

78 微生物

- 278 *Trigonopsis* 属酵母のD-アミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングと
7-アミノセファロsporin酸製造プロセスへの応用
(旭化成) 杉浦弘吉・松田昭生・山本敬三・小松謙一

1) 目的 *Trigonopsis variabilis* の産生するD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)はセファロsporin C (Ceph C) のD-アミノアジピン酸側鎖を酸化し、グルタリル-7-アミノセファロsporin酸(GL-7ACA)を生産させることが知られており、GL-7ACAアジラーゼとの共同によるCeph Cから7ACAへの交換プロセスへの応用が期待されている。我々はDAO遺伝子をクローニングし、*E. coli* 中で発現させることにより、すでにクローニング済みのGL-7ACAアジラーゼとの共有下にCeph Cから7ACAを効率よく生産させることを試みた。

2) 方法 DAO遺伝子のクローニングは酵素蛋白のN末アミノ酸配列より合成されたDNAプローブを用いて行われ、pUC18-*Trigonopsis* DNAライブラリーをスクリーニングした。塩基配列はジデオキシ法によった。セファロsporin系化合物の定量はHPLCを用いて行われた。

3) 結果 (1) DNAライブラリーから2個のクローンが得られ、塩基配列を決定した結果、38bpのイントロン様配列を有する56アミノ酸に相当する読取り枠が存在し、酵素蛋白のアミノ酸配列、SDS-PAGEによる分子量とよく一致した。(2) 5'上流域とイントロン様配列を切除したクローン断片をlac Oプロモーターに連結したところ、*E. coli* 中でDAOが着量生成した。(3) β -ラクタマーゼとカタラーゼを欠損した*E. coli* を宿主としてDAOとGL-7ACAアジラーゼを個別に発現させ、両クローンの細胞破砕液を混合してCeph Cと反応させると、80%の転換率で7ACAが生産した。

Cloning of a α -Amino acid Oxidase Gene from *Trigonopsis variabilis* and its Application to the 7-Amino cephalosporanic acid Production.

Hiroyoshi Sugiura, Akio Matsuda, Keizo Yamamoto, and Ken-ichi Komatsu (Pharmaceutical Research and Development Department, Asahi Chemical Industry CO., LTD.)

- 279 酵母の凝集性を支配する遺伝子のクローニング
(サッポロビール・中研) 渡 淳二・小川雅裕・高田善浩・西川紀男・鎌田耕造

(目的) 酵母 *S. cerevisiae* の凝集機構について遺伝子レベルでの解明をのぞき、凝集性を支配する遺伝子のクローニングを試みた。その結果得られた、凝集性を示す遺伝子のひとつについて、その発現様式、染色体上での存在位置等を検討し、さらに本遺伝子を導入することにより凝集性を付与した酵母の細胞表面の構造変化をSDS-PAGEで解析した。

(方法) 凝集性酵母 *S. cerevisiae* ABXL-1D (a *FLO1*) の染色体DNAのSau 3AI部分消化断片をYE_p13のBam HI部位に挿入してgene libraryを作成した。非凝集性酵母 *S. cerevisiae* AH22 (a *his4 leu2*) に上記gene libraryをリチウム法で形質転換し、得られた形質転換体をmicroplate中で液体培養した後、そのままmicroplate-mixerで振とうして凝集性クローンの検索を行なった。

(結果) AH22の形質転換体約1万クローンを検索したところ、plasmid支配性の凝集性クローン1株が得られた。本plasmid挿入断片のうち、凝集性を示すDNA部位が6.6kbのBam II断片に存在していた。 α -chymotrypsin処理や熱処理(70°C, 3hr)に対する凝集性の変動から、本遺伝子の示す凝集性は凝集性遺伝子 *FLO1* の示すものに類似していた。しかし、本遺伝子は細胞内にmulti-copy (YE_p type) 存在するときのみ凝集性を示し、single-copy (YC_p type) では凝集性を示さなかった。また、OFAGE-Southern hybridizationの結果から本遺伝子は酵母第VIIあるいは、第XV染色体上に存在することが示され、第I染色体上にある *FLO1* ではないことが判明した。さらに、本遺伝子を導入して凝集性を付与した株と親株との β -mercaptoethanol抽出により細胞表面から溶出するタンパク質のSDS-PAGEを比較したところ、分子量約13kのポリペプチドの量が凝集性を付与した株では増加していることが観察された。

Cloning of a gene controlling yeast flocculence.

Junji Watari, Masahiro Ogawa, Yoshihiro Takata, Norio Nishikawa and Kōzō Kamada.

(Research & Development Laboratories, Sapporo Breweries Ltd., Yaizu-shi, Shizuoka 425)