

結合性セルラーゼを生産する組換え好熱性細菌を用いた高速コンポスト化

課題番号 10680541

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））
研究成果報告書



静岡大学附属図書館



030850411 7

平成12年4月

研究代表者 中崎清彦
(静岡大学工学部教授)

コンポスト原料を高速に処理するためには、難分解性有機物の1つであるセルロースの分解を如何に促進させるかが課題となる。コンポスト中ではセルロース自身が難分解性であることに加え、コンポスト化のような高温条件下ではセルラーゼを生産する微生物が生育しにくいために、コンポスト中にセルロースが残存しコンポストの熟成に時間を要する理由の1つとなっている。そこで、本研究ではコンポストから高温で生育できる、増殖速度の速い好熱性 *Bacillus* 属細菌 A8 株を単離し、その菌にセルラーゼ遺伝子を導入することでセルラーゼ活性を持つ組換え菌を作成することを試みた。

研究組織

研究代表者 : 中 崎 清 彦 (静岡大学工学部教授)
研究分担者 : 荻 田 修 一 (三重大学遺伝子実験施設助手)

研究経費

平成10年度	2,300千円
平成11年度	1,100千円
計	3,400千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. K. Nakasaki et. al., Comparison of Degradation Patterns of Organic Material in Batch and Fed-batch Composting Operations, Waste Management & Research, Vol.16, No.5, pp.484-489 (1998).
2. K. Nakasaki et. al., Quantitative Analysis of Ammonia and Odorous Sulphur Compounds Evolved during Thermophilic Composting, Waste Management & Research, Vol.16, No.6, pp.514-524 (1998).
3. 中崎清彦, 生ごみのコンポスト化技術, 化学工学, Vol.63, No.8, pp.446-449 (1999).
4. 中崎清彦, 有機性廃棄物のコンポスト化, 混相流, Vol.13, No.2, pp.117-125 (1999).
5. K. Nakasaki et. al., A Prediction for the Degradation Pattern of Organic Materials in the Composting of a Fed-batch Operation as

Inferred from the Results of a Batch Operation, Journal of Material Cycles and Waste Management, Vol. 2, pp. 31-37 (2000).

(2) 口頭発表

1. 大滝, 苅田, 中崎, コンポスト中微生物相の多様性解析, 第9回廃棄物学会研究発表会, 1998.
2. 大滝, 苅田, 中崎, 分子生物学的手法を用いたコンポスト化過程における微生物相遷移解析, 平成11年度化学工学会, 1999.

(3) 出版物

1. 中崎清彦他 監修, 生物系廃棄物コンポスト化技術, シーエムシー, (1999).

1. 緒言

コンポスト化は自然環境中の微生物の働きを利用して有機質廃棄物を堆肥に変え土壌に還元することのできる、優れたリサイクル技術の1つである。有機質廃棄物をコンポスト化処理することは循環型社会を構築する上で有効と考えられるが、現在までのところ普及には程遠い状況が続いている。この原因の1つにコンポストを製造するには長い時間がかかることが挙げられる。このため短時間でコンポストを製造する高速コンポスト化の方法が期待を集めている。従来から高速コンポスト化が達成できていない原因としてコンポスト化反応が十分に解明されていないこと、有機質廃棄物中にセルロースなどの難分解性の有機物が多く混入していることがある。著者はコンポスト化反応の解明に取り組み、高速コンポスト化を達成するための操作因子についての知見を見出しているが、さらに、高速にコンポスト化を進行させるにはセルロースの高速分解が不可欠である。

市販されているコンポストの原料として最も多く利用されているバーク（樹皮）、木の葉・刈り草などの庭ごみ、稲藁などの敷料と混合排出された家畜糞、食品加工廃棄物のうちの植物残渣、下水汚泥や生ごみのコンポスト化に通気性改良材として加えられる木材チップやおがくずなどには、セルロース成分が高濃度に含まれており、迅速なコンポスト化処理のためにはセルロース成分の分解を高速化することが不可欠である。セルロースを高速で分解するためには以下の2つの問題を解決する必要がある。1. これまで知られているセルロース分解菌は増殖速度が遅くコンポスト化後半にしか増殖しない。2. セルロースが原料中に散在しているために分解菌の生成するセルラーゼとセルロースの接触が不十分でセルラーゼが有効に作用しない。本研究ではセルラーゼを生成しないがコンポスト化の昇温期に増殖速度が

大きく高温段階の初期からコンポスト中で高濃度を達成することができる好熱性の *Bacillus* 属細菌に、セルロース結合性のセルラーゼを生成する性質を付与した組み換え体を創製し、これをコンポスト化の種菌として利用することを計画している。コンポスト原料に組み換え菌を接種することでセルラーゼの生成時期を速め、同時に生成したセルラーゼを原料中のセルロースに結合させて作用させることでセルロースの分解を促進し、高速コンポスト化を達成することを目的とする。コンポスト化において組み換え菌の使用と、対象とする有機物を絞ってそれに対する微生物の作用のクリアボックス化を目指した取り組みは従来までに報告がみられない。

コンポスト化においては従来から微生物を接種することが有機物分解の促進に有効か否かについて検討が行われてきたが、どのような微生物のどんな効果を期待して接種するのかについての明確な戦略がなく、また、接種した微生物のコンポスト化過程での増殖の確認もおこなわれずに、いわば、コンポスト化過程をブラックボックスとして扱って、漠然とコンポスト化が速くなることを期待していた。本研究では、高速コンポスト化を考える上で欠くことのできないセルロース成分の分解促進に対象を絞り、高速コンポスト化を達成しようとする点に特色がある。

本研究では一次発酵の過程で作成したコンポスト中から高温で生育できる、増殖速度の大きい好熱性微生物を単離し、遺伝子組換え技術を用いてセルラーゼ遺伝子を好熱性微生物に導入することで、セルラーゼ活性を持つ組換え菌を創製することを目的とした。

2. コンポストの作成、および微生物の単離

2-1 コンポスト原料

コンポスト原料は家庭から排出される生ごみにかわるものとして、性状が均質で再現性のあるデータを得ることができるという利点を考慮して市販のドッグフード (NEW VITA-ONE SOFT; 日本ペットフード株式会社) を用いた。ドッグフードの炭素および窒素の元素分析値は、それぞれ、47.0%と5.28%で C/N 比は 8.91 であった。実験に際してはドッグフードを挽肉機で磨砕し、通気性改良材であるおがくずと、市販の種菌を乾燥重量比で 10:9:

1 に混合し、消石灰を用いて pH を 8.5 付近に調整した後、蒸留水を加えて含水率を約 55%に合わせた。

2-2 コンポスト化操作

本研究で用いたコンポスト化実験装置の概略を Fig. 1 に示す¹⁾。反応器は容積約 27 l の円筒型で耐熱性塩化ビニル製のものを用いた。反応器は周囲にリボンヒータを巻き、発泡スチロールの断熱材に埋め込んでいる。コンポスト原料を反応器中に投入し、基本通気量を 30 l/h として底部より通気した。室温から設定温度まで、できるだけ昇温速度が同じになるように補助的に加熱し、その後は電磁弁の開閉による通気量の増減と実験装置に巻いたリボンヒータによる加熱によって設定温度を維持した。反応器からの排気ガスは硫酸水溶液の入ったアンモニアトラップに導き、アンモニアを取り除いた後に、炭酸ガスメータ (MODEL:RI-550A, 理研株式会社) を用いて排気ガス中の炭酸ガス濃度を連続的に測定した。また、通気速度も連続的に測定し、排気ガス中の炭酸ガス濃度と通気速度とから、炭酸ガスの累積発生量を計算するとともにコンポスト化物単位乾燥重量当り、単位時間当りの炭酸ガス発生モル数と定義した炭酸ガス発生速度を計算した。また、原料有機物の分解程度は元素分析により求めたドッグフード中の全炭素量に対する反応中に炭酸ガスとして揮散した炭素量の比と定義した炭素変化率で定量した。

