

56 微生物

234 エタノール酸化性 *Brevibacterium flavum* の宿主・ベクター系の開発
(三菱油化・中研) 佐藤幸江, 小沢恵子, 田方和通, 久留生泰朗,
島津光伸, 湯川英明

目的) 我々はエタノール酸化性 *Brevibacterium flavum* MJ233 の特性を利用した *Cell Reusing Process* によるレアスバラギン酸, レリソ酸の生産について既に報告している⁽¹⁾⁽²⁾。組換え DNA 技術を利用し、本菌株の育種を目的としてプラスミドの検索, プロトプラススト形成条件及び再生条件について検討した。

方法) プラスミドの検索は、常法に従い *cleared-Lysate*, *Cscl-EtBr* 平衡密度勾配法にて行なった。プラスミドの除去は、アクリジンオレンジなどを用いて検討した。また薬剤耐性能は MIC 法により検討した。プロトプラススト形成は、ペニシリンなど細胞壁合成阻害剤で処理した後、リゾチームなど細胞壁溶解酵素を用いて検討した。またプロトプラスストの再生は生育菌数、生育状態を指標に、各種再生培地組成について検討した。

結果) *Brevibacterium flavum* MJ233 株中には、40kbp 以上のプラスミドが存在した。またプラスミドを脱落した MJ233-C 株と親株との間には、各種抗生物質に対する感受性の差異は認められなかった。本菌株は、他のコリネ型細菌と異なり、ペニシリン-リゾチームの系ではプロトプラスストは得にくく、アフロモペプテダーゼなどの存在下においてのみプロトプラスストが観察された。さらに培養時における炭素源の種類により、細胞壁溶解酵素に対する感受性が著しく異なった。また高張安定剤としては、*Sucrose*, *Sorbitol* などが有効であり、*disodium Succinate* は生育を極めて阻害した。再生率の向上には PVP, BSA などが有効であった。

(1) 湯川ら; 農化, 59, 279 (1985)

(2) H. Yukawa et al; *Process, Biochem.*, 21, 164 (1986)

Development of Host-Vector system in Ethanol Utilizing bacteria Brevibacterium flavum.

Y. Satou, K. Kohama, K. Shikata, Y. Kurusu, M. Shimazu and H. Yukawa

Central Research Laboratory Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.,

235 ストレプトマイシン生産菌における宿主・ベクター系の開発と利用(第9報)
Streptomycin 6-phosphotransferase 遺伝子と負の制御遺伝子の塩基配列
(阪大・エ・醗酵) 小嶋哲郎・左近聖之・今中忠行・合葉修一

1) 目的 我々は、既に *S. griseus* ATCC 10137 のストレプトマイシン (SM) 生合成及び耐性に関与する遺伝子群をセルフクローニングしている。今回は、これらの遺伝子の発現調節機構を調べるため、*strA* (streptomycin 6-phosphotransferase 遺伝子) とその近傍領域の DNA 塩基配列を決定すると共に、正の調節遺伝子 *strR* の外面的効果について検討した。

2) 方法 DNA sequencing の際の縮重現象は、Maxam-Gilbert 法ではシトシンのアミノ基置換、dideoxy 法では deoxy-7-deazaquanosine triphosphate の使用により解決できた。菌体外プロテアーゼ生産性の検定は、菌体をアガープラグで培養後、カゼイン含有のアッセイ板でハロ-形成能を調べることにより行った。

3) 結果 *strA* の発現に必須の約 1.5 kb *AluI*-*BamHI* 断片の塩基配列を決定した。上流域にプロモーター配列 2 カ所と SD 配列をもつ、307 アミノ酸残基から成る読取り枠が存在した。この読取り枠は、SDS-PAGE で測定した本酵素の分子量 34K とほぼ一致し、また Bibbらの解析法⁽³⁾で検索したタンパク質コード領域の特徴を示したことから *strA* であると結論した。一方、遺伝子を増幅すると SM 生産性と耐性を抑制する 0.7 kb *BamHI* 断片にも 114 アミノ酸残基から成る読取り枠 (*strN*) が存在した。*strN* は *strA* の一部と重複して相補鎖にコードされており、負の制御遺伝子として機能している可能性がある。さらに *strR* の変異株 SM196 (*Sm^r*, *Sm^s*) は菌体外プロテアーゼ生産能を消失していることが判明した。*strR* は *strA* と *strB* (amidinotransferase 遺伝子) を正に調節していることが判っており、より広範な制御が予想された。 1) *J. Bacteriol.* 164, 85-94 (1985) 2) *Gene*, 30, 157-166 (1984)

Application of Recombinant DNA Technology to a Streptomycin-Producing *Streptomyces* (Part 9) - Nucleotide Sequence of *strA* and Negative Regulatory Gene *strN*. Tetsuo Kojima, Kiyoyuki Sakon, Tadayuki Imanaka and Shuichi Aiba (Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University)