

141 *Pseudomonas aeruginosa* のプロモーターのクローニングとその *E. coli* と *P. putida* での発現

(工技院・微工研, アサヒビール中央研*) °細矢博行, 大竹康之*, 古川謙介

1. 目的 我々は *Pseudomonas* 属細菌の遺伝子構造の解明をめぐりて、*E. coli* の lactose operon を利用したプロモーター検出用ベクター pOH211, pOH130 (pAB211, pAB130 を改める) の作成¹⁾と、*E. coli* のプロモーターの *P. aeruginosa* での発現²⁾について既に報告した。今回は pOH211 を利用して *P. aeruginosa* の染色体からプロモーター活性を持つ DNA 断片をクローニングし、*E. coli* と *P. putida* へ形質転換してその活性を比較したので、その結果を報告する。

2. 方法 ①使用菌株: *P. aeruginosa* PAO38 (leu), *E. coli* JM101 (Δlac pro thi supE), *P. putida* AC10 (met). プロモーター検出ベクター pOH211 (Δlac Sm^r 17.8 kb, クローニング部位 BamHI). ③形質転換法: *E. coli* は CaCl₂ 法。 *P. aeruginosa* は既に報告した³⁾。 *P. putida* は Bagdasarian らの方法を用いた。④プロモーターを含む recombinant の選抜: M9 培地に Xgal 50 μg/ml を加え、Lac⁺ の青色のコロニーとして選抜した。⑤β-galactosidase 活性の測定: Miller らの方法によって測定し、OD₆₀₀ あたりの unit で活性を示した。

3. 結果 ①BamHI 消化した PAO38 染色体 DNA を用いて、PAO38 内でプロモーター活性のある 71 株のコロニーを得た。②得られた recombinant の β-galactosidase 活性は、1~2600 units であった。

③挿入された DNA の大きさは 1~10 kb であった。④ *P. aeruginosa* で 100 units 以上の β-galactosidase 活性を持つ recombinant DNA を用いて、*P. putida* と *E. coli* へ形質転換した。Lac⁻ の *P. putida* は Lac⁺ となったが、*E. coli* では Lac⁺ になる recombinant DNA とならない recombinant DNA があった。

1) 大竹ら, 日本農芸化学会 昭和59年大会要旨集 P435 2) 細矢ら, 日本農芸化学会 昭和59年大会要旨集 P435 3) 細矢ら, 日本醗酵工学会 昭和58年大会要旨集 P69.

Cloning of promoters in *Pseudomonas aeruginosa* and their expression in *E. coli* and *P. putida*.

°Hiroyuki Hosoya, Yasuyuki Ohtake* and Kensuke Furukawa (Fermentation Research Institute, Yatabe-higashi, Tsukubagun, Ibaraki 305, *Central Research Laboratories, Asahi Breweries LTD, Ohmori-kita, Ohta-ku, Tokyo 143)

142 ビアラホス生合成遺伝子のクローニングとクラスター構造の解析 (明治製菓・薬品研・薬南研, Biogen SA) 村上健・安西弘行・今井敏・風早知之 伊藤玲子・松永美保子・佐藤愛理子・佐藤篤行・長岡行蔵, C.J. Thompson**

目的) ビアラホス生産放線菌 (*S. hygroscopicus* SF1293) の分子育種をめぐりて、生合成遺伝子をクローン化する。次に、これらの遺伝子の染色体上での配置、及び、組み換え体プラスミドを保有する生産菌の性状を明らかにし、放線菌での、二次代謝産物生合成遺伝子の発現制御機構を解明することを目的とした。

方法及び結果) 生合成経路は、瀬戸¹⁾、今井等²⁾によって解明されている。今回、二種の異なるタイプの生合成欠損株を宿主に用い、pIJ702 をベクターとし、生産能を回復させる DNA 断片を、ショットガンクローニングした。得られたプラスミド pMSB2-4 (9.2kb) 及び、pMSB12-1 (15.6kb) は、宿主株だけでなく、他の生合成欠損株も中広く生産回復させた。サブクローニングの結果、pMSB2-4 には、生合成の初期反応に関与する三種の遺伝子、pMSB12-1 には、生合成後半の四種の遺伝子、さらに自己耐性遺伝子が、クラスター構造をなしていた。次に、pMSB2-4 と pMSB12-1 にクローン化された二種の DNA 断片の、染色体上に於ける位置関係も調べた。*E. coli* LE392 に、*S. hygroscopicus* DNA のコスミドライブラリーを作り、これに、pMSB2-4 と pMSB12-1 をハイブリダイズさせた。その結果、両プローブとも、同一のコスミドにハイブリダイズし、二種の DNA 断片が、染色体上で互いに近接している事を確認できた。この事は、ビアラホス生合成遺伝子が、クラスターとして存在する事を示している。考察) ビアラホスは、ホスホエノールピルビン酸から、十数ステップで生合成される殺菌活性物質であるが、コスミド (pMSB13-3) に、生合成遺伝子の大部分をクローン化できたと考える。1) H. Seto, et. al. BBRC 111, 1008 (1983). 2) S. Imai, et. al. J. Antibiotics (in press)

Cloning of the Bialaphos production gene cluster of *S. hygroscopicus* SF-1293

Takeshi Murakami, Hiroyuki Anzai, Satoshi Imai*, Tomoyuki Kazahaya*, Reiko Ito, Mihoko Matsunaga*, Eriko Sato, Atsuyuki Satoh*, Kozo Nagaoka, Charles J. Thompson** (Pharmaceutical Research Laboratories, Pharmaceutical Development Laboratories*, Meiji Seika Kaisha Ltd, Biogen S.A.**)