

キシロシダーゼ遺伝子 *xynB* のシーケ
エンスの解明および酵母における発現

(阪大・工・醸酵) 〇許 衛忠、島 康文、卜部 格、岡田弘輔

1) 目的: 当研究室では *Bacillus pumilus* IP0株由来の xylanase, β -xylosidase 両遺伝子を酵母に導入し、xylanに対する高効率のアルコール醗酵菌の育種を目的として、研究を行っている。本研究では、特に β -xylosidase 遺伝子について検討した。

2) 方法及び結果: *Bacillus pumilus* IP0 株由来の β -xylosidase 遺伝子 *xynB* は dideoxy法で塩基配列を決定し、構造遺伝子は535アミノ酸からなることがわかった。*xynB* 遺伝子を酵母で発現するため、酵母の GAP(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子 promoter を使用した。GAP promoter と *xynB* 遺伝子を連結するため、promoter 下流の *EcoRI* site の近くに開始コドン ATG を置き、それに続いて、 β -xylosidase の N 末端の AAG(Lys) が位置する様に linker を作成した。この linker は *EcoRI* site から *HgiAI* site (β -xylosidase の N 末端より6アミノ酸下流) までの配列(30mer)を含むものである。GAP promoter、linker の下流に *HgiAI* より C 末側の *xynB* 断片を連結した後、酵母-大腸菌シャトルベクターに挿入した。得られた plasmid pYXB で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NA87-11A(h) を形質転換した。pYXB 保持菌について細胞抽出液での β -xylosidase 活性を測定したところ、0.3U/mg protein の β -xylosidase が生産されていることが分かった。粗酵素液を SDS-PAGE で分析すると、*B. pumilus* IP0 由来の大腸菌に clone した β -xylosidase と同じ位置にバンドが認められた。

sequencing the gene of β -xylosidase, *xynB*, and expression it in yeast

〇Weizhong Xu, Yasufumi Shima, Itaru Urabe, Hirosuke Okada (Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565)

Bacillus オリゴ-1,6-グルコシダーゼの構造と耐熱性の解析
～*Bacillus cereus* ATCC7064 の酵素の1次構造～

(京都府大・農化) 渡部邦彦、〇北村和久、伊波英克、鈴木 譲

【目的】酵素蛋白質の耐熱化の機構は様々な解釈がなされている。当研究室で *Bacillus* 属5種菌株のオリゴ-1,6-グルコシダーゼの耐熱性とプロリン含量の間に正の相関性が存在することが発見された¹⁾。この結果を基に酵素耐熱化に関する”プロリン説”が提案された²⁾。今回は、中温菌 *B. cereus* ATCC7064 由来のオリゴ-1,6-グルコシダーゼ遺伝子の大腸菌でのクローン化、遺伝子の全塩基配列の決定、酵素の1次構造を解明し、上記の仮説を検証しようとした。【方法】酵素遺伝子は、ショットガン法により得られた約2.8kbのDNA断片として pUC119 上にクローン化した。DNA塩基配列はジデオキシ法で決定した。【結果】酵素遺伝子より大腸菌で発現された酵素は、元菌株由来の酵素と、分子量、耐熱性、至適温度、抗原性を含む性質等で完全に一致した。酵素のN末端側10残基のアミノ酸配列に対応する酵素遺伝子のオープンリーディングフレームを単離DNA断片内に見出した。塩基配列より決定した酵素のアミノ酸組成は、元菌株酵素のものとよく相応した。絶対好熱菌 *B. thermoglucosidasius* KP1006 の相同酵素³⁾ は、*B. cereus* の酵素と72%のアミノ酸配列の相同性を示した。両酵素の諸性質は近似しているが30℃にも及ぶ耐熱性の差異がみられる。プロリンの出現頻度も耐熱性の上昇と共に増大している。中温菌酵素のプロリン残基はほとんど好熱菌酵素内で保存され、コイルまたはターン構造内に出現している。好熱菌酵素でのプロリン残基の新たな出現部位は、多くはターン構造内に存在した。1) Appl. Micro. Biotechnol. 26, 546 (1987) 2) 化学と生物, 26, 70 (1988), Proc. Japan Acad. Ser. B, 65 (1989) (in press) 3) J. Bacteriol. 171, 1219 (1989), 日本農芸化学会'89年度大会講演要旨集 p371

Structure and thermostability analyses of *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases
～Primary structure of oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC7064
Kunihiko Watanabe, Kazuhisa Kitamura, Hidekatsu Iha and Yuzuru Suzuki
Dept. of Agric. Chem., Kyoto Pref. Univ.