

24 微生物

- 146 好アルカリ性 *Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼ遺伝子の
クローニング (大阪府産技総研) ○増井昭彦、藤原信明
(阪大・工・醸酵) 高木昌宏、今中忠行

1) 目的 好アルカリ性 *Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼは、使用済みフィルムからの銀回収に用いられている工業的に有用な酵素であるが¹⁻³⁾、その優れたゼラチン分解力を変えることなく耐熱性を付与できれば、更にその有用性は高まるものと考えられる。そこで本研究では、中性プロテアーゼの高度耐熱化戦略を基に⁴⁾、アルカリプロテアーゼの耐熱化を図ることを目的に、まず本酵素の構造遺伝子のクローニングを行った。

2) 方法及び結果 アルカリプロテアーゼ構造遺伝子のクローニングは、*Bacillus* sp. B21-2染色体(約6 μ g)を供与DNA、プラスミドpTB523(約3 μ g)をベクターとして制限酵素EcoRIを用いたショットガン法により、*B. subtilis* DB104株 (npr⁻ apr⁻)を宿主として行った。アルカリプロテアーゼ生産性の検定は、乳製カゼイン1%を含む培地におけるコロニー周辺の白いハローの形成を指標として行った。その結果、形質転換体約10,000株中一株のプロテアーゼ生産性を示す株が得られ、その株は、プラスミドpTB523のEcoRI切断部位に5.7kbpの断片が挿入されたものであった。さらに制限酵素地図作製後のサブクローニングを行ったところ、2.4kbpの断片がプラスミドpTB522のHindIII切断部位に挿入された小型プラスミドが得られた。現在、この断片の塩基配列決定を行っている。

1) Fujiwara et al., J. Ferment. Technol., 65, 345 (1987), 2) 藤原ら、醸酵工学会誌, 65, 531 (1987), 3) Fujiwara et al., Process Biochemistry, 24, 155 (1989), 4) Imanaka et al., Nature, 324, 695 (1986)

Cloning of the Alkaline Protease Gene from Alkalophilic *Bacillus* sp. B21-2
O.A. Masui, N. Fujiwara, M. Takagi*, T. Imanaka* (Osaka Prefectural Industrial
Technology Research Institute and *Dept. of Fermentation Technology, Faculty
of Engineering, Osaka Univ.)

- 147 *Enterobacter aerogenes*のトリプトファン⁻遺伝子のクローニング
(北大・農化) ○川崎公誠、小林智佐*、吉川修司、老田 茂**、横田 篤、
高尾彰一***、富田房男(現・味の素(株))、**農水省食総研、***酪農大)

1. 【目的】先に我々はトリプトファン⁻を用いるトリプトファン生産について、基質の一つであるピルヒン酸をトリプトファン⁻生産菌により生産し、この培養液に直接その他の基質であるインドールとアンモニアを添加してトリプトファンを得る新しいプロセスを開発した。¹⁾ しかしこのために育種したピルヒン酸高生産株 *E. aerogenes* LT-94では、高い菌体内ピルヒン酸濃度によってトリプトファン⁻の誘導が抑制され、トリプトファン収量が十分高まらないことが分かった。²⁾ そこで本菌のトリプトファン⁻の発現調節機構を解明することを目的に、トリプトファン⁻遺伝子(*tna⁺*)をクローニングし解析した。

2. 【方法・結果】 *E. aerogenes* SM-18株の染色体DNAからMuを用いてRP4へ*tna⁺*を組み込み、*E. coli* C800株由来の*tna⁻*株へ接合伝達して*tna⁺*を含む約30Kbの挿入断片を有するプラスミドpRMT33を得た。このプラスミドからpUC19ベクター上に5.4kbのDNA断片として*tna⁺*をサブクローニングし、pUCT401を得た。本挿入断片の制限酵素地図を作成したところ、既に報告されている *E. coli* K-12株³⁾ や、*Alcaligenes faecalis*⁴⁾ の*tna⁺*とは異なることが分かった。次に制限酵素地図をもとにプラスミドの小型化を行い、4.6および3.8kbの挿入断片を有するプラスミドpUCT412、413を構築した。pUCT412の挿入DNA断片はSM-18株の染色体DNAとハイブリダイズすることから、SM-18株由来であることが確かめられた。現在、プラスミドの小型化と活性発現の調節について検討中である。1) *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2037 (1989) 2) *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 256 (1990) 3) *J. Bacteriol.*, 147, 787 (1981) 4) *J. Biotechnol.*, 5, 17 (1987).

Cloning of tryptophanase gene in *Enterobacter aerogenes*.

*Kosei Kawasaki, Chisa Kobayashi, Syuji Yoshikawa, Shigeru Oita, Atsushi Yokota, Shoichi Takao, Fusao Tomita. Dept. of Agricultural Chemistry, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.