

*Burkholderia cepacia*からクローニングした キチナーゼ遺伝子の塩基配列決定

松田克礼*・豊田秀吉**・野々村照雄**・角谷晃司***・池田成志**
玉井隆行**・桑原精宏**・大内成志**

DNA sequence of chitinase gene cloned from *Burkholderia cepacia*

Yoshinori MATSUDA, Hideyoshi TOYODA, Teruo NONOMURA, Koji KAKUTANI,
Seishi IKEDA, Takayuki TAMAI, Yasuhiro KUWABARA and Seiji OUCHI

Synopsis

In this study, we cloned a chitinase gene from *Burkholderia cepacia* and identified a nucleotide sequence. A genomic library was constructed by the use of λ EMBL3, and then phage clones producing chitinase were selected by using 4-MU chitotrioside as a substrate. The inserted DNA was subcloned into a pBluescript vector with restriction enzymes to make pBlueCAK12 (4.4 kb) clone including a chitinase gene. The DNA fragment was deleted by exonuclease III and the chitinase-coding region was determined by chitinase activity detected by the use of 4-MU chitotrioside. The nucleotide sequence of chitinase gene (2.98 kb) was determined by primer walking method, in which ORF of chitinase gene was amplified by specific primers including the expected start and stop codons. The amplified DNA was inserted into a pBluescript vector, and then chitinase activity was detected by the use of 4-MU chitotrioside.

緒言

筆者らの研究室では、植物病害の生物防除法開発の一環として、キチン・キトサン分解性酵素を利用した植物病原糸状菌の特異的抑制¹⁾について検討してきた。その研究の中で、トマトの重要病害である土壌伝染性病原糸状菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* の細胞壁構成成分について物理学的に解析した結果、本菌の細胞壁は、キチン及びキトサンを主要構成成分としていることが明らかとなった²⁾。また、現在まで、土壌より分離したキチナーゼ生産性細菌 *Kurtzia zopfii* 及びキトサナーゼ生産性細菌 *Sphingobacterium multivorum* から、それぞれエンド型のキチナーゼ、キトサナー

ゼの生産遺伝子を分離し、その塩基配列を決定するとともに、それらの病原糸状菌細胞壁の分解効率を検討してきた。キチン分解性酵素は動物、植物及び尾生物に広く分布しており、尾生物起源のキチン分解性酵素は細菌、放線菌、カビから精製されているが、その分解に関する酵素の多様性や作用機構など、まだ解明されていない問題が少なくない¹⁾。また、これまで報告された尾生物起源のキチナーゼは、ほとんどがエンド型キチナーゼであり、エキソ型キチナーゼは精製されていないが、昆虫での脱皮時におけるキチン分解酵素の作用様式では、高分子のキチンを分解する過程において、様々なタイプのキチン分解酵素が協奏的に働いて相乗的な効果を発揮すると報

* 農学総合研究所 奈良市中町3327-204

** 近畿大学農学部農学科 奈良市中町3327-204

*** 近畿大学薬学総合研究所 東大阪市小若江3-4-1

告されている⁶⁾。そこで、本研究では、それら糸状菌細胞壁のより効率的な分解を目的として、異なるタイプのキチナーゼ生産遺伝子のクローニングを試みるとともに塩基配列の決定を行った。

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、濾過した。濾液をM9/キチン寒天培地と混合し、シャーレに分注して、30℃で7日間培養した。生育したコロニーの周縁に明瞭なハロー形成の認められたものをキチン分解性細菌として選抜した。その中で、最も分解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²⁰⁾。

[2]. キチナーゼ生産遺伝子のクローニング

1. AK-1株染色体ライブラリーの作製

a) 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Doty¹⁶⁾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) 液体培地で一晚振とう培養した。遠心分離によって回収した菌体を、0.01MのEDTA-2Na、27%のシヨ糖および、10mg/mlのリゾチームを含む1×SSC溶液に懸濁した。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緩衝液で飽和したフェノールを用いて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Sau3AIによる染色体DNAの部分分解とシヨ糖密度勾配遠心法によるDNAの分画

前項で抽出した染色体DNAを4塩基認識の制限酵素Sau3AIで部分分解した。反応は37℃で1時間行い、0.5MのEDTA (pH8.0)を加えて停止させ、電気泳動により核酸の分解状況を判断した。部分分解したDNA断片はシヨ糖密度勾配遠心法によって分画した。すなわち、10%、20%、30%および40%のシヨ糖を含む密度勾配遠心用緩衝液を遠心管に重層し、一晚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、水平ローターRSP-28 (日立製作所製) を使用して、15℃、122,000×gで20時間遠心分離を行った。遠心分離後の試料は遠心管底部に設けた穴から500μlずつ分取し、各分画に含まれるDNA断片長をアガロースゲル電気泳動により決定した。

c) 染色体DNA断片の *in vitro* packing

前項で得たDNA断片をλEMBL3ファージベクター(stratagene社製)に連結した。連結には、Ligation kit Ver.1(TaKaRa社製)を使用した。まず、染色体DNA断片を連結用緩衝液に溶解し、等モル比となるように1μlのλEMBL3DNA(1μl/1μg)を加えた。このようにして調製したDNA溶液(5~10μl)に等量のDNA Ligation KitのB液を加え、26℃で10分間反応させた。その後、エタノール沈殿によってDNAを回収し、TE緩衝液に溶解した。次に、GigapackII Plus Packaging Kit (stratagene社製)を使用し、*in vitro* packingを行った。操作は、Stratagene社の操作手順に従った。すなわち、得られたDNA溶液(5μl)を上記キットのFreeze-thaw extract溶液に加え、さらに15μlのSonic extract溶液を上記の混合液に加えた後、22℃で2時間反応させた。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固形培地で37℃、一晚静置培養し、得られたコロニーをNZYM液体培地に植菌し、37℃で4~6時間培養した。このようにして調整した宿主大腸菌を遠心分離で集菌し、10mMのMgSO₄に懸濁して前項で調整したファージ液と混合し、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、同固形培地に重層して37℃で一晩培養した。

2. 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、Robbins¹⁸⁾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株に感染させた後、125 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。また、選抜された陽性クローンは再び宿主大腸菌LE392株に感染させ、NZYM液体培地を用いて37°C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2 mlの基質溶液(0.1 mMのp-nitrophenyltri-N-acetyl- β -chitotrioside)を加え、37°C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1 mg当た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。

3. 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染色体DNA断片が挿入されており、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 IISK+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°Cで一晩振とう培養した後、増殖した菌体を遠心分離で集菌し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に再懸濁した後0.1%SDSを加えて溶菌した。その後、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°C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た結果、EcoRI-BamHIで切り出され、約4.4Kbの挿入断片を有するpBlue-CAK12を得た。

4. デリレーションクローンの作製

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、塩基配列を決定するためにHenikoff¹⁹⁾らおよびYanisch-Perron²⁰⁾らの方法を一部改変した方法によってデリーションクローンを作製した。まず、pBlueCAK12を50 μ l/mlのアンピシリンを含む液体LB培地に植菌し、37°Cで一晩振とう培養した後、塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心法でプラスミドDNAを精製した。すなわち、1 mlのプラスミド溶液に対して1 gの割合で塩化セシウムと80 μ lのエチジウムブロマイド溶液(10mg/ml)を加え、55,000 \times gで16時間遠心分離した。試料中のエチジウムブロマイドはイソアミルアルコールで抽出・除去し、その後TE緩衝液で透析した。このようにして精製したプラスミドを3'末端突出の制限酵素で切断し、さらに5'末端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°Cで15,30,60,120秒反応させた後、Mung Bean nucleaseおよびKlenowフラグメント処理を施し、最後にT4 DNA Ligaseで再環した。作製したデリーションクローンは大腸菌(JM109株)へ形質転換し、前項と同様に4-MUACを用いたキチナーゼの活性試験で選抜した結果、活性の認められる形質転換体、pBlue-BCC28を得た。

[3]. キチナーゼ生産遺伝子の塩基配列決定

1. シークエンシングに用いる鑄型DNAの調整

鑄型DNAとしてシークエンシングに用いるpBlueBCC-28は、アルカリSDS法を用いて抽出した後、ポリエチレングライコール6000(PEG)で沈降させてRNAを除去した。すなわち、pBlue-BCC28を液体L-brothで一晩振とう培養し集菌した後、200 μ lのGTE緩衝液に懸濁した。その溶液に300 μ lのSDS溶液を加え5分間静置した後、300 μ lの3M酢酸カリウム溶液を加えて5分間静置し、2 μ lのRNaseを加えて37°Cで30分間反応させた。その後、400 μ lのクロロホルムを加えて懸濁し、8,900 \times gで10分間遠心分離した後、溶液の上層を回収して蛋白質を除去した。次に、溶液に等量のイソプロパノールを加えて8,900 \times gで15分間遠心分離し、DNAを沈降させて回収した。回収したDNAは、32 μ lの超純水に

溶解した後、 $8\mu\text{l}$ の4M NaCl、 $40\mu\text{l}$ の13%PEGを順に加え、水中に20分間放置した。その後、 $8,900\times g$ 、 4°C で20分間遠心分離した後、TE緩衝液に溶解し、これを鋳型DNAとして、以後のサイクルシーケンシングに用いた。

2. pBlueBCC28挿入断片のシーケンシング

塩基配列の決定はSangerのdideoxy法¹⁹⁾に基づいて行った。まず、pBlue-BCC28を鋳型とし、プライマー標識サイクルシーケンス法によるシーケンシングを行った。すなわち、4種の異なる蛍光プライマー(ABI社製)を使用し、ザイモリアクターAB-1820(アトー社製)を使用してpBlueBCC28を増幅した。DNAの変性は 95°C で1分間、アニーリングは 55°C で1分間、伸長反応は 72°C で1.5分間行い、これらの反応を30回反復した。得られた増幅産物はエタノール沈殿で回収し、 70°C で2分間熱変性処理した後、DNAシーケンサー370A(ABI社製)を用いて6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。シーケンスラダーは、Vectra (HEWLETT PACKERD社製)で編集し、その波形から塩基配列を解析した。次に、明らかにした塩基配列を基に新たなプライマーを構築し、ターミネーター標識サイクルシーケンス法¹⁵⁾によるシーケンシングを行った。すなわち 500pmol に調整したpBlueBCC28、 3.2pmol に調整したプライマー、および $8\mu\text{l}$ のTerminator Ready Reaction Mix(ABI社製)を混合し、PTC-100(MJリサーチ社製)を使用してpBlueBCC28を増幅した。DNAの変性は 96°C で30秒間、アニーリングは 56°C で15秒間、伸長反応は 60°C で4分間行い、これらの反応を25回反復した。得られた増幅産物はエタノール沈殿で回収し、Template Suppression Buffer (TSR)に溶解した後、 95°C で4分間熱変性処理し、DNAシーケンサーABI310(ABI社製)を用いて電気泳動を行った。それにより、明らかにした塩基配列についてはプライマーウォーキング²⁰⁾を行い、順次、挿入断片の未同定の塩基配列を明らかにした。なお、蓄積した各々の配列情報はGENETYX-MACを用いて編集し、挿入断片全長塩基配列を決定した。

[4]. キチナーゼ生産遺伝子ORF領域のサブクローニング

決定した挿入断片のDNA領域からキチナーゼ生産遺伝子のORFを検索し、その中から最も適当なORFをPCR法により増幅した。すなわち、ORF領域の5'末端(開始コドン)と3'末端(終止コドン)に対応する配列にBamHI、EcoR I部位を付加したプライマーを構築し、各々を 10pmol に調整し混合した後、 50ng に調整したpBlueBCC28およびLA Taq with GC-Buffer (TAKARA社製)をTAKARA社の操作手順に従って混和し、PCR増幅を行った。反応は、 94°C で4分間DNAを熱変性させた後、 94°C で40秒間のDNA熱変性、 70°C で10秒間のアニーリング、 72°C で2.5分間の伸長反応を30回反復し、最後に 72°C で4分間反応させ、増幅産物両末端にアデニンを付加した。得られた増幅産物はpGEM-T Vector (Promega社製)へ連結し、Inoueらの方法¹¹⁾大腸菌JM109へ形質転換した。すなわち、JM109株を 20ml のSOB培地で $\text{OD}_{600}=0.4\sim 0.6$ になるまで培養し、10分間水冷した。遠心分離によって菌体を回収し、培養液の1/3容量のTransformation Bufferに懸濁して、さらに10分間水冷した。その後、再度遠心分離で菌体を集め、1/12.5容量のTransformation Bufferに懸濁し、最終濃度が7%になるようにDMSOを加えた後、10分間水冷した。このように調整した受容化大腸菌に、上記の組換えプラスミドDNAを導入した。すなわち、受容化大腸菌とプラスミドDNAを混和し、水中に30分以上放置した後、 42°C で30秒間ヒートショックし、即座に水中に戻して2分間冷却した溶液に 1ml のSOC培地を加え、 37°C で1時間培養した。菌体は遠心分離で回収し、形質転換用培地に塗抹し、 37°C で一晩培養した。得られた形質転換体のプラスミドDNAは、アルカリSDS法を用いて抽出した後、制限酵素(BamHI、EcoRI)で処理し、アガロースゲル電気泳動により分画した。得られたクローンについては、前項と同様に4-MUACを用いたキチナーゼの活性試験により形質転換体を選抜した結果、活性を有する形質転換体pGT-BCK19を得た。

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は、1986年にJones¹²⁾およびFuchs⁹⁾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、数多くのキチナーゼ生産遺伝子がクローニングされており、そのうち数十種のキチナーゼ生産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つの細菌から複数のキチナーゼ遺伝子がクローニングされている例も多く、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中にも、他の遺伝子の存在が示唆されていることから、キチナーゼ遺伝子を生産する細菌は、複数のキチナーゼ生産遺伝子を持つものが一般的であると考えられる。1992年にJashらは *S. marcescens* のキチナーゼ生産遺伝子で形質転換したタバコが、腰折病 (*Rhizoctonia solani*) に対する抵抗性を示したと報告した⁹⁾。一般に、キチン質を構成成分としない高等植物にはキチナーゼが広く分布しており、植物組織での病原菌細胞壁分解を誘導するとともに、病原菌の生育阻害物質であるファイトアレキシンを誘導する¹¹⁾。また、分解されたキチン質やその低分子化合物は抗菌作用を示すとともに、植物の自己防衛機能と植物の自己活性化機能を活性化する。これらの事実は、植物の抵抗性因子として、キチナーゼが重要な役割を果たしていることを示し、菌類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。そこで、本実験では、キチン分解性酵素についてより深い知見を得るため、新たなキチナーゼ生産遺伝子のクローニングを試みた。

[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尾生物が得られ、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、分解された尾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尾生物を分離し、分離菌のキチナーゼ生産を再度検討した。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 *Burkholderia cepacia* (AK-1株) が最も高い活性を示したので、以後の実験にはこのAK-1株を使用した。

[2]. AK-1株の遺伝子ライブラリーの作製

遺伝子ライブラリーを作製する場合、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、プローブ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λEMBL3を用いて遺伝子ライブラリーを作製した。すなわち、AK-1株遺伝子ライブラリーを作製するため、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、ショ糖密度勾配遠心法で分画して得た9~20KbのDNA断片をλEMBL3ファージベクターに連結して *in vitro* packaging を行い、約2104の組換え体ファージを得た。

[3]. キチナーゼ生産ファージのスクリーニング

AK-1株の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、Robbins¹³⁾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、基質として培地に添加した4-MUACをキチナーゼが分解し、その結果生じる4-MUを紫外線照射下で蛍光として検出した。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、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ボゾームに認識されたことを示している。

[4]. 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株由来の染色体DNA断片が挿入されており、その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pBluescriptII SK+へのサブクローニングを行った。その結果、約4.4KbのEcoRI-BamHI断片において活性の検出されるクローンpBlue-CAK12を得た。

[5]. デリションクローンの作製

pBlue-CAK12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、Exonuclease IIIを用いてデリションクローンを作製し、そのキチナーゼ活性について検討した。その結果、4-MUACを用いた活性測定試験において、紫外線照射下で蛍光を発するデリションクローンpBlue-BCC28を得た。Pblue-BCC28は2.98Kbの挿入断片(BCC28)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。

[6]. キチナーゼ生産遺伝子の塩基配列決定

上記の結果から、本実験で得たBCC28クローンにはキチナーゼ生産遺伝子の全長が存在すると考えられたので、その挿入断片の全長塩基配列を決定した(Fig. 1)。次に、決定したBCC28全長の塩基配列情報を基にキチナーゼ生産遺伝子のOpen Reading Frame(ORF)を検索し、検索結果から推測されるORF領域をPCR法により増幅した。また、得られた増幅産物はpGEM-T Vectorへサブクローニングした結果、4-MUACを用いた活性測定試験においてキチナーゼ活性を有するpGT-BCK19を得たため、本実験で分離したORFはキチナーゼがコードされていると結論し、本キチナーゼ生産遺伝子を**bcc1**と命名した。また、本研究で分離したキチナーゼ生産遺伝子(**bcc1**)について、現在までに報告のあるキチナーゼとの相同性を検索したところ、DNAレベルでは、本キチナーゼ遺伝子領域全体で*S. marcescens*のキチナーゼ(キトビアーゼ)生産

遺伝子(**chb**)と59.30%(Fig. 2)、*Enterobacto* spのキチナーゼ生産遺伝子(*Dinag*)と57.97%相同であった。また、本キチナーゼ生産遺伝子の1135-1276及び1327-1386の遺伝子領域内では、上記の2細菌のDNAと81-92%の間で高い相同性を示したが、他の細菌類とは相同性が認められなかった。また、アミノ酸レベルでは、本キチナーゼのアミノ酸領域全体で**chb**および*Dinag*のアミノ酸配列と47.57%相同であった(Fig. 3)。また、280-480のアミノ酸領域において、他20種の細菌由来キチナーゼのアミノ酸配列と35-63%の間で相同であった。そのうち、エンド型のキチン分解酵素が1種、エキソ型が1種、キトビアーゼが12種、作用様式の明らかにされていないもので6種の細菌が含まれた(Fig. 4)。以上のように、本研究で*Burkholderia cepacia* (AK-1株)より新規キチナーゼ遺伝子のクローニングに成功した。今後は、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い、クローニングしたキチナーゼ遺伝子**cbb1**との関係を解析し、植物病原菌の生物防除に利用するとともに、糖鎖工学を含む他の分野へ広く応用されることを期待したい。

```
1 GAGCGCAGC CGGTTGCGGC CGCCACGCCG CCGCGCGCGT TGCCGCGCGC CGCCGATGAG CACGCGTACT GCACCCCGCC 80
81 GATCCAATC GGCACGCCGTG CCCACCCGCC GTTCCGTAAC GCACGCCGCC GCGTGTGTA TCTCCGCGAG CTCATTGAA 160
161 AGACCCGAA CGCAGCGACG TCGCTCCAGG ACGCCGCCAC GCCCCCTTTT TCTCAGGAGT TCGAATGAAG CGTACCTTGC 240
241 CATCCTTGT TTGCCGCGCT GTTGATCGCG GCGCTGTGCG CGGTCCGAT CCGCCGCGAG CCGGTGTGGA CTGCCGCGCG 320
321 GGCACCATC GGCAGCACAA CCGGCCGCGC AACCGGCCAA TCTCGCGCGG CTGTTGTGGA ACGGCCTCGC GTTGCGCGTC 400
401 GCCGTGAC AACAACCAGC CCGCCGCGCG CCGCGTGCAG TGCCCGGATC TCGCGCGCGA CCGCGCGCGG TCGCGACGG 480
481 GCCCCTGA TCCTGCAGAA CCGCGGCCAT CAGCGGATCG CCGACGCCGG CTGGAAGCTC TACCTGCACA GCATCCGCCG 560
561 CCTGCTGCG GATCGACCGT CCGGGCTTGG CCGTCCGCGG GCTCACCGGC GACCTGTACG AACTGACGCC GCAACCTGGC 640
641 TCGGTGCGG CTTGCACCGG GCGAACGTAT CGAACTGCCG TTGCTGCCG AATACTGGCT GCTGCGCTAC AGCGACGTGA 720
721 TCCCGCGCC CGTACGTGGT CGTCCAGCGC GCGCCGCGCG CCGTGTTCG TTACAACGAC ACCGACGACG AGCTTCGCTA 800
801 CGTCGAATC GCTGCCGCGC GACGCGGAGA ACAACTCGAC CCGCAACGCG CCGCCCGTGG CCGCACGCGC CGACGCAACC 880
881 CGTCCGCTG CCGAGCGTGA AGCGCGAGCA GCGCTGCCG GGCACGCTCG ACCTGCGCGG CGTCGAACTC GCGCTGCCCA 960
961 ACCTGCCGG ACGCGCAGGT CCGCGCGCTG CCGATCGCG CGACGACACT CCGGCTCGAC GCGCGCGCGG TGCCGCTGTG 1040
1041 GGGCGCGGT CCGCGCGCGC CCGCTGCCG CCGACATCGC GACGCGCGGG GGCTACCGGG TCGCATCGG GCGCGCGCGC 1120
1121 GTGTTATC GAGGGTACG ATCGCGCGGG CCTCTACTAC GCGGTGCGA GCGCTTCTC GCTCGCGCGG GCGCGCGCGG 1200
1201 GCGCGATCC CCGCGATGCT CATCGAGGAT GCGCCGCGCT TCACGATCG CCGGATGCAC GTCGATCTCG CCGCAACTT 1280
1281 CAAGCACCC GCGACGCTG CCGCGCTGA TCGACCAGAT GAGCGGTAC AAGCTCAACC GGTGACACCT GCACCTGTCC 1360
1361 GACGACGAG GGCTGGCGCA TCGAGATTCC GCGCTGCCG GAGTGCAGG AGATCGGGG ACGCGCTGC CACGACCGGA 1440
1441 GCGAAACGC GCTGCCTGCT GCGCAGCTC GGCTCCGCG CCGACAACCG CTCGCGCGGG GGTACCTGA CCGCGACGA 1520
1521 CTAGTGGC GCTCGTGGC TACCGCGCGC CGCATTTCGT CGAGATCATC CCGAGATCG ACATGCCCGC GCATGCGCGC 1600
1601 GCGGCAGTC GTGACGATGG AGCGCGGCTA CCGCGCGCTG CATGCGCGCG GCGCGAGCA GGAAGCGAAT GCATACCGGC 1680
1681 TGCTCGATC GCGAGGACAC GTCGAACCTG ACGACGGTGC AGTTCTACGA CCGCGCAGG GACCTGAACC CGTCCGTGCC 1760
1761 GGGCGCGCT CAATTTGCA TCGAAGGTGA TCGCGAGAT CCGCGCGATG CATGCGGATG GCGAGCGCC GCTGCACATC 1840
1841 TGCCATTAC GCGCGCGACG ACGCGAAGAA CATCTTCCTC GCGCGGGCT TCCAGCCGCT GAACGCGACC GACCCGAACA 1920
1921 AGGGGCGCA TCGATCTCG CCGCGAGGAC AAGCGTGGG CCGGTTCCGC CCGTGCACG GCGTGTCTCC AGCGCGCGGA 2000
2001 AATCAAGTC GATCGACGAA CTGCCGACGC GTTTCGCGCA ACAGGTGAGC GCGCGGTCA ACGCGAACGG GATCGACAGC 2080
2081 ATGGCCGCG TGGCAGGACG GCATCAAGCA TCGAAGCGGG CCGCAGGACT TCAGCACGCG TCACGTGATG GTGTCGCTGT 2160
2161 GGGACACGA TCTTCTGGG CCGATCGGAC AGTGCACGCG ACCTGAGCGG CAAGGGCTAC CTGACGGTGC TCGCGCTGCC 2240
2241 CGACTACCT GACTTTCGAC TTCCGTTACA CCGTCAACCC GCGCGAGCGC GGCTACTACT GGGGCTCGCA CCGACGCGAC 2320
2321 GAGTACAAG GTGTTCTCGC TCGCGCGGGA GAACCTGCCG CAGAACGCGG AAGTGATGGG CGACCGTAC GCAACACGT 2400
2401 TCGAGTCA CCGGACGCGG CCGCGCGCG CCGATCGAAG GCATGCAGGG GCAAGCGTGG GCGGAGGTGA TCGCAACGA 2480
2481 CACGTTCT CGAATACATG GCCTATCCG GCGTGTGCG GCTCGCCGAG CCGCGTGGC ACCGCGCGGA CTGGGAGCTG 2560
2561 CCGTACGCG GCCGCGTGC GCTACAAGCG CCGCGACACG CATCACGTCG ACACGCGCGC GCTGCAGCGC GACTGGGCGG 2640
2641 GATTGCGGA CGTGTCTAC GCAACGCGAA TTGCCGAAAG TCGACCGGGC CCGCGTGGG TACCGGAAGC GCACCTTAC 2720
2721 GCTGACGAA CCCGTGAACG GCTGAGCGAT TGAACGGTTG AGCGATACGC GATGCGGGG AACGCATCG GCAATCGCCC 2800
2801 CGCCAAAGA AAAACGGCTT GCGACGATC GCAAGCGTT TTGTTTTCG CCGCGCGCC GAAGCGCGG TTCATCGCAT 2880
2881 CAGCGCGCG TGGCGCGCG CCGCGTGC CCGCGCGCG ACGCGCGCG CAGCTGCTC GGCATAACGT GCCCGCGGT 2960
2961 TGCCGAGA CGATGTGAA CGTGTGAGC GACACCCAG CAGATCGAG CCGCCC 3016
```

Fig. 1 Nucleotide sequence of the chitinase gene cloned from *B. cepacia*.

```

1' ATGAAGCGTA CTTGTTCATC GTTGTTCATC GGCCTGTGTA TCGCGGGCT GTGCGGGTC GCGAT-CGGC GCGAGCGCG TG-TGACTG CCGCGCGCG ACCATGGCA GCACAA-CGG
*****
1' ATGAAGCGAT TCAAACTGAG CCGCTTGGC CGCTTGACG CAACGATGGG ATTCTGGGG GGTATGGGA GCGCATGGC CGATCAACAG CTGTGTGATC AACTGAGCCA GCTGAAGCTG
118' GCGCGGCAAC GCGCAATCT CGCGGGCGCT TTGTGGAAG GCGTGGGCT GCGCGTGGC GTGCGAACA ACCAGCGCG -CGCGCGCG GCGTGGGTC GCGGATCTCG CCGCGGACGG
* * * * *
121' AACGTGAAA TGCTGGAT- AACCGCGCG GCG-AAAAG GCGT-GGATT GCGCGGGCT G-GCGCGT ACTGGCTTC TTGCAACGG -GTGTGTTC ACC-C--TCA GCAACGACGG
237' GCGCGGTCG G-CGAC-GG GCGCGCTGAT C--GTGCA A-ACGCGCG -CATGAGG- GATCGCGAC GCGCGTGGG AG-GTC-TA CCGTGCACG -ATCGG--CC GCGTGTGCG
* * * * *
231' CAGCGCGATC GAGCGCAAG ACTGGGTAT CTATTTCAC AGCGCGCGC AGACCTTGG GGTGGACAAC GACGAGTTCA AGATCGCGCA TGTGACCGCG GATCTGTACA ACCTGAGCC
342' GATCG--ACC GTGCGGGCT GCGCGTGGG CCGCTCACG GCGA--CTG TACGACTG- ACGCGCGAC GTGGCTGGT CCGCGTTGCA CCGCGCGAAC GTATCGAAT CCGGTTGCTG
* * * * *
351' GACCGCAAA TTGCGGGT TCCCGCGGG TAAGCGGGT GAAATCCGG TGGTGGCGA ATACTGGCAG GTTTCAGAA CCGACTTCT GC-CGCGTT GTATGCCAC TCCG-GGAC
457' GCGCAATCT GCGTGGCTG CTACAGCGC GTGATCCCG CCGCTAGCT GGTGGTG-A CCGCGCGCG CCGCGG-GT- GCTTGTTC AACGACCCG ACGAGGAGCT GCGGCGACG
* * * * *
469' GCGAAGCGA AAATGCTGG GAATACCGC --ACCGAAA ACCTGGATCA GTTGTGGG CCGTTCAGG GCGACGAGT GAAGCGACC AAGGACGACA AAACACTTGT GATG-ACGCG
574' GAATGCGTC CCGCGCGAG GCGAACAAC TCGACCGCA AGCGCGCGC GGTGGCGCA CCGCGCGAC CAACCGTGC GGTGGCGAGG GTGAAGCGG AGCAGCCGCT GCGCGCGACG
* * * * *
585' G--GCT-T GCGCGTTG- TCAGCA-ATG CCGATCGC- AGACGCTGC CCGCGCGCG GTGCGCGCA AGATGCTGC GACGCGGA--TGAG-GTG AAGTCCAC- GCACGAGCG
694' CTGCACTGC GC--GGCGT CGAACTCGG CTGCCAACC T--GCG GACGCGCAG GTGCGCGCG TCGCGATCG CCG-GACGAC ACTCGGGCTG GACGCGCGG GCGTGGCGGT
* * * * *
692' C-CGACTGC GCAAAAGGAT GCGCTGGAT CTGAGCACG TGGTCAAGC GCGCGCGGAC GTGCTCAGT AGG-TTTC CCGCTGGG CBTGGCGGT CAGACCAAG GTTACCGAT
804' GCGCGCGCG GTGCGCGCG CCGCGCTGC GCGCGACATC GCGAGCGCG GCGCGTACG GCTCGCATC GCGCGCGCG GCGTGTTCAT CAGCGCTAC GATCGCGCG CCGCTACTA
* * * * *
810' CAAGCTGAT ATCGACCGG GCAAGTTAA AGCGGGATG CCGGTATCG GCGCGTATGA GCTGAAATC GCGCAAAAG AGCGCAAGT GATCGCGTC GCGCGCGCG GCGTGTTCAT
924' CCGCGTGCAG ACCTCTTCT CCGTGGCGG G--CGC GCGCGCGCA TCCCGGGAT GCTCATCGAG GATCGCGCG GCTTACGCA TCGCGGGATG CAGCTGATC TCGCGCGAA
* * * * *
930' CCGCGTGCAG TCGATCTGT CBTGATGCG GAGCGCGCG AGCGCAAGA TCGCGACGT GCGCGCGCG GATCGCGCG GCTTCCGTA TCGCGCGATT TTCTCGACG TCGCGCGGAA
1041' CTTCAAGCAC CCGCGCGAC TCGCGCGCT GATCGACCG ATGAGCGGT ACAAGCTCA CCGCGTGCAG CTGACCTGT CCGACGCGA GCGCTGGCG ATCGAGATT CCGCGTGC
* * * * *
1050' CTTCAAGAA ATCGACCGG TCGTGGCT GCTGATCG ATGCGCGCT ACAAGCTCA TAAATTCAC TTCCACCTGA GCGATGAGCA AGCGTGGCG ATCGAGATT CCGCGTGC
1161' CAGCGTACC GAGATCGGG GCGCGCGCT CCGCGCGCG AGCGAAGCG GCGCGTGC GCGCGAGTC GCGCGCGCG CCGCAACCG CTGCGCGCG GCGTACTGA CCGCGCGA
* * * * *
1170' TGAGTTCAG GAGTTCGGG GCGCGCGCT CCGCGCGCG AGCGAAGCG CCGCGTGC GCGCGAGTAC GCGCGCGCG GCG--AGT CTAC--GCG GCGTCTTCA CCGCGCGA
1281' CTAGTGGCG CCGTGGCT AGCGCGCGC GCATTTGCT GAGATATCC CCGAGTGA CATGCGCGCG CATGCGCGCG CCGCGTGT GAGGATGGG CCGCGTACC CCGCGTGC
* * * * *
1284' CTAGTGCAC ATCATCAAT AGCGCGCGC GCGCGAGT GAGTATCC CCGAGTGA CATGