lentinus edodes, EST, Data base, 担子菌

3F10-5 異なる触媒ドメインをもつキメラセルラーゼの構築

○戸田 弘¹、桃沢 幸絵¹、長畑 直樹¹、高田 悟史¹、
天野 良彦²、下坂 誠¹、神田 鷹久²、岡崎 光雄¹
(¹ 信州大繊維・応生科、² 信州大工・物質)

【目的】植物バイオマスの有効利用の観点から担子菌 *Irpex lacteus* の各種セルラーゼ遺伝子の単離解析、異種宿主での発現系の構築を行ってきた。これまでに、糖質加水分解酵素 Family 7 に属する cellobiohydrolase (Ex-1)、Family 5 に属する endoglucanase (En-1)、Family 6 に属するエキソ型セルラーゼ (Ex-3) の遺伝子を単離した。しかし、これらの酵素単独での分解能力は工業的利用という観点から十分なものとは言えず、活性の強化が求められる。そこでこれらの酵素が自然界において互いに相乗的に働くことに着目し、単一分子内に異なる触媒ドメインを持つキメラ酵素の作成を試みた。

【方法と結果】Ex-1 および En-1 の構造遺伝子を *Aspergillus oryzae* 用発現ベクター pNAN-8142 にクローニングし、形質転換を行った。目的酵素の発現を活性測定と SDS-PAGE でのタンパク分析により確認できた。さらに二種類のセルラーゼ (Ex-1, En-1) の触媒ドメインおよびセルロース結合ドメイン (CBD) の遺伝子領域を、それぞれ PCR 増幅するとともに、N 末端、C 末端に制限酵素のサイトを付加した。各ドメインを種々の組み合わせで連結し、異種宿主での発現を試みた。

Construction of chimeric cellulase with different catalytic domains

○ Hiroshi Toda¹, Yukie Kabasawa¹, Naoki Nagahata¹, Satoshi Takada¹, Yoshihiko Amano², Makoto Shimosaka¹, Takahisa Kanda², Mitsuo Okazaki¹
(¹Dept. Applied Biol., Shinshu Univ., ²Dept. Chem. & Mat. Engn., Shinshu Univ.)

Key words cellulase, chimeric enzyme, *Irpex lacteus*, cellobiohydrolase, endoglucanase

3F10-4 クロロウイルスによる希少糖フコースの生成

○磯野 陽一、川崎 健、藤江 誠、宇佐美 昭二、山田 隆
(広島大院先端・生命機能)

【目的】クロロウイルスは 330kbp ~ 380kbp の直鎖状 dsDNA をゲノムとしており、ウイルスとしては最大級の大きさである。近年、ゾウリムシ共生藻ウイルス PBCV-1 のゲノムプロジェクトが終了し、600 種を超える ORF の存在が推定されている。それらの中に希少糖フコースの合成に関与すると思われる 2 つの遺伝子の存在が確認された。ウイルスがフコース合成遺伝子を持つことは極めて異例であり、この役割及び機能に興味を持たれる。本研究ではクロロウイルスがコードしているこれらの遺伝子の構造・発現解析、大腸菌、酵母への導入、そしてフコース生成の解析等を行った。

【方法・結果】PBCV-1 および CVK2 から PCR 法によってフコース合成遺伝子 GDP-D-mannose 4,6-dehydratase (GMD) と GDP-L-fucose synthase (GFS) をクローニングし、シークエンス解析によって両ウイルス遺伝子を比較した。GMD については 88%、GFS は 99% の塩基配列相同性が見られた。これらの遺伝子がさらに多種のクロロウイルス間で高度に保存されているかをゲノムサザン法で調べた。そして Northern blot 法によって両遺伝子がウイルス感染後期に発現していることを確認した。これらの遺伝子がコードしている酵素の活性を確認するために、大腸菌を用いた発現用ベクターによる組換えタンパク質の作製を行った。生成タンパク質は APAD[®] を用いた吸光度変化による酵素活性測定法で高度な活性を示した。

Fucose production with two enzymes encoded by chloroviruses

○ Yoichi Isono, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Shoji Usami, Takashi Yamada
(Dept. Mol. Biotechnol. ADSM, Hiroshima Univ.)

Key words chlorovirus, GDP-L-fucose, GMD, GFS

3F11-1 *Ralstonia eutropha* の新規細胞内 poly-3-hydroxybutyrate 分解酵素

○内野 圭一¹、小林 照幸²、齊藤 光實²
(¹ 神奈川大院・理・生物、² 神奈川大・理・生物)

【目的】poly-3-hydroxybutyrate (PHB) は、様々な微生物が蓄積する細胞内貯蔵物質である。PHB の合成と細胞外での分解に関しては、広範な研究が為されているが、細胞内での分解については、まだ不明な点が多い。PHB を蓄積する細菌 *Ralstonia eutropha* の細胞内の PHB 分解酵素が既にクローニングされているが、その変異株でも PHB の分解が起こるため、この他にも、分解酵素が存在すると考えられてきた。本研究では、*R. eutropha* の新規細胞内 PHB 分解酵素遺伝子をクローニングし、その発現産物の性質を調べた。

【方法と結果】*R. eutropha* と同属の細菌 *Ralstonia solanacealum* でゲノムプロジェクトが行われ、その配列が発表された。その中で加水分解酵素と推定された配列と、細胞外の PHB を分解する細菌 *Acidovorax* sp. SA1 の細胞内の酵素の遺伝子との間に類似性が見られた。そこで、両者の配列を元にプライマーを設計し、*R. eutropha* ゲノム中にこの配列が含まれることを、PCR、およびサザンハイブリダイゼーションで確認した。次に、コロニーハイブリダイゼーションを行い、約 3.5 kbp の DNA をクローニングした。その配列中に、加水分解酵素と推定された配列と非常に近い配列を持つ ORF の存在を確認した。この ORF は、約 36 kDa のタンパク質をコードしていて、大腸菌を用いて発現させたところ、その細胞破碎液に PHB 分解活性が確認された。本研究により新たな PHB 分解酵素の存在が確認されたが、細胞内での役割は不明であり、現在検討中である。

Novel intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Ralstonia eutropha*

○ Keiichi Uchino¹, Teruyuki Kobayashi², Terumi Saito²
(¹Grad. Sch. Sci., Kanagawa Univ., ²Dept. Bio. Sci., Kanagawa Univ.)

Key words poly-3-hydroxybutyrate, intracellular PHB depolymerase, *Ralstonia eutropha*