

Burkholderia cepasia からのキチナーゼ生産遺伝子のクローニング

松田克礼**・豊田秀吉*・田中久雄*・玉井隆行*・池田成志*・大内成志***

Cloning of chitinase gene from *Burkholderia cepasia*Yoshinori MATSUDA**, Hideyoshi TOYODA*, Hisao TANAKA*, Takayuki TAMAI*,
Seishi IKEDA* and Seiji OUCHI***

Synopsis

In this study, we isolated a bacterium producing a large quantity of chitinase and identified it as *Burkholderia cepasia*. The chitinases isolated from the bacterium were detected by SDS-PAGE and at least two chitinases (40 and 50 kDa) were identified in the zymogram. The genomic DNA extracted from the bacterium was used for the construction of genomic library by the use of λ EMBL3 phage vector and phage clones producing chitinase were selected by using 4-MU chitotriptide as a substrate and exposing to UV light. DNA fragment inserted in λ EMBL3 phage vector was subcloned into pBluescript vector with restriction enzymes and pBlueCAK12 (4.4 kb) clone including chitinase gene was selected. The inserted DNA fragment was deleted by exonuclease III and chitinase-coding region was specified by chitinase activity detected by the use of 4-MU chitotriptide and UV light exposure. The chitinase of *B. cepasia* was found to be coded in 2.3 kb of pBlueCAK12.

緒言

筆者らは、植物土壌病害の多面的防除について検討を重ねており、トマトの萎凋病防除に関しては、有機化合物あるいは酵素化学的研究など多くの知見を蓄積してきた。特に、トマト萎凋病菌についてはその細胞壁の物理化学的研究から、その構成成分がキチンとキトサンであることが明らかにしている。また、これらの成分は高等植物には検出されないため、キチナーゼ・

キトサナーゼなどを用いて病原菌細胞壁を分解することができれば、植物体に悪影響をおよぼすことなく病原菌の伸長抑制ができることと期待されている^{1,2)}。このような観点から、キチナーゼまたはキトサナーゼを生産する細菌や放線菌に注目し³⁾、これら微生物の酵素生産遺伝子の分子生物学的研究や土壌施用による実用的防除など、幅広い解析が行われている。

一方、様々な植物の組織培養系が確立され、再分化植物体を容易に得ることが可能

* 農学部農学科 (Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan)

** 農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

となってきたり、また、それと共に外来遺伝子を植物細胞に導入する技術の開発も進んでいる¹⁾。これらの培養系や形質転換法を利用すれば、病害虫に抵抗性を持つ植物の作出も可能であって、事実、かなりの作物について病害抵抗性形質転換体の野外放出も認められている。また、キチナーゼの抗菌活性については、マイクロインジェクション法による解析から、メロン、イチゴ、バラなどのうどんこ病菌の吸器、二次菌糸などの細胞壁分解活性が証明されており、キチナーゼ遺伝子導入によるこれらの病害抵抗性品種の育成が可能であることも示した。このような背景から、本研究では、土壌からキチン分解活性の高い土壌生息性細菌を分離し、それら分離菌からキチナーゼ生産遺伝子をクローニングすることにした。

材料と方法

1. 土壌からのキチン分解性細菌の分離

近畿大学農学部の圃場から土壌を採取し、土壌中に生息するキチン分解性細菌の分離を試みた。すなわち、採取した土壌を滅菌水と混合し、30分間強振した後濾過し、濾液をM9/キチン寒天培地 (0.2g コロイダルキチン, 10.5g K_2HPO_4 , 4.5g KH_2PO_4 , 1.0g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0.2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0g グルコース, 5.0 μ g チアミン塩酸塩を 1 l の水に溶解) と混合した後、シャーレに分注して、30°Cで7日培養した。生育したコロニーの周縁に明瞭なハローを形成したものをキチン分解性細菌として選抜した。その中で、最も活性の高い分離菌をAK-1株と命名し、以後の実験に用いた²⁾。

2. AK-1株からのキチナーゼの精製

AK-1株が生産するキチナーゼを単離するため以下の実験を行った。まずAK-1株をM9/キチン/グルコース培地に植菌し、30°Cで3日間振とう培養した後、細菌培養液を1,000×g、5分間遠心分離した。その上清に最終濃度が50%になるように硫酸アンモニウムを加え、4°Cで一晩塩析した。

1,000×g、15分間の遠心分離で得た沈査を10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、一晚蒸留水に対して透析した後、透析内液を粗酵素液とし、SDS-PAGEによる電気泳動法でキチナーゼを分画した。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲル、または0.05%グリコールキチンを含む10%ポリアクリルアミドゲルを使用した。

a) 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動³⁾

酵素試料を10%ポリアクリルアミドゲルにチャージし、泳動用緩衝液 (192mMのグリシンと0.1%のSDSを含む25mMのTris-HCl pH8.3) 中で15mAの定電流により、室温で3時間泳動した。泳動ゲルは、前固定液 (25mlのメタノール、7.5mlの酢酸を72.5mlの超純水に混合した溶液) 中で30分間振とうし、染色液 (2.5g クーマシー・ブリリアントブルー-R250を500mlのメタノールと50ml酢酸で溶解し、450ml超純水と混合した溶液) に30分間浸漬し蛋白質を染色した。その後、脱色液 (50mlのメタノールと70mlの酢酸を880mlの超純水に混合した溶液) で脱色し、イオン交換水で30分間水洗した後、ゲルを乾燥させた。

b) 0.05%グリコールキチンを含む10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動⁴⁾

0.05%グリコールキチンを含む10%ポリアクリルアミドゲルに酵素試料をチャージし前項と同様に電気泳動を行った。泳動後のキチナーゼ活性は、Koga¹⁾らの方法により検出した。すなわち、SDS除去液 (1%のTritonX-100を含む10mM Tris-HCl, pH7.0) 中で2時間洗浄し、蛍光染色液 (0.01%のFluostain Iを含む100mM Tris-HCl, pH8.9) 中で5分間染色した。酵素活性バンドは、紫外線照射下で検出した。

3. AK-1株の遺伝子ライブラリーの作成

AK-1株の遺伝子ライブラリーを作成するため以下の操作を行った。

a) AK-1株からの染色体DNAの抽出

キチン分解性細菌AK-1株の染色体DNAは MarmurとDoty¹⁴⁾の方法に基づいて抽出した。すなわち、キチン分解性細菌AK-1株をLuria-Bertani(LB)液体培地(10gバクトトリプトン, 5g酵母エキス, 10gNaClを1lの水に溶解)で一晩振とう培養した。遠心分離によって回収した菌体を、0.01MのEDTA-2Na, 27%のショ糖および、10mg/mlのリゾチームを含む1×SSC溶液(0.5MのNaCl, 0.015Mのクエン酸ナトリウム)に懸濁した。細菌懸濁液に1%のSDS溶液を加え、さらに最終濃度が2mg/mlとなるようにDNaseフリーのRNaseを添加して溶菌させた後、TE緩衝液(1mMのEDTAを含む10mMのTris-HCl, pH8.0)で飽和したフェノールで除蛋白質処理を行った。得られた遠心上清はTE緩衝液で透析した後、3倍量の冷エタノールを加え、中間層付近に析出した糸状の染色体DNAをガラス棒で巻き取った。これを少量のTE緩衝液に溶解した後、塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心法によって精製し、AK-1株の染色体DNA溶液とした。

b) 制限酵素Sau3A Iによる染色体DNAの部分分解

前項で抽出した染色体DNAを4塩基認識の制限酵素Sau3A Iで部分分解した。すなわち、1μgの染色体DNAを100μlの緩衝液(5mMのMgCl₂と50mMのKClを含む2mMのTris-HCl, pH8.0)に溶解し、0.1unitのSau3A Iを加え37℃で1時間反応させた。一定時間毎に0.5MのEDTA(pH8.0)を加え、その反応を順次停止させて電気泳動により分解程度を判定した。

c) ショ糖密度勾配遠心法によるDNAの分画

前項の部分分解で得たDNA断片をショ糖密度勾配遠心法によって分画するため、10%、20%、30%および40%のショ糖を含む緩衝液¹⁵⁾(1MのNaClと5mMのEDTAを含む20mMのTris-HCl, pH8.0)を遠心管中に重層し、一晩放置して連続密度勾配を作製した。その後TE緩衝液に溶解したDNA溶液を最

上部に重層し、水平型ローターRSP-28(日立製作所製)を使用して、15℃、122,000×g, 20時間遠心分離をした。遠心分離した試料は遠心管に設けた穴から500μlずつ分取し、アガロース電気泳動によって、各分画に含まれるDNA断片長を決定した。

d) 染色体DNA断片とファージベクターとの連結

前項で得たDNA断片をファージベクターに連結するにあたっては、λEMBL3/BamHI Vectorit(Stratagene社製)を使用した。すなわち、染色体DNAの断片を連結用緩衝液(5mMのMgCl₂と30mMのNaClを含む100mMのTris-HCl, pH7.6)に溶解し、等モル比となるように1μlのλEMBL3DNA(1μg/μl)を加えた。このようにして調整したDNA溶液(5~10μl)に等量のDNA Ligation kit・B液(TaKaRa社製)を加え、26℃で10分間反応させた。その後、エタノール沈澱によってDNAを回収し、TE緩衝液に溶解した。

e) in vitro packaging

Gigapack II Plus Packaging Extract(Stratagene社製)を使用してDNAのin vitro packagingを行った。操作は、Stratagene社のプロトコールに従った。すなわち、前項で得られたDNA溶液(5μl)を上記キットの赤色チューブ液に加え、さらに15μlの黄色チューブ液を加えた後、22℃で2時間反応させた。

f) 形質転換ファージのプレーティング

ファージ感染の宿主としては、大腸菌LE392株を使用した。まず、本菌をNZYM固形培地(5g NaCl, 5g 酵母エキス, 10g NZ amineを1lの水に溶解し、10mMのMgSO₄を添加したもの)で37℃、一晩静置培養し、得られたコロニーをNZYM液体培地に植菌した後、37℃で4~6時間培養した。細菌は、遠心分離で集菌し、10mMのMgSO₄に懸濁して前項で調製したファージ液と混合した後、37℃で20分間培養した。

これを、48℃に保温した3mlの軟寒天NZYM培地と混合し、NZYM固形培地に重層して37℃で一晩培養した。

4. キチナーゼ生産ファージのスクリーニング

前項で得たプレート上の形質転換ファージからキチナーゼ生産ファージを選抜するにあたっては、Robbins¹⁹⁾らの方法を応用した。すなわち、ファージ粒子を宿主大腸菌LE392株に感染させ、12.5 μ g/mlの4-MUACを含むNZYM平面培地にプラークを形成させ、紫外線照射下で4-MUの蛍光を発する陽性 λ ファージクローンを選抜した。選抜された陽性クローンを再び宿主大腸菌LE392株に感染させ、NZYM液体培地を用いて37℃で一晩振とう培養し、ファージ溶菌液中のキチナーゼ活性をp-ニトロフェノール誘導体の分解活性によって求めた。すなわち、100 μ l 試料液に対し2mlの基質溶液 (0.1mMのp-nitrophenyltri-N-acetyl- β -chitotrioside) を加え、37℃で30分間反応させた後、反応液の337nmにおける吸光値を測定し、蛋白質1mg当りの活性値を求めた。その中から、活性値の最も高いクローン λ CAK-12を選抜した。得られた λ ファージ粒子からDNAを抽出し、挿入断片の制限酵素認識部位を検索した。

5. 大腸菌におけるAK-1株キチナーゼ遺伝子の発現

λ CAK-12ファージクローンには、約15kbのAK-1株染色体DNA断片が挿入されているので、制限酵素認識部位を検索するとともに、得られたDNA断片について、大腸菌発現ベクターであるpBluescript II SK⁺へのサブクローニングを行った。これらのクローンについては4-MUACを用いてキチナーゼ活性を検出した。すなわち、菌体をLB液体培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した後、菌体を遠心分離で集菌し、50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁した後、0.1% SDSを加えて溶菌した。再度、菌体を遠心分離で集菌し、得られた上清に4-MUACを加え、37℃で10分間反応させた。その後、紫外線照射下で蛍光として検出さ

れるクローンを選抜し、約4.4kbのEcoRI-BamHI断片pBlueCAK12を得た。

6. 形質転換大腸菌からのキチナーゼ精製

前項で選抜したプラスミドクローンpBlueCAK12からのキチナーゼの分離には浸透圧ショック法²⁰⁾を用いた。すなわち、形質転換大腸菌を0.01M IPTGと50 μ g/mlのアmpiシリンを含むLB液体培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。遠心分離後、集菌した菌体を氷冷した10mM Tris-30mM NaCl緩衝液 (pH 7.3) で2回洗浄し、菌体生湿重1g当たり35mlの33mM Tris緩衝液 (pH 7.3) に懸濁した。得られた懸濁液に等量の50% (W/V) ショ糖を含む33mM Tris緩衝液 (pH 7.3) を加え、攪拌後、直ちに最終濃度が1.0mMとなるようにEDTA2Naを添加し、室温で10分間穏やかに攪拌した。4℃で遠心分離した後、菌体を氷冷した0.5mM MgCl₂溶液に穏やかに懸濁し、懸濁液を氷水中で10分間穏やかに攪拌した。再度遠心分離した後、上清をベリプラズム画分として前項と同様の硫酸塩析および透析処理を行って粗酵素液とし、SDS-PAGEを行った。

7. デリーションクローンの作成

pBlueCAK12におけるキチナーゼ生産遺伝子の正確な挿入位置を調べるため、また、塩基配列を決定をするために、Yanich-Perron²¹⁾らおよびHenikoff⁶⁾らの方法に従って、300kbごとにデリーションクローンを作成した。すなわち、pBlueCAK12を50 μ g/mlのアmpiシリンを含む液体LB培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養後、アルカリ迅速法でプラスミドDNAを抽出し、塩化セシウム・臭化エチジウム密度勾配遠心法によって閉環状プラスミドDNAを精製した。精製プラスミドDNAについては制限酵素分析によってデリーションの方向を決定し、まず3'末端突出の制限酵素で切断した後、5'末端突出の制限酵素で切断した。このプラスミドDNAをExonuclease IIIを用いて30℃で15、30、60、120秒反応させた後、Mung Bean nuclease処理によってデリーシ

オンを行った。さらに、Klenowフラグメントを用いて、プラスミドDNA末端を平滑化し、T4 DNAPolymeraseで再開環した後、大腸菌JM109株を形質転換した。キチナーゼ活性の検定は、前項と同様に4-MUACを用いて行い最少断片クローンpBlueBCC6を得た。

8. サザンハイブリダイゼーション

キチナーゼ生産クローンpBlueBCC6の挿入断片とAK-1株の相同性を検討するため、pBlueBCC6をPst Iで切断し、電気泳動によりベクターと分離した。次に、pBlueBCC6のDNAをアガロースゲルより抽出してECLを用いて標識し、CTAB法⁹⁾で抽出したAK-1株の染色体DNAとサザンハイブリダイゼーションを行った。電気泳動したゲルを核酸プロッティング装置(Pharmacia社製Vacugene)を用いてナイロン膜に転移させた。DNA転移ナイロン膜は、アルカリ変性液(1.5MのNaClと0.5NのNaOH混合液)、中和液(1.5MのNaClを含む1MのTris-HClpH5.0)、20×SSC(3MのNaClと0.3Mのクエン酸ナトリウムの混合液)で順次処理し、2×SSCで2~3分間洗浄してろ紙上で風乾させた後、80℃2時間のベーキングを行った。プローブDNAは、ECL法で標識し、Amersham社製のDNA標識試薬を用いた。なお、操作方法は、同社のプロトコールに従った。まず、前述のナイロン膜を密封パックに入れ、0.25ml/cm²のハイブリダイゼーション緩衝液(Amersham社製)を加えて、42℃で60分間遮光浸とうした。次に、密封パック内に標識したプローブDNAを加え、さらに42℃で16時間遮光浸とうした。その後、ナイロン膜を一次洗浄液(6M尿素、0.4% SDS, 7.5mMクエン酸ナトリウム)に浸漬し、42℃で20分間、遮光振とうした。この場合、洗浄液量は、ナイロン膜1cm²あたり2mlとした。同様の操作を繰り返した後、さらに二次洗浄液(0.3M NaCl, 30mMクエン酸ナトリウム)に浸漬し、5分間室温で遮光振とうした。同様の二次洗浄操作を再度繰り返した後、ナイロン膜を0.125ml/cm²の検出試薬I(Amersham社製)

と検出試薬II(Amersham社製)の混合液に浸漬し、1分間反応させた後、X線フィルムによってシグナルを検出した。

結果および考察

細菌のキチナーゼ生産遺伝子のクローニングについては、1986年にJones⁸⁾らおよびFuchs³⁾らが*Serratia marcescens* QMB 1466株のキチナーゼ生産遺伝子をクローニングして以来、数多くのクローニングの例が報告されている。そのうち十数種についてはそれらの遺伝子の塩基配列またはアミノ酸配列が決定されている。また、1種の細菌から複数のキチナーゼ生産遺伝子がクローニングされている例が多く、1つのキチナーゼ生産遺伝子のみがクローニングされている細菌のなかにも異なる遺伝子の存在が示唆されているものがあって、一般的にはキチナーゼを生産する細菌は複数のキチナーゼ生産遺伝子をもつことが多いと考えられる。一方、Jash⁹⁾らが*S.marcescens*のキチナーゼ遺伝子でタバコを形質転換し、転換体が、腰折病(*Rhizoctonia solani*)に対して抵抗性を示したと報告している。この事実は、植物の抵抗性因子として、キチナーゼが重要であることを示すとともに菌類病抵抗性植物の育種における細菌キチナーゼ遺伝子の有用性を示唆する。

1. 土壌からのキチン分解性細菌の分離

本実験では、コロイダルキチンを炭素源とする選択培地を使用し、土壌中に生息するキチン分解性細菌の分離を試みた。その結果、コロニーの色や形状の異なる数種のキチン分解性微生物が得られ、それらの周縁にはコロイダルキチン分解に基づく明瞭なハローが形成された。このことは、分離された微生物がキチナーゼを培地中に分泌し、キチン分解産物を炭素源として増殖していることを示している。そこで、これらのキチン分解性微生物を分離し、分離菌のキチナーゼ生産について検討した。すなわち、各分離菌をM9/キチン寒天培地中に包埋し、一定期間培養した後、形成された

ハローの直径から、分離菌株の中では *Burkholderia cepasia* と同定された分離菌が最も高い活性を示したのでこれをAK-1株と命名した。以後の実験にはこのAK-1株を使用した (Fig. 1)。



Fig. 1 Colony and halo producing by a chitin-degrading bacterium, *Burkholderia cepasia* AK-1, on colloidal chitin medium.

2. キチン分解性細菌AK-1株のキチナーゼ分画

AK-1株が培養ろ液中に分泌するキチナーゼを分離精製し、SDS-PAGEによる電気泳動を行った結果、約40kDaと50kDa付近にキチン分解活性の認められる陽性のバンドが検出された。

3. AK-1株の遺伝子ライブラリーの作成

遺伝子ライブラリーを作成する場合、比較的大きなDNA断片が挿入できるファージベクターやコスミドベクターが用いられることが多く、相補的プロンプ遺伝子とハイブリダイズする陽性クローンを選抜するのが一般的である。そこで本実験では、ファージベクターの一種である λ EMBL3を用いて、遺伝子ライブラリーを作成した。すなわち、AK-1株遺伝子ライブラリーを作成するため、本菌の染色体DNAを4塩基認識制限酵素Sau3A Iで部分分解し (Fig. 2-A)、ショ糖密度勾配遠心法で分画して (Fig. 2-B) 得た9~20kbのDNA断片を λ EMBL3ファージベクターに連結して *in vitro* packagingを行い、約104個の組み換え体ファージを得た。

4. キチナーゼ生産ファージのスクリーニング

AK-1株遺伝子ライブラリーからキチナーゼ生産遺伝子を分離するため、Robbinsらの方法を応用し、4-MUACを含む培地を用いて、約 1.0×10^4 のプラークについてスクリーニングを行った。その結果、陽性クローンの周縁には、4-MUACを分解した結果生じる4-MUが紫外線照射下で蛍光として検出された。4-MUが検出されたクローンについてはプラーク単離を繰り返し、それぞれの単離過程でキチナーゼ活性の有無を検討した。以上の精製操作を繰り返し、

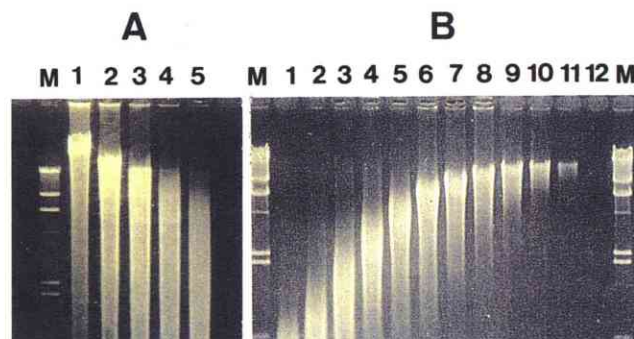


Fig. 2 Genomic DNA of *B. cepasia* AK-1.
 A: Genomic DNA partially digested with Sau3AI,
 M: DNA molecular weight marker Lane 1-5: Partially digested with different units of Sau3AI
 (1; 0.01, 2; 0.02, 3; 0.05, 4; 0.1, 5; 0.2 units of Sau3AI)
 B: Partially digested genomic DNA fractionated by sucrose density gradient.
 M: DNA molecular weight marker Lane 1-12: DNA fractionated by sucrose density gradient

最終的に12個の陽性クローンを得た。その中から最も活性の高いλCAK-12を以後の実験に用いた。このように、宿主大腸菌内でキチナーゼ生産遺伝子が翻訳されたことは、AK-1株のSD配列が宿主大腸菌のリゾームに認識されたことを示している。

5. 大腸菌におけるAK-1株キチナーゼ遺伝子の発現

λCAK-12ファージクローンには、約15kbのAK-1株染色体DNA断片が挿入されているので、制限酵素認識部位を検索するとともに、得られたDNA断片について、大腸菌発現ベクターであるpBluescript II SK⁺へのサブクローニングを行った。その結果、約4.4kbのEcoR I-BamH I断片において活性の検出されるクローンpBlueCAK12を得た。

6. 形質転換大腸菌からのキチナーゼ精製

形質転換大腸菌pBlueCAK12の生産するキチナーゼをSDS-PAGEで分画した結果、0.05%グリコールキチンを含む10%ポリアクリルアミドゲル内に、2個の活性バンドが検出された。これらのバンドはいずれもAK-1株の分泌する蛋白質より分子量が大きく約100kDa付近にバンドが確認された。

これは、AK-1株では菌体外に分泌されるキチナーゼが大腸菌では分泌されていないことから、分泌の際に何らかの修飾を受けているためと考えられる。

7. デリレーションクローンの作成

pBlueCAK12におけるキチナーゼ遺伝子の正確な挿入位置を調べるため、Exonuclease III を用いてデリレーションクローンを作成し、それらのキチナーゼ活性について検討した。その結果、Fig. 3 および Fig. 4に示すように4-MUACを用いた活性測



Fig. 3 Electrophoregram of deletion clones of pBlueCAK12 digested with exonuclease III. M: λ DNA molecular weight marker Lane 1-12; Deletion clones of pBlueCAK12

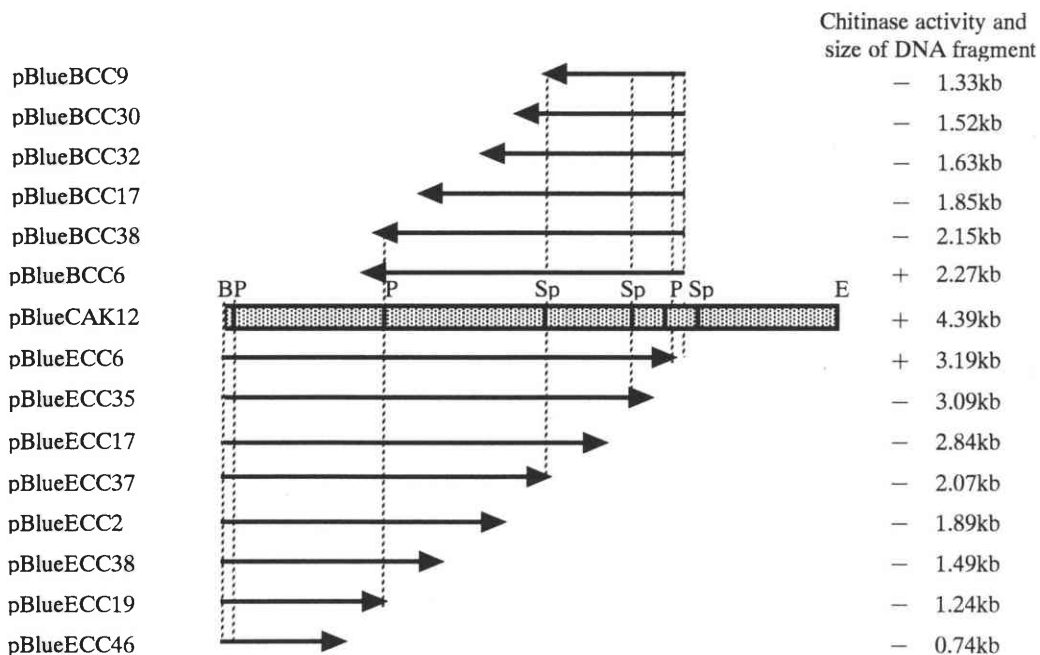


Fig. 4 Restriction enzyme map of pBlueCAK12 and constructed deletion clones
B; BamHI, P; Pst I, Sp; SphI, E; EcoRI
+; Positive chitinase activity, -; Negative chitinase activity.

定において、紫外線照射下で蛍光を発する最少断片クローン pBlueBCC6 を得た。pBlueBCC6 は約 2.3kb の挿入断片を持ち、IPTG の有無にかかわらずキチナーゼを分泌していることから、この遺伝子には AK-1 株由来のプロモーターが存在していると考えられる。

8. サザンハイブリダイゼーション

キチナーゼ生産クローン pBlueBCC6 の挿入断片と AK-1 株の相同性を検討するために pBlueBCC6 の DNA をプローブとして AK-1 株の染色体 DNA とハイブリダイゼーションを行った結果、陽性のシグナルが確認されたことから、pBlueBCC6 が AK-1 株由来であり、ひとつのキチナーゼ遺伝子がクローニングされたことが確認された。今後、クローニングしたキチナーゼ生産遺伝子の塩基配列を決定し、さらに AK-1 株の生産するキチナーゼのアミノ酸配列の決定を行うことによってこれらの関係を解析する予定である。

引用文献

- 1) Boller, T. (1982). Chitinase, a defense of higher plant against pathogens. In Chitin in Nature Technology. (Muzzarelli, R., Jeunianx, C., and Gooday, G. W. eds.) pp.223-230. Ancona, Italy.
- 2) Dziadik-turner, C., Koga, D., Mai, M. S. and Kramer, K. J. (1981). Purification and characterization of two β -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) Arch. Biochem. Biophys. 212:546-560.
- 3) Fuchs, R. L., McPherson, S. A. and Drahos, D. J. (1986). Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. Appl. Environ. Microbiol. 51:504-509.
- 4) Frederick, M. Ausubel., Roger, Breivt., Robert, E. Kingstone., David D. Moore., J. G. Seidman. John, A. Smith and Kevin, Struhl. 2:85-89 Wiley interscience Cambridge Masachusetts
- 5) Fukamizo, T., Sonoda K., Toyoda H., Solid state C-NMR analysis of cell components of *Fusarium oxysporum*. Agric. Biol. Chem. 54:2761-2762
- 6) Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene. 28:351-359.
- 7) 本間喜久. (1989). 拮抗微生物(細菌、放線菌) 利用による病害防除. 農業および園芸. 62:152-158.
- 8) Jones, J. D. G., Grady, K. L., Suslow, T. V. and Bedbrook, J. R. (1986). Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. EMBO J. 5:467-473.
- 9) Price. J. S. and Storck. R. (1975). Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. Journal of bacteriology. vol 124:1574-1585
- 10) Koga, D., J. and Kramer, K. J. (1983). Insect endochitinases: Glycoproteins from moulting fluid, integument and pupal haemolymph of *Manduca sexta* L. Insect Biochem. vol. 13:295-305.
- 11) Lopez-Romero, E. and Ruiz-Herrera, J. (1986). The role of chitin in fungal growth and morphogenesis. In: Chitin in Nature and Technology. (R. Muzzarelli, C. Jeunianx, and G. W. Gooday. eds.). 55-62, Cold Spring Harbor. New York
- 12) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2.0.1-2.14.8
- 13) 西方 敬. (1997). バイオ実験イラストレド、タンパクなんてこわくない. pp13-104 秀潤社. 東京.
- 14) Potrykus, I. (1990). Gene transfer to

- cereals: An assessment. *Bio/Technology*. 8:535-542
- 15) Robbins, P. W., Albright, C. and Benfield, B. (1988).
Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *The J. Biol. Chem.* vol.253:443-447
- 16) 玉井隆行. (1992).キチン分解性細菌のキチナーゼ生産遺伝子のクローニング. 近畿大学農学部農学研究科修士論文
- 17) Toyoda, H., Matsuda, Y., Yamaga, T., Ikeda, S., Morita, M., Tamai, T. and Ouchi, S. (1991).
Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells *Plant Cell Rept.* 10:217-220.
- 18) 長 祥隆. (1995). キチン・キトサンハンドブック キチン・キトサン研究会編 pp:96-103 技報堂出版株式会社
- 19) Yanisch-Perron, C. V. J. and Messing, J. (1985).
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

制限酵素処理したDNA断片をpBluescript ベクターにクローニングし、pBlueCAK12 (4.4 kb) を得た。さらに、エキソヌクレアーゼによる挿入断片のデリーションを行った結果、本研究で単離された *B. cepasia* のキチナーゼ遺伝子は約 2.3 kbであることが明らかになった。

摘 要

本研究では、土壌からキチナーゼ高生産性細菌を単離し、その同定を行った後、その細菌からキチナーゼ遺伝子の分離を試みた。選抜されたキチナーゼ高生産細菌の同定を行った結果、*Burkholderia cepasia* であることが判明したのでこの細菌をAK-1株と命名した。AK-1の生産するキチナーゼをSDS-PAGEによって分画したところ、少なくとも2種類のキチナーゼ (40 and 50 kDa) が確認された。次に、AK-1から染色体DNAを抽出し、ゲノムライブラリーを製作した。4MU-キトトリオースを基質としてゲノムライブラリーからキチナーゼ遺伝子を含むファージクローンを選抜した後、