コンポスト化に伴い一日に一度反応器の蓋を開け、均一な反応進行を目的として固相を切り返した。同時に、約 20g のサンプルを採取して、pH、および含水率の変化を測定した。pH はサンプル 3g を蒸留水 27 ml に懸濁させ 10⁴rpm で 10 分間ホモジナイズしたものを、pH 電極を用いて測定した。含水率は、105℃に設定した乾燥器を用いてサンプルを乾燥させ、減少した重量をサンプルに含まれていた水分量として求めた。なお、含水率を最適値である 45~55%の範囲²⁾に維持するために、サンプルを採取した後に適当量の蒸留水を加えて含水率を調整した。

2-3 コンポスト化の経時変化

ドッグフードを原料としたときの温度、炭酸ガス発生速度、炭素変化率、および pH の経時変化を Fig. 2~5 に示す。コンポスト化温度は、コンポストの切り返し時の温度低下を除いて、ほぼ設定値の 50℃一定に維持された。

また、切り返し後の温度は速やかに再上昇した (Fig. 2 参照)。炭酸ガス発生速度は切り返しに伴って一時的に大きくなる切り返しの効果が確認された。また、炭酸ガス発生速度はコンポスト化前半に大きいことから、原料中有機物の分解はコンポスト化前半に活発であることがわかる (Fig. 3 参照)。炭素変化率の傾きはコンポスト化進行に伴って次第に緩やかになるが、最終的には 91% 付近に達した (Fig. 4 参照)。また、pH は反応初期に一旦低下するが、コンポスト化 24 時間を過ぎる頃から再び上昇し、その後約 9 で一定となった (Fig. 5 参照)。これは、コンポスト化初期には有機酸が生成、蓄積し、pH は低下するが、反応が進行してタンパク質の分解が起こるとアンモニアの生成によって反応物の pH が上昇するためと考えられた。

以上のことから、作成されたコンポストはドッグフード中の有機物が良好に分解されたコンポストであることが確認された。

なお、ここでは詳細を示さないが、本研究でのコンポスト化装置を用いて同一条件のコンポスト化をおこなった場合には、よい再現性が得られることを確かめている³⁾。

2-4 微生物の単離

コンポスト中は多種多様な微生物が存在する混合系であるため、ある特定の微生物がそれ以外の他の微生物との基質の獲得競争に打ち勝ち、優先的に増殖することができるためには、できるだけ増殖速度の速い微生物を選択することが有利である。

そこで、上述のように作成したコンポスト製品から増殖の速い微生物を単離することを試みた。コンポスト製品を適宜希釈して Table 1 に組成を示す Trypticase-soy 寒天培地（以下、TS 寒天培地）上に塗抹して微生物を単離し、常法に従って純粋培養を確立した⁴⁾。単離した微生物は TS 液体培地を用いて増殖速度を測定し、単離した全 40 株のうち、増殖の速い微生物として A1～A8 株が選択された。なお、増殖速度は $0.43 \sim 1.38 \text{ h}^{-1}$ の範囲にあった。これらの菌株のうち A8 株は 16S rDNA 領域の塩基配列のシーケンスから *Bacillus licheniformis* と決定された。

3. セルラーゼ遺伝子組換え菌の作成

3-1 セルラーゼ遺伝子，および p GDV1 の回収

セルラーゼ遺伝子は *Clostridium thermocellum* 由来のもの（以下，Cel A 遺伝子）⁵⁾を用いた（Fig. 6 参照）。Cel A 遺伝子には Cellulose Binding Domain（以下，CBD）の領域があるので，Cel A 遺伝子によって発現されたセルラーゼはセルロースに特異的に吸着することができる。よって，セルラーゼが菌体外に分泌されれば，コンポスト原料中のセルロースに特異的に吸着し，高速に分解できる可能性が期待された。

Cel A 遺伝子は pBluescript II SK-のプラスミドに導入され，*E. coli* JM109 にクローン化されていることから，Cel A 遺伝子の回収のためにクローン化された JM109 を培養した。JM109 の培養には LB 培地（Table 2 参照）を用い，培養温度は 37℃，培養期間は 12 時間とした。培養後は培養液を 15000rpm，30 s の条件で遠心分離し菌体を回収した。回収した菌体にドデシル硫酸ナトリウム（SDS），および水酸化ナトリウム，酢酸ナトリウムを順次添加して溶菌処理をおこなった後，15000rpm，2 min で遠心分離して細胞の破砕物を取り除いた。遠心分離後，回収した上清に 99.5%のエタノールを加えて遺伝子を沈殿させた。その後，Ribonuclease によって RNA を分解・除去し，Tris で飽和させたフェノール，およびクロロホルムでタンパク質を変性・除去した後，最終的に 99.5%のエタノールで DNA を沈殿させ回収した。方法の詳細については Molecular cloning⁶⁾を参照のこと。

回収した Cel A 遺伝子を含む pBluescript II SK-を鋳型として Cel A 遺伝子領域を LA Taq Polymerase（Takara LA Taq，宝酒造株式会社）を用いて PCR により増幅させ，Cel A 遺伝子を得た。PCR の反応条件は 98℃—30 秒，50℃—30 秒，72℃—90 秒で，サイクル数は 30 とした。

PCR により得られた増幅産物（Cel A 遺伝子領域）を Pst I および Sac I で 37℃，1 時間処理した後，アガロースゲル 0.8%，電圧 100 V，30min の条件で電気泳動をおこない，切断した Cel A 遺伝子を精製・回収した。なお，Cel A 遺伝子の精製・回収には市販の DNA 精製キット（GENE CLEAN KIT II，フナコシ株式会社）を用いた。このキットは NaI のアガロース融点効果作用，GLASS MILK（シリカマトリックス）の DNA 特異吸着性能，NEW（NaCl/EtOH/Water）洗浄液の不純物除去作用を組み合わせ，DNA 溶液の脱塩，精製，アガロースゲルからの DNA 抽出が簡単に行えるというものであ

る。

また、本研究では *Bacillus* 属細菌で複製できるプラスミドとして pGDV1 を用いた。pGDV1 の制限酵素地図を Fig. 7 に示す。これは全長 2571 bp でクロラムフェニコール耐性遺伝子マーカーを持ち、複製方式はローリングサークル複製である。このプラスミドは *B. subtilis* ISW にクローン化されていることから、pGDV1 を回収するためにクローン化された *B. subtilis* ISW を大量に培養し、pGDV1 を得ることとした。先に示した *E. coli* のプラスミド抽出方法をそのままグラム陽性細菌である *Bacillus* 属細菌に適用するとプラスミドの回収率が悪くなるため、溶菌過程の前に、リゾチームを加えて細胞壁を破碎する手順を加えた方法に変更した。なお、リゾチームは細胞の懸濁液に約 30 mg/ml となるように添加した後、40min 氷中に放置した。pGDV1 も先と同様に、制限酵素 Pst I および Sac I で切断し、アガロースゲルの電気泳動をおこなった後、先と同様に市販の DNA 精製キット (GENE CLEAN KIT II, フナコシ株式会社) を用いて pGDV1 を回収した。

3-2. *B. subtilis* ISW (標準株) を用いた形質転換

上述で回収したプラスミド (pGDV1) およびセルラーゼ遺伝子 (Cel A) を T4-DNA Ligase を用いて、ライゲーション反応をおこなった。ライゲーション反応の条件は 16°C, 約 12 時間とした。次に、このライゲーション後のサンプルを用いて、*B. subtilis* ISW を形質転換することを試みた。*Bacillus* 属細菌をはじめとするグラム陽性細菌はグラム陰性細菌に比べて細胞壁が堅いので、*E. coli* で用いられるエレクトロポレーション法を適用するのが困難であることが予備的な検討により明らかとなった。

そこで、本研究では細胞壁を破壊してプロトプラストを作成し、プロトプラストの状態で行質転換する方法⁷⁾を適用した。本来ならば、*B. licheniformis* A8 株に直接形質転換するのが望ましいが、形質転換の効率が極めて悪く、容易に行質転換できないと予測されたことから、ここでは一旦 *B. subtilis* ISW に形質転換させることとした。

