

Cryptococcus flavus のカルボキシメチルセルラーゼをコードするcDNAのクローニングと大腸菌における発現 (1広島大・発酵工学、2福山大・生物工学)
崔志峰¹, 望月大資¹, 秦野琢之², 福井作蔵², 宮川都吉¹

(目的) 我々は、セルロースから直接エタノールを生産する Saccharomyces cerevisiae の分子遺伝学的手法による育種を行っている。これまでに Saccharomycopsis fibuligera 由来の β -グルコシダーゼ遺伝子で S. cerevisiae を形質転換することにより、セロビオースまたはセロオリゴ糖を唯一炭素源として増殖し、エタノールを生産する酵母の育種に成功している¹。この酵母に対し、さらにエンドグルカナーゼを導入する際の遺伝子供与体とするために、カルボキシメチルセルロース (CMC) を資化する酵母 (Cryptococcus flavus) を分離し、同菌が生産するカルボキシメチルセルラーゼ (CMCase) を精製してその性質を明らかにした²。同酵素のcDNAおよびゲノム遺伝子のクローニングとその解析を行った。

(方法・結果) C. flavus 培養液より精製したCMCaseを用いてうさぎを免疫し、抗体を得た。CMC 培地で培養した C. flavus mRNA から、発現ベクター入ZAPによりcDNAライブラリーを作成した。ライブラリーを抗体を用いてスクリーニングし、約5万個ブランクより3個のポジティブクローンを得た。入ZAP から *in vivo* での切り出しによりpBluescript 組み換えプラスミドを作成し、cDNAの塩基配列を決定した。N末端に分泌シグナルと予想される配列をもち、342個アミノ酸からなる蛋白質をコードするORFを見いだした。大腸菌でこの遺伝子からCMCaseが生産されることを酵素活性および抗体を用いたウエスタン・ブロッティングにより確認した。ゲノム遺伝子もクローン化しその塩基配列を決定した。

¹ M.Machida et al., Appl. Environ. Microbiol., 54, 3147-3155 (1988)

² T.Hatano et al. J. Fermentat. Bioeng., 71, 313-317 (1991)