

344

PvuI 制限-修飾系遺伝子のクローニング

*桂木信裕、川上文清、岡 正則、前川宜彦 (東洋紡績・敦賀酵素工場)

1. 目的

PvuI は塩基配列 CGATCG を認識し、これを切断する制限酵素で遺伝子工学の分野で広く用いられている。我々は生産性の向上を目的として、本制限-修飾系遺伝子のクローニングを行った。

2. 方法

Proteus vulgaris ATCC 13315 の染色体 DNA を Sau3AI で部分分解後、プラスミド pUC19 の BamHI サイトに連結し、大腸菌 HB101 を形質転換した。目的株の選択は、72D'シソ耐性、組換えプラスミドの PvuI に対する抵抗性および PvuI 生産性により行った。

3. 結果

約40,000個の形質転換株の中から、PvuI に抵抗性を示すプラスミドを有し、PvuI 生産性を有する株が9株得られた。得られた組換え体はすべてpUC19 以外に約4KbのDNA断片を含むプラスミドを有した。本プラスミドをpPvuIRM7と命名し、その制限酵素地図を作成した。組換え体はP. vulgaris ATCC 13315 に比べて約10倍のPvuIを生産した。

また、組換えプラスミドのデレクションおよびサブクローニングの結果より、制限-修飾系遺伝子は、約3Kbの断片上に存在し、lacZ 遺伝子と同じ向きに修飾酵素遺伝子をはさんで制限酵素遺伝子が存在することが判明した。

Cloning of the PvuI restriction-modification system

*Nobuhiro Katsuragi, Bunsei Kawakami, Masanori Oka, and Yoshihiko Maekawa
(Tsuruga Enzyme Plant, Toyobo Co., Ltd., Toyo-chou, Tsuruga-shi, Fukui 914)

345

Brevibacterium flavum MJ233株由来アスパルターゼ遺伝子のクローニング

(三菱油化・筑波総研) O浅井 陽子、細金 真由美、小浜 恵子、小林 幹、
久留主 泰朗、湯川 英明

1. 目的

我々は従来より、標題菌を用いてフマル酸及びアンモニアからのL-アスパラギン酸の製造法について検討を行い、既に工業化している¹⁾²⁾。今回は遺伝子組換え技術を応用し、標題菌染色体DNAよりアスパルターゼ遺伝子をクローニングし、遺伝子増幅によるアスパルターゼ活性の増強について検討を行ったので報告する。

2. 方法及び結果

大腸菌K-12株由来のアスパルターゼ遺伝子(aspA)を含む1.7kbのDNA断片をプローブとし、標題菌染色体DNAについてサザンハイブリダイゼーション法による解析を行った結果、プローブDNAと強くハイブリダイズする約2.4kbのバンドが認められた。このDNA断片について、我々が既に報告している Brevibacterium 属由来のプラスミド安定分配遺伝子³⁾を保持するプラスミドベクター pCRY30 に連結し標題菌に導入した。組換え菌体内のアスパルターゼ比活性の向上が認められ、導入プラスミドは、アスパルターゼ遺伝子の脱落なく安定に保持されることが判明した。

[1] 日本農芸化学会誌, 61, (10), p98, 1987

[2] Process Biochem., 21, (4), p124, 1985

[3] Appl. Environ. Microbiol., 57, (3), p759, 1991

Cloning of the L-aspartase gene from Brevibacterium flavum MJ233

Yoko Asai, Mayumi Hosogane, Keiko Kohama, Miki Kobayashi, Yasuro Kurusu and Hideaki Yukawa
Tsukuba Research Center, Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.