形質転換で用いる *B. subtilis* ISW のプロトプラストは以下の方法で調整した。まず、ISW 株を 1%(w/w) グルコースを添加した LB 培地を用いて 1 晩培養し、培養液 1 ml を Penassay broth (Table 3 参照) に接種し、さらに 37°C で $OD_{540} \approx 0.5$ となるまで振盪培養した。この培養液 40 ml を採取して 4°C,

12000 rpm, 2 min の条件で遠心分離をおこない、得られた菌体を 4 ml の SMMP 培地 (Table 4 参照) に再懸濁した後、20 mg/ml のリゾチーム溶液を添加して 1 時間振盪培養した。なお、培養後、プロトプラストになっていることを光学顕微鏡により確認した。プロトプラストは SMMP 培地でさらに洗菌して、10 μ g のプラスミド (pGDV1) および 40% (w/w) の Polyethylene glycol を加え、3200rpm, 10min の条件で遠心分離した。それを再度 SMMP 培地に懸濁させ、その懸濁液をクロラムフェニコールを添加した DM3 寒天培地 (Table 5 参照) に塗抹し、46°C で 5 日間培養した。

培養後、プレート上にコロニーが形成された。そのコロニーを LB 培地で 37°C, 12 時間培養しプラスミドの抽出を試みたところ、プラスミドが確認された。さらにそれを制限酵素 Pst I および Sac I で切断したところ、ここには詳細は示さないが、pGDV1, および Cel A を示す 2 本のバンドが確認され、*B. subtilis* ISW に形質転換されたことが確かめられた。

3-3 *B. licheniformis* A8 株を用いた形質転換

上述で形質転換された *B. subtilis* ISW からプラスミドを大量に抽出し、*B. licheniformis* A8 での形質転換の効率を高めることとした。形質転換の方法としては上述と同様に宿主のプロトプラストを作成し、導入したいプラスミド DNA と混合して宿主に DNA を取り込ませる方法を用いた。

その結果、プレート当たり 3~4 個のコロニーが形成され、それらからプラスミドを抽出することができた。さらに、抽出されたプラスミドを制限酵素 Pst I, Sac I で切断したところ、Cel A 遺伝子と pGDV I のバンドが確認された (Fig. 8 参照) ことから、*B. licheniformis* A8 は形質転換されたことが確かめられた。

3-4 組換え菌におけるセルラーゼ発現の確認

セルラーゼ遺伝子を導入した *B. licheniformis* A8 株についてセルラーゼが発現されているかをタンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) により確認することを試みた。分離ゲルの濃度は 6%, 電気泳動の条件は電圧 100 V, 泳動時間は 90min とした。セルラーゼ遺伝子導入の有無を変えた *B. licheniformis* A8 株をそれぞれ培養し、その培養液から得た菌体にリゾチームを添加し、37°C, 1 時間

反応させることによって溶菌処理した後、超音波破碎装置を用いて菌体を破碎し、遠心分離によって上清を回収した。さらに、この上清にボールミルで磨砕したセルロース（以下、3%BMC）を混合・攪拌し、3～4 時間氷中に放置してセルラーゼを BMC に吸着させた後、15000rpm, 2min の条件で遠心分離して上清を取り除いた。沈殿した BMC を 100mM リン酸バッファで洗浄し、さらに遠心分離をおこなって BMC を回収した。BMC を添加することで、発現したセルラーゼは BMC に特異的に吸着することから、もし CBD をもつセルラーゼが発現すれば、セルラーゼ遺伝子導入の有無を変えた *B. licheniformis* A8 株の抽出液を電気泳動することで電気泳動パターンに違いがみられるはずである。

このようにして得られた抽出液、およびタンパク質の分子量マーカー (Low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis, Amersham Pharmacia Biotech) についてゲル電気泳動をおこない、BMC に吸着したセルラーゼタンパクの分子量を推定した。

SDS-PAGE におけるゲル写真を Fig. 9 に示す。BMC を用いて CBD をもつセルロースを濃縮したが、組換え菌と組換えをおこなわない宿主菌とで、電気泳動写真に顕著な差が見られなかった。このことから、組換え菌においてセルラーゼの発現量が少なかったと考えられる。次に、このように調整した SDS-PAGE をコンゴレッドで活性染色したときの写真を Fig. 10 に示す。もしセルラーゼの発現量が少なくても、CBD をもつセルラーゼが発現されていれば BMC に吸着するので、活性染色によりその発現が確認されると期待された。その結果、活性染色では組換え菌のサンプルについてだけ一本のクリアゾーンが 70kDa 付近にみられる (Fig. 10 参照) ことから CBD を持つセルラーゼが組換え菌にだけ存在することが確認された。また、分子量の大きさからこのタンパクは Cel A 遺伝子由来のセルラーゼであるという考えを指示した。

したがって、コンポスト中で増殖の速い好熱性細菌 *B. licheniformis* A8 株において *Clostridium thermocellum* 由来のセルラーゼ遺伝子 Cel A を組み換えることに成功した。また、組換え菌はさらにセルラーゼを発現することを確認した。

引用文献

- 1) 中崎清彦, 渡辺淳, 末原憲一郎, 久保田宏: 種菌の種類がコンポスト化速度に与える影響, 廃棄物学会論文誌, Vol. 6, No. 1, pp. 78-85 (1992)
- 2) 中崎清彦, 片岡稔, 倉富英一: 高温条件下でのコンポスト化における初期の昇温速度と種菌の効果が有機物の分解におよぼす影響, 廃棄物学会論文誌, Vol. 7, No. 5, pp. 225-233 (1996)
- 3) A. Ohtaki, K. Nakasaki et. al.: Biodegradation of poly- ϵ -caprolactone under controlled composting conditions., Polymer Degradation & Stability, Vol. 61, pp. 499-505 (1998)
- 4) K. Nakasaki, M. Sasaki, M. Shoda, and H. Kubota: Effect of seeding during Thermophilic Composting of Sewage Sludge, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 49, pp. 724-726 (1985)
- 5) S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya: Cellulose-Binding Domains Confer an Enhanced Activity against Insoluble Cellulose to *Ruminococcus albus* Endoglucanase IV, J. Ferment. Bioeng., Vol. 81, No. 6, pp. 553-556 (1996)
- 6) J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis: Molecular Cloning; A laboratory manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, In New York (1989)
- 7) J. Vehmaanpera: Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* protoplasts with plasmid DNA, FEMS Microbiology Letter, Vol. 49, pp. 101-105 (1998)

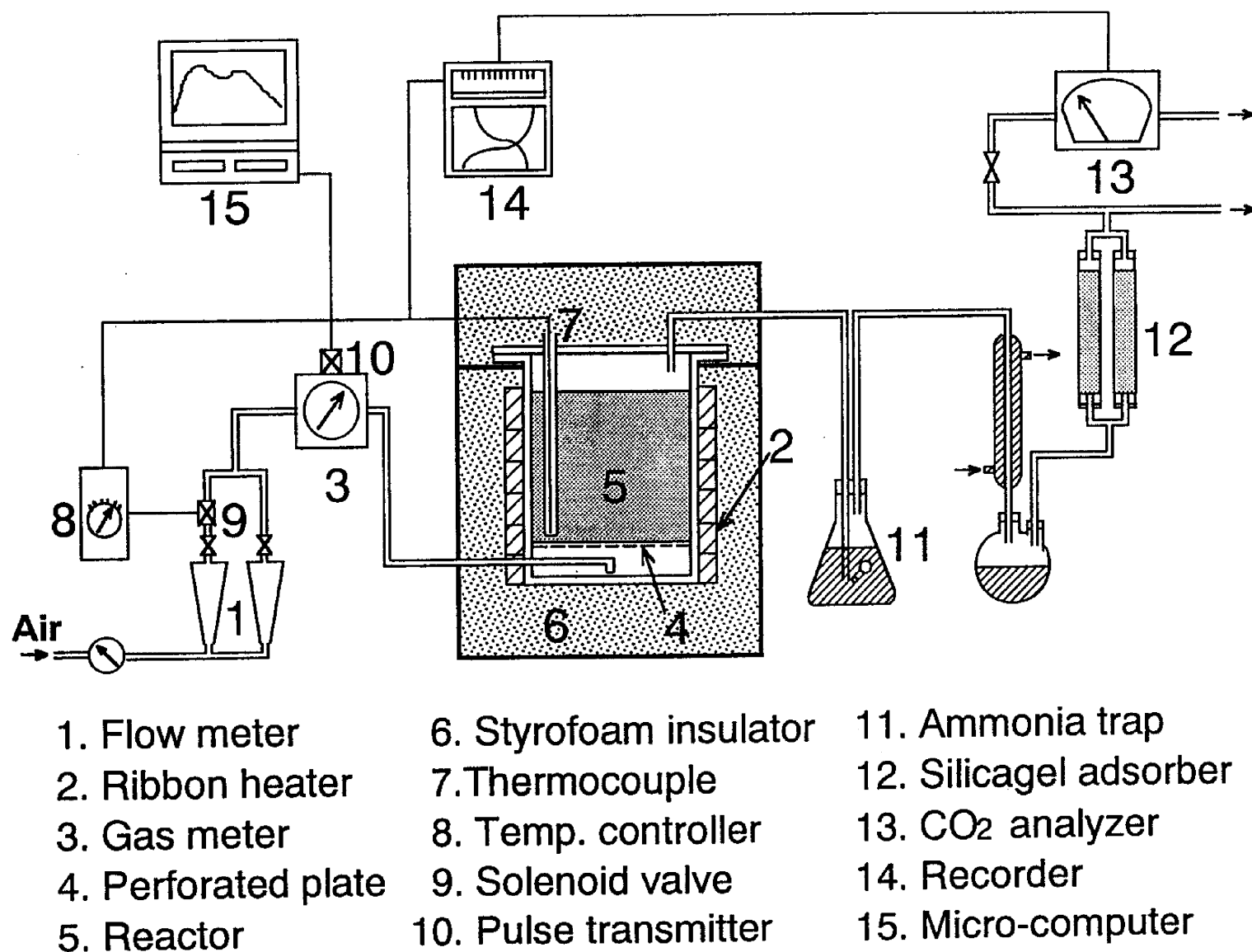


Fig. 1 コンポスト化実験装置の概略図

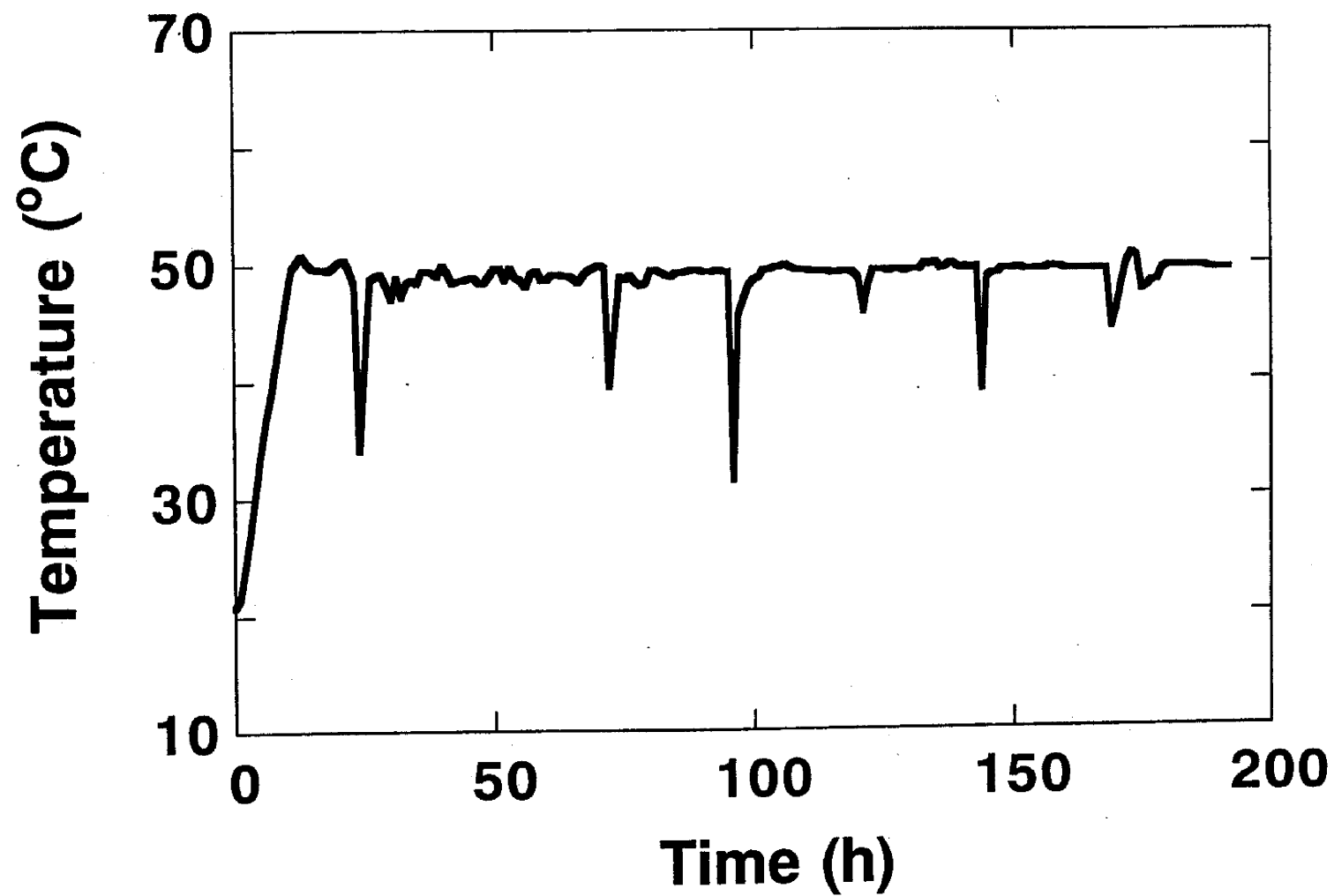


Fig. 2 コンポスト化過程における温度の経時変化

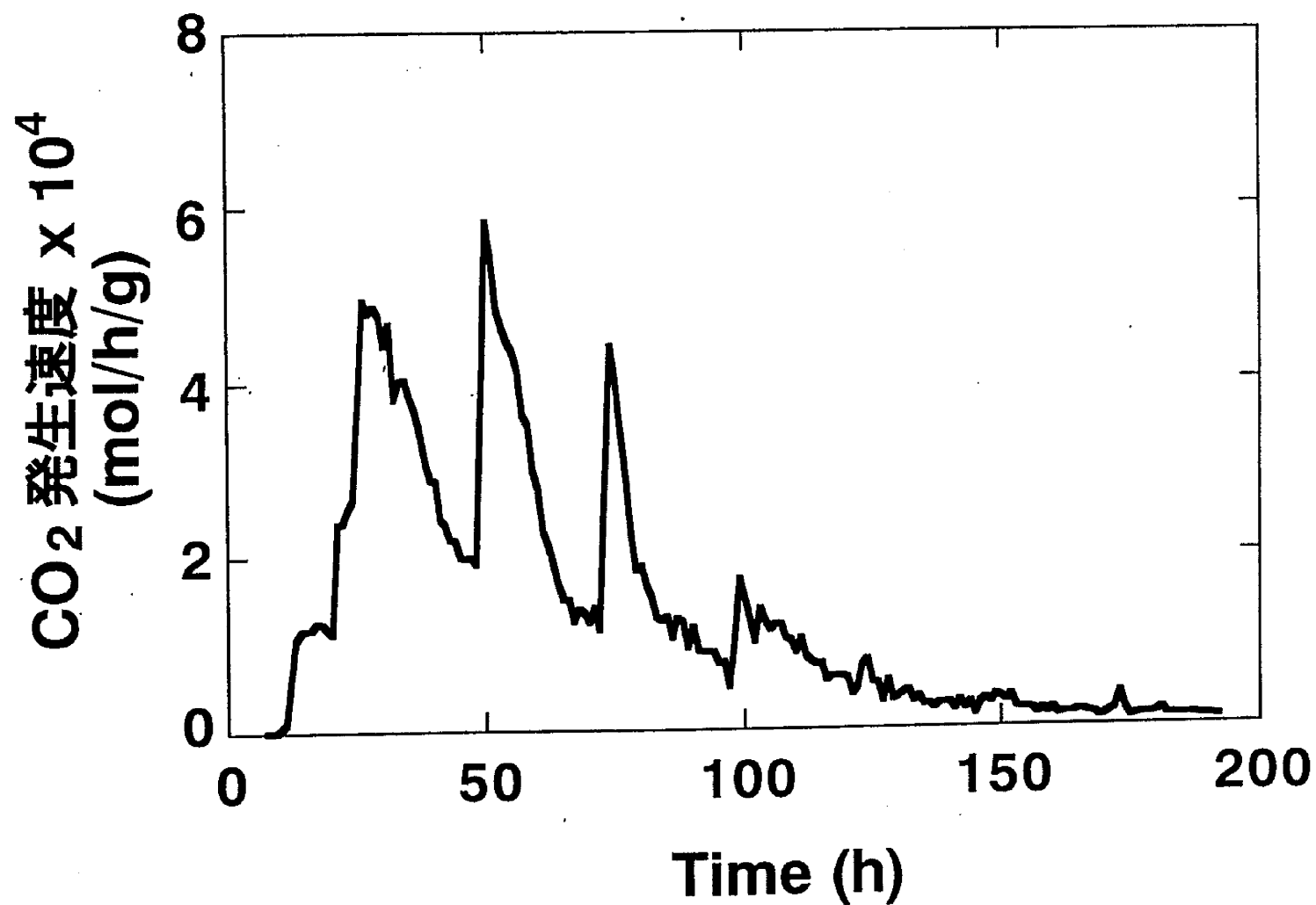


Fig. 3 コンポスト化過程における炭酸ガス発生速度の経時変化

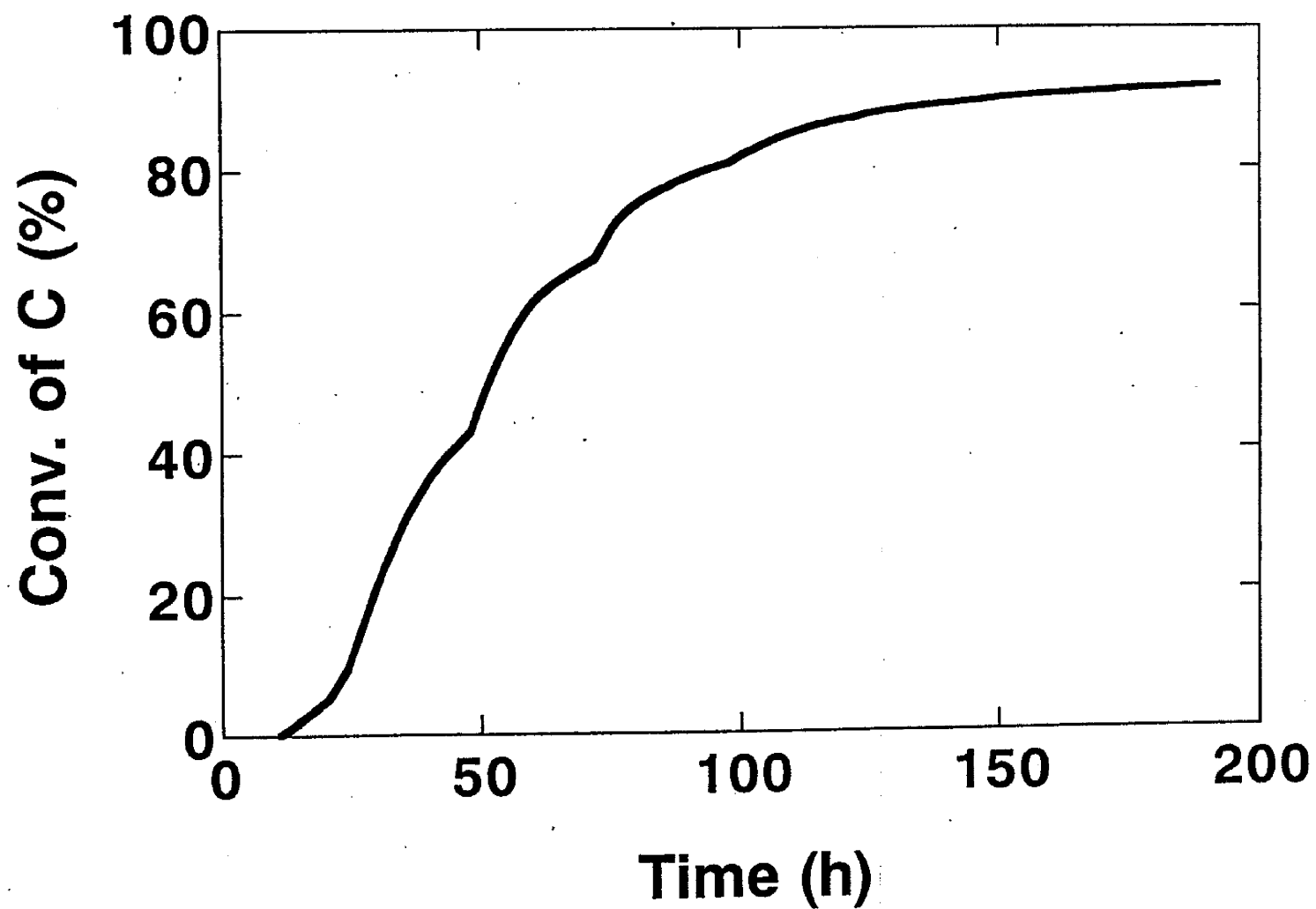


Fig. 4 コンポスト化過程における炭素変化率の経時変化

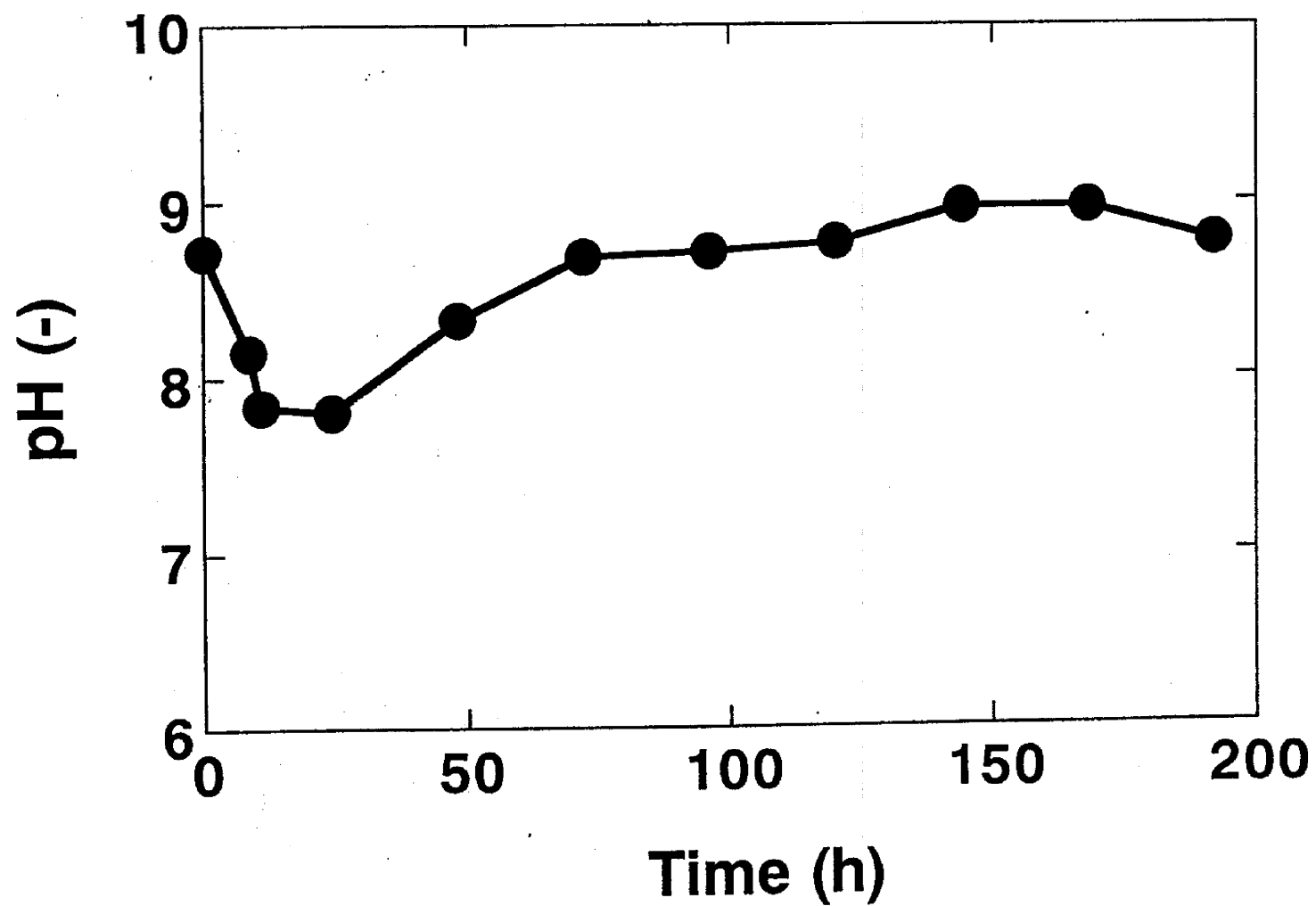


Fig. 5 コンポスト化過程における pH の経時変化

ORIGIN

```

1 ATGTTTAGAA ACACCAATAA AAGAATTCTT GCTTTTGTTA TTGTTGTTGC AATGTTAATG
61 TATTTTCATT CAACAATGAC TTTCGCAGTA GAAGAGGATA GCTCTCATCT CATTACCAAT
121 CAGGCTAAAA AGCCTTCAAC TGCAGGCGCC CTCAACTTC TAAACAAGAA CGGAGTTAAA
181 ACATTATGCG ACAAAGATGG GAACCTATA CAGCTTCGTG GTATGAGTAC CCACGGTCTT
241 CAGTGGTTTC CTGAAATAAT TAACAATAAT GCCTTTGCGG CTCTCTCCAA GGATTGGGGC
301 AGCAATGTTA TCCGTTTAGC AATGTACGTT GCTGAAGGCG GATATTCAAA AGACCCTGAA
361 ATAATTAAGA AAAGAGTAAT TGATGGAATT GATTAGCCA TTGCAAATGA TATGTACGTT
421 ATTGTAGACT GGCATGTACT TACACCAGGT GACCCAAATG CAGATGTATA TAAGGGTGCA
481 ATGGATTTC TCAAGGAAAT ATCCCAAAAG TACCCCAATA ATCCTCATAT AATATATGAA
541 TTGGCTAATG AGCCAAGCCC CAACGATCCG GGTGTTACCA ACGACGCAGC AGGTTGGGCA
601 AAAGTAAAAA GTTACGCAGA ACCTATAATA AAAATACTTC GTGACAGCGG TAATAAGAAAT
661 CTTATAATCG TTGGAAGTCC AAAGTGGAGC CAGCGCCCTG ATTTGGCTGC TGAAAAATCCA
