

Introduction of signal sequence into recombinant β -agarase

【背景と目的】 本研究室では活性汚泥からアガラーゼ生産菌 *Cellvibrio sp.* 0A-2007 を単離し、2 種類の β -アガラーゼ遺伝子 *agaA*, *agaB* を大腸菌にクローニングした。遺伝子解析の結果、シグナル配列を持つ *AgaB* は菌体外酵素であると考えられ、*AgaA* にはシグナル配列は見られなかった。本研究では寒天オリゴ糖の効率的生産を目的として、*AgaA* の菌体外生産の為、*agaA* へのシグナル配列の導入を試みた。

【実験方法】 PCR 法を用いて *Cellvibrio sp.* の染色体 DNA から *agaB* のシグナル配列と *agaA* 遺伝子を増幅し、ベクタープラスミド pUC19 とライゲーションし、*agaA* にシグナル配列を導入した。アルカリ SDS 法を用いてプラスミドを抽出し制限酵素処理後のバンドの確認を行った。さらに粗酵素液を用いてアガロースの酵素分解を行い、HPLC によって寒天オリゴ糖の生産パターンを調べた。

【結果・考察】 遺伝子組み換え後、寒天プレート上でハローを形成するコロニーを得た。プラスミド抽出後、制限酵素処理し、電気泳動したところ設計通りの DNA 断片であることが確認された。粗酵素液を用いてアガロースを分解後、HPLC 分析を行った結果、*AgaA* で分解した時と同じ寒天オリゴ糖が生産された。しかし、オリゴ糖の生産量が著しく低いことが分かった。