

325

B. amyloliquefaciens の産生する環状ペプチド分解性プロテアーゼ遺伝子のクローニング
(阪大・工・応生) ○前田拓也、今中忠行

1) 目的 一般にプロテアーゼは、ポリペプチドや直鎖状の低分子ペプチドに対して加水分解活性をもつが、その多くは環状ペプチドには作用しない。特殊な立体構造をもつ環状ペプチドに作用するプロテアーゼは、蛋白質工学的にもペプチド合成の立場からも大変興味深い。このようなプロテアーゼとしては、ナガーゼや演者らが単離した Lactobacillus sp. No.1 株由来プロテアーゼ¹⁾ がある。本研究では、これらのプロテアーゼ遺伝子の構造解析を目的として、まずナガーゼ生産菌のプロテアーゼ遺伝子のクローニングを行った。

2) 方法および結果 クローニングは、B. amyloliquefaciens の染色体を Sau3AI 部分消化後、当研究室で開発された温度制御可能な発現ベクター pISA'412 の BamHI site に連結し、宿主 B. subtilis DB104 株 (Apr⁻, Npr⁻) にコンピテントセル法にて導入することにより行った。プロテアーゼ生産株の選択は、1% 乳製カゼインを含む培地上でのコロニー周囲の白色ハローの形成を指標とした。その結果、約 12,000 株の形質転換体の中から 7 株の候補株が得られ、そのうちの 2 株の産生するプロテアーゼはともに分子量約 31,000 で、HPLC により環状ペプチド gramicidin S を分解することが確認された。また、これらの株がもつベクターには、ともに約 4.2 kb の DNA 断片が挿入されており、同一の遺伝子がコードされているものと考えられた。この断片の領域限定を行い制限酵素地図を作製したところ、報告されているナガーゼのもの²⁾ と異なっていた。現在、この断片の塩基配列を決定中である。

1) 前田ら、平成2年度日本醗酵工学会大会要旨 P204

2) Wells et al., Nucl. Acids Res., 11, 7911 (1983)

Cloning of the protease gene from B. amyloliquefaciens

○Takuya Naeda and Tadayuki Imanaka

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University

326

好熱菌 Bacillus stearothermophilus SIC1 由来 スーパーオキシドジスムターゼ
遺伝子のクローニング
(阪大・工・応用生物) ○松村吉信、上田 真、今中忠行

[目的] 好気条件下で生育する生物にとって、酸素は ATP を効率良く生産する上で非常に重要な気体である。その反面、副産物として生成される活性酸素は細胞に障害を与える。特に高温好気条件下で生育する細菌では、活性酸素が活発に生成されていると考えられる。そこで我々は好気性好熱菌 B. stearothermophilus SIC1 の酸素耐性機構を解明するために、細胞内で初期段階に生成される活性酸素である O_2^- を除去する酵素である manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 遺伝子のクローニングを行った。

[方法及び結果] B. stearothermophilus SIC1 染色体 DNA を鋳型、大腸菌 Mn-SOD、Fe-SOD 及び B. stearothermophilus ATCC 12980 由来 Mn-SOD のアミノ酸配列の相同性から合成したオリゴヌクレオチドをプローブとし、PCR 法を行った。この方法で増幅された DNA 断片をプローブとし、大腸菌内で作成した B. stearothermophilus SIC1 染色体ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法を用いてポジティブクローンの取得を試みた。その結果 pBR322 に約 3.8 kb PstI 断片が挿入された組換えプラスミド pBRSOD38 を取得することができた。更に、上記の PCR 法を用いて領域限定を行った後、その塩基配列を決定した。断片中には 648 bp (216 アミノ酸) からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、その上流には SD 配列及びプロモーター領域と推測される配列が存在した。ORF から推定されるアミノ酸配列と大腸菌及び B. stearothermophilus ATCC 12980 由来 Mn-SOD とのアミノ酸配列を比較した結果それぞれ 40.8%、48.0% の相同性が認められた。これらの事からこの ORF が B. stearothermophilus SIC1 由来 Mn-SOD 構造遺伝子であると考えられる。

Cloning of manganese superoxide dismutase gene from Bacillus stearothermophilus

○Yoshinobu Matsumura, Makoto Ueda, and Tadayuki Imanaka

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University