721 ATAAACGACA ACAATACAGC ATATTCATTT CACTTTTATA GTGGAACGCA TAAAACTTCA
781 ACTGATAGCA CCGACAGAGG CAATATAATG AGTAATGCAA GATACGCTCT TGAACATGGT
841 GTAGCAGTTT TTTGCTCTGA ATGGGGAACT AGTGAAGCAA GCGGAAACAA CGGACCATAC
901 TTGAAAGAAG CAGATGAGTG GCTTGAATTT CTCAATGCCA ACAATATCAG TTGGATTAAC
961 TGGTCTCTTA CAAATAAGAA TGAACATCA GGATCGTTTA TACCTTTCAT ATCCGGCAAA
1021 TCAGATGCCA CAAACCTGAA TCCCGGAGAT GATCAGGTTT GGTCAATAAA AGAACTGAGT
1081 GTATCCGGAG AATATGCCCG TGCCAGAATA AAAGGTATAA AATACGAACC TATTGAGCGT
1141 TCCGAAAAAG AAGAGTTTAC AACAAATGTA TGGGATTTCa ATGATGGAAC GACTCAAGGG
1201 TTCGGTATAA ATGGTGACAG TCCGATTAAG GCTGACAGTA TCACCCTTGC AAATGAAAAA
1261 AATGCTCTTA AAATCACCAG CTAAATAAAC AGCAATGATC TTACAGAAGG AAAGTACTGG
1321 GCAAAATGTT GTCTTTCAGC TGATGGTACA AGCAATAAAC CTAACTTTT TGGTGACAGAA
1381 AAAGTAAACA TGGATGTTAT TACAGCTGCT CCTGCCACAG TATCAATAGC TGCGATTCCA
1441 CAGAGTTCAA CCCATGGTTG GCGGAATCCT ACACGTGCCA TTGCTGTAAA ACCAGCTGAC
1501 TTTGTAAAC AAGAAGATGG TACATATAAA GCAGTATTAA CAATAACACC GGCTGATTCA
1561 CCGAATTTTG ATTCTATAGC AAAAGACAGC AAAGATAGTA CAATGACTAA TATTATTTTG
1621 TTTGTTGGTG CGGATACAGA TGTTATTTCa CTGATAATA TAACTGTATC AGGAAACCGT
1681 GCTGTGGTAG AAGCACCTGT TGAACATGCT CCAATAGGAA AGGCAACTCT TCCTTCAACC
1741 TTTGAAGATT CAACCCGACA GGATTGGGCT TGGGATGCTA CCTCAGGAGT TCAGAGTGCC
1801 TTGACAATAA AAGATGCCAA CGAATCAAAA GCCATTTTCa GGGAAAGTTAA ATACCCTGAA
1861 GTCAAGCCAG TAGACGGATG GGCCTCAGCA CCTCGTATAA TGCTTGGTAA TGTAAATACA
1921 ACTCGTGGGA ATAACAAATA TCTTACATTT GATTTTATC TGAAGCCTAC ACAGGCAAGC
1981 AAGGGTCTC TTACAATAAG TCTGGCTTIT GCTCCACCAA GCCTTGGTTT CTGGGCGCAG
2041 GCAACAGGTG ATGTAAATAT ACCTTTATCA AGTTTAAGCA AAATGAAAAA AACCACAGAT
2101 GGGTTATACC ACTTCAGGT AAAATACGAT TTGGATAAAA TAAATGACGG AAAGTACTTT
2161 ACTGCCAATA CTGCTCTCCG TGATATTACA ATTGTTGTTG CAGACGGTAA CAGTGATTTT
2221 CCCGGTACTA TGACTTTGGA TAATATCAGG TTTGAAAAAT ACAGCAAAAC TGAACTTAAT
2281 AATTCCATAA CAATGTTGGT ATCAAAAGGT ATCATCAATA ACGCAGATGT TAAAAAATC
2341 AATTTTAATA GTAGCATTTT AAGAGGCGAG TTTTAAATGT GGATTGTTAA AACTTTAGAT
2401 TTGAATGCAA AATTTAGCTC AAATTTACAG GATGTTAATA AAAAAGGCAG CTAATATAAT
2461 TCAGTGGGTA TTGCCAAAGC ACTTGGTATT ACTAGCGGCG TCGGAAATAA TAAATTCAT
2521 CCTAATAAGG CAATAAGCCG CGAAGATATG TTGGTATTAA CCTATAAGC TCTGAAAAA
2581 GTAAATAAAA ATTTGGCTAA AGGTAATGCT AACGATTTAA ACAAATTTAC TGATGCTTCA
2641 AAGGTTTCAA AAAATGCTGT TGAAGTGCTA GCCACTATTG TAAAGAACGG ATTTTATTCA
2701 GGTGATGCAA AAAAAGTCAA TCCAAAAGCA TCTGTTGCAA AGTCTGAGGC TGCATTAAATG
2761 CTTATAAAA TATACTCTAG TTACATAAG TAA

```

//

Fig. 6 Cel Aの塩基配列

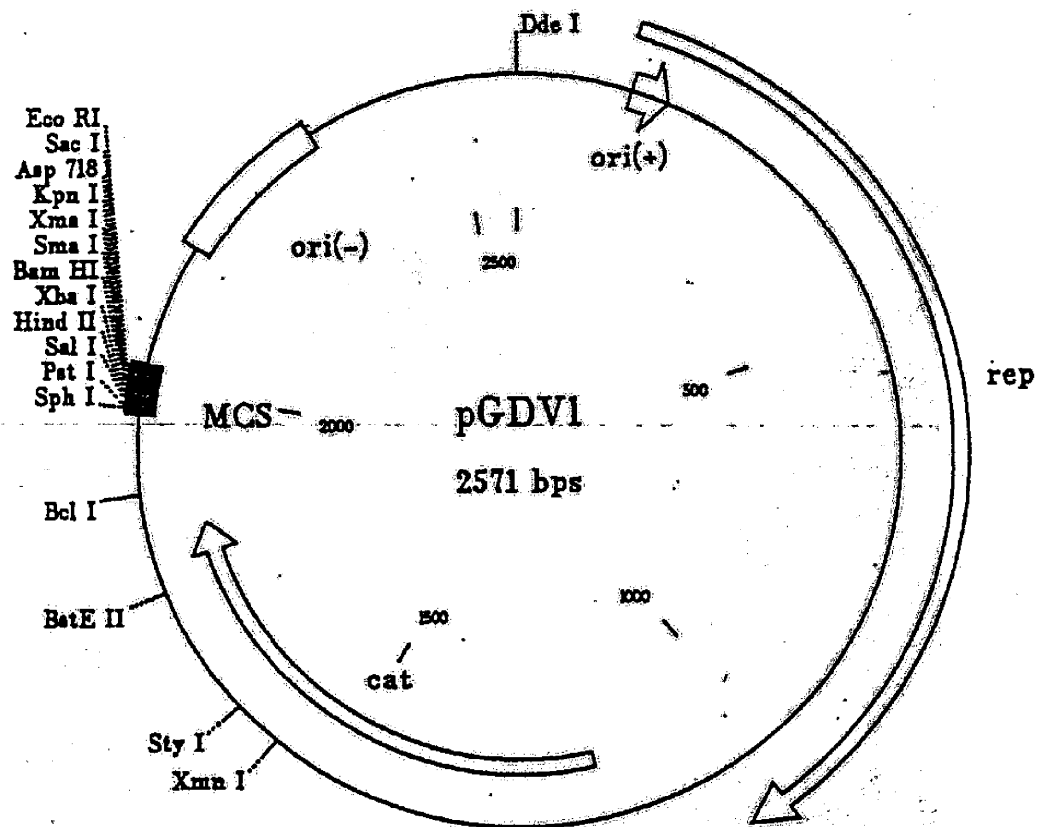
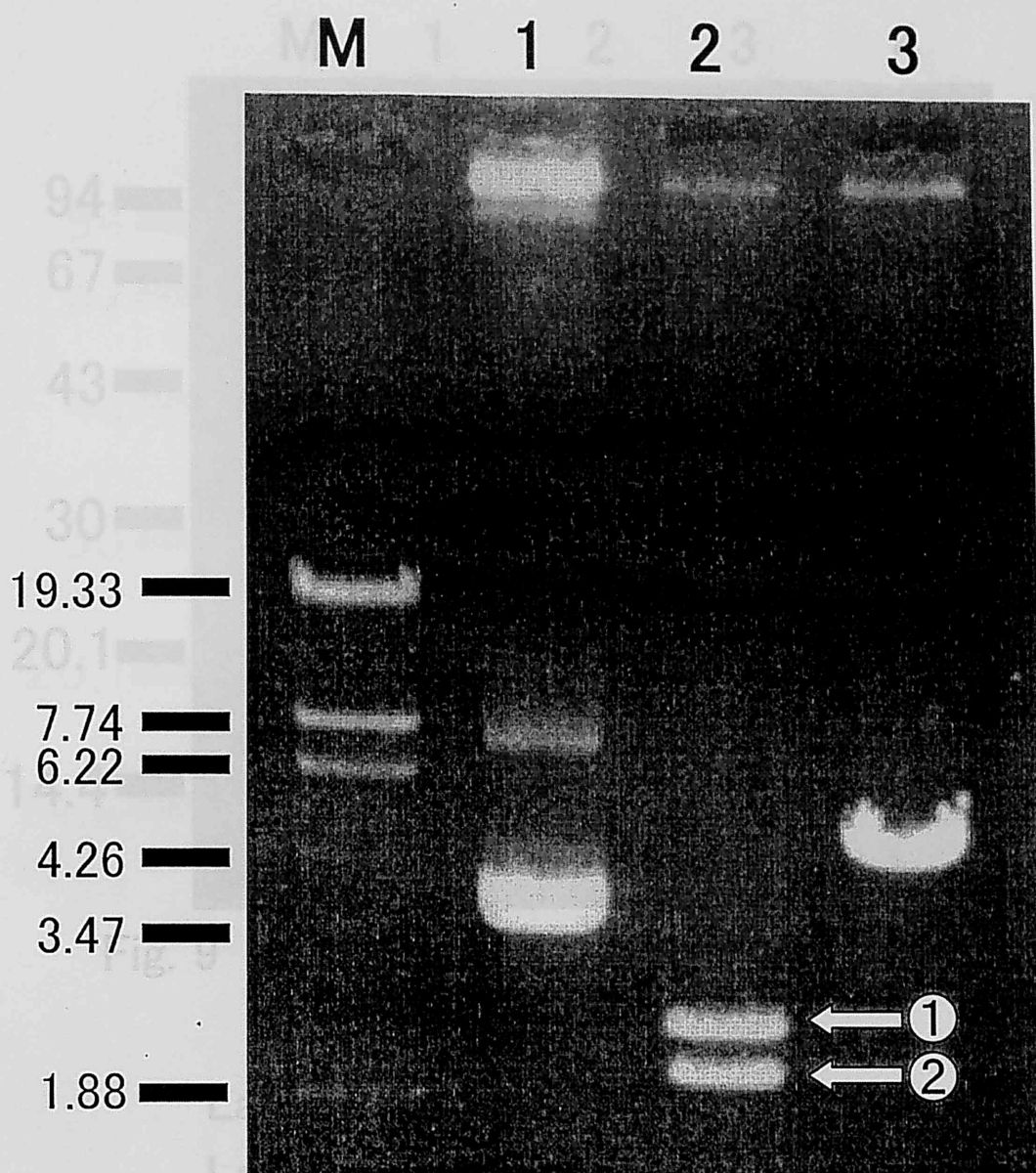


Fig. 7 pGDV1の制限酵素地図



M : Marker 6
 Lane1 : 組換えA8
 Lane2 : 組換えA8-Pst I、Sac I 切断
 (①: pGDV1由来、②: Cel A由来)
 Lane3 : 組換えA8-Bam HI、Xba I 切断

Fig. 8 Cel AおよびpGDV1のゲル電気泳動写真

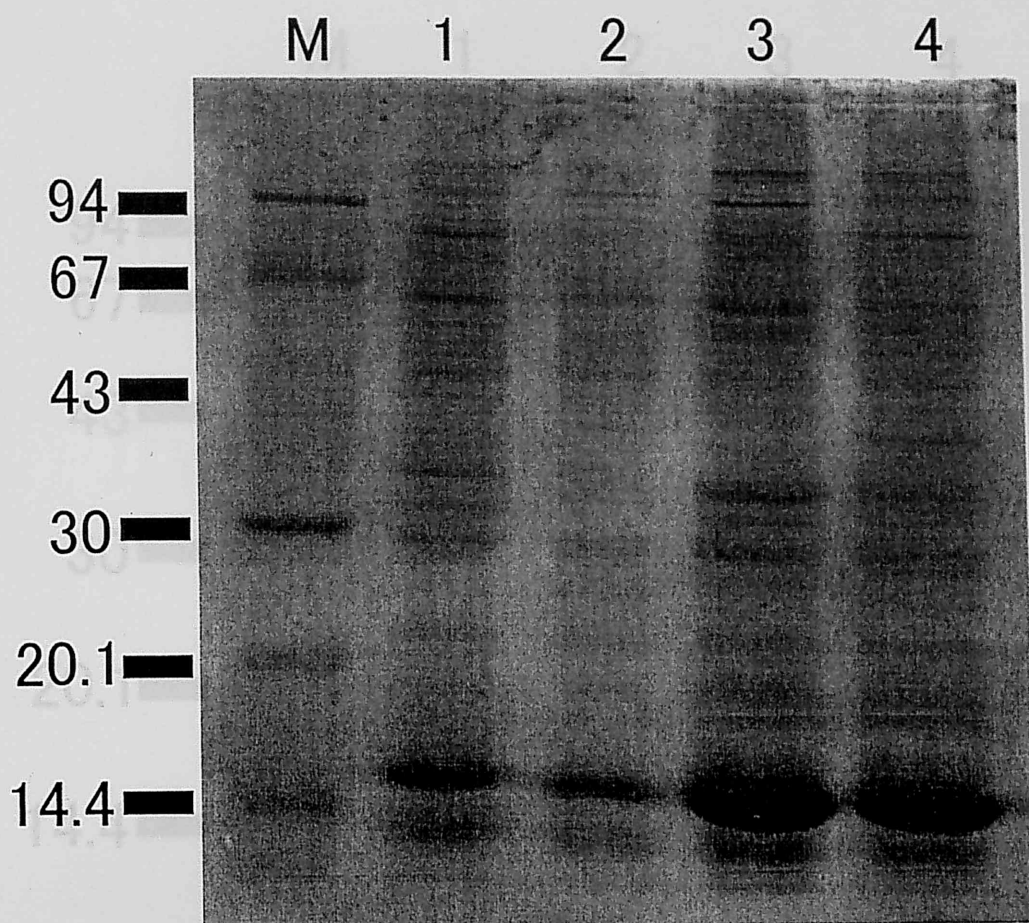


Fig. 9 SDS-PAGEを用いたタンパク質
の電気泳動写真

Lane1 : 宿主A8	}	粗抽出液
Lane2 : 組換えA8		
Lane3 : 宿主A8	}	BMC精製液
Lane4 : 組換えA8		

分子量マーカーはphosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumine (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin Inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400)

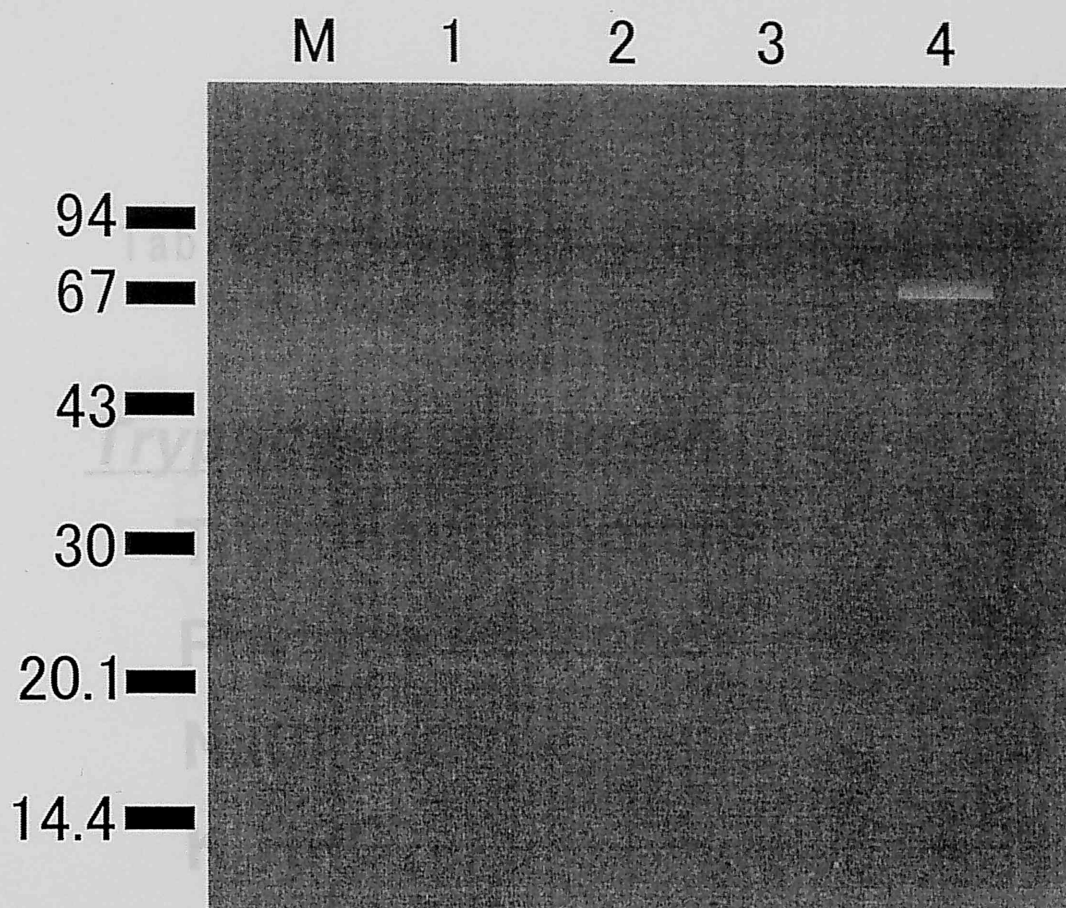


Fig. 10 SDS-PAGEの活性染色による
セルラーゼ活性の確認

Lane1 : 宿主A8	}	粗抽出液
Lane2 : 組換えA8		
Lane3 : 宿主A8	}	BMC精製液
Lane4 : 組換えA8		

分子量マーカーはphosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumine (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin Inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400)

Table 1 Trypticase soy brothの組成

Trypticase soy broth

Trypticase Peptone	17g/l
Phytone Peptone	3g/l
NaCl	5g/l
K₂HPO₄	2.5g/l
Glucose	2.5g/l
Agar	20g/l

pH=7.3

Table 2 LB brothの組成

LB broth

Polypeptone	10g/l
Yeast Extract	5g/l
NaCl	5g/l
Agar	15g/l

pH=7.0

Table 3 Penassay brothの組成

Penassay broth

Difco nutrient broth	4g/l
Peptone	2.5g/l
Yeast Extract	1.5g/l
NaCl	3.5g/l
KH_2PO_4	1.32g/l
K_2HPO_4	3.68g/l

Table 4 SMMPの組成

SMMP

・ 2 × SMM

Sucrose	1M
Maleic acid	0.04M
MgCl ₂	0.04M

・ 4 × Penassay broth

Table 5 DM3 brothの組成

DM3 broth

Sodium Succinate (pH7.3)	1M
Casamino Acid	5%(w/v)
Yeast Extract	10%(w/v)
K₂HPO₄	3.5%(w/v)
KH₂PO₄	1.5%(w/v)
Glucose	20%(w/v)
MgCl₂	1M
Bovine serum albumin	2%(w/v)
Agar	4%(w/v)