

## 18 微生物

- 134 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来シュークロース・ホスホリラーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現  
(キッコーマン 研究本部) °北尾 悟、古賀拓郎、中野衛一

(目的) シュークロース・ホスホリラーゼ (SPL) は、血中・尿中の無機リン定量用酵素として臨床検査試薬に用いられている。現在、乳酸菌 *L. mesenteroides* ATCC12291株より生産が行なわれているが、生産性等の問題点を解決する為にSPL遺伝子をクローニングし大腸菌内で大量発現させることを目的として本研究を開始した。

(方法) *L. mesenteroides*より染色体DNAを調製し、*EcoRI*及び*Sau3AI*消化物を各々pBR322へ挿入し遺伝子バンクを作製した。プローブとして精製SPL蛋白N末端6アミノ酸に対応する17mer24通りの合成DNAを用いてコロニーハイブリダイゼーションにより遺伝子の検索をおこなった。

(結果) 遺伝子バンクよりSPL遺伝子を含む3.0kbDNA断片を取得した。更にサブクローニングによりSPL発現に関与する領域を1.8kbまで限定し、この断片をpUC119に挿入してpSPL11を作製した。JM101(pSPL11)株において約20U/mlの活性値を示した。次にラムダ・ファージを利用したスリーパー・ベクター<sup>(1)</sup>による発現を試みた。SPL遺伝子が4コピー存在するDNA断片をベクターへ組み込み、大腸菌1100に溶原化した。溶原菌を培養して熱誘導(43℃15分間)後、32℃4時間でのSPL活性は約50U/mlを示し、この値はDNA供与菌の50倍以上の高活性であった。また、SPL発現に関与する1.8kb断片の塩基配列を決定したところ、精製SPL蛋白N末端30アミノ酸に対応するDNA配列を先頭に1470bpのORFが見い出された。

- 1) 中野; 蛋白質・核酸・酵素 Vol 32, No.9, 1133-1140 (1987)

Cloning and expression of the *Leuconostoc mesenteroides* ATCC12291 sucrose phosphorylase gene in *Escherichia coli*

° Satoshi Kitao, Takurou Koga and Eiichi Nakano

(Research and Development Division, Kikkoman Corporation)

- 135 乳酸菌 *Enterococcus faecalis*  $\beta$ -glucosidase 遺伝子の、大腸菌におけるクローニングと発現  
(早大・理工、\*ニッポンジーン)  
金山晋治\*・○森田健二・桐村光太郎・宇佐美昭次

1. 目的 乳酸菌における新規な宿主-ベクター系の確立、とくにその際のマーカーとなる遺伝子の単離を目的として、*Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* 由来の、 $\beta$ -glucosidase遺伝子の、*Escherichia coli* 内でのクローニングと発現を試みた。

2. 方法 *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* の全DNAを*EcoRI*で分解した後、pUC18の*EcoRI*部位に組込み、ampicillin耐性を指標として、*E. coli* JM109の形質転換を行った。 $\beta$ -glucosidase遺伝子を獲得した形質転換体は、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (X-glu) と isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) を含有する選択培地上で青色を呈したコロニーとして選択した。

3. 結果 *EcoRI*を用いたショットガンクローニングの結果、 $\beta$ -glucosidase活性を有する6個の形質転換体を得られた。各々の形質転換体より粗換えプラスミドを抽出したのち、制限酵素による切断およびSouthernプロット法により比較した結果、得られた形質転換体は3種のものに帰結することが判明した。さらに、異なる3種の形質転換体について、それらの保持する粗換えプラスミドを各々、pEFG1, pEFG2, pEFG3として、挿入断片についての制限酵素地図を作成した。また、各々のプラスミドについて、培地中へのIPTGの添加が発現に及ぼす影響を調べた。その結果、pEFG1保持株に関しては、IPTGの非存在下においても、X-Gluの分解による強い発色が認められた。一方、pEFG2, pEFG3保持株に関してはIPTGの存在下において発色が認められた。

Cloning and Expression of the  $\beta$ -Glucosidase Gene from *Enterococcus faecalis* in *Escherichia coli*

Shinji Kanayama\*, Okenji Morita, Kohtaro Kirimura, and Shoji Usami (School of Sci. and Engineer., Waseda Univ., Tokyo 169; \*Nippon Gene Co. Ltd., Toyama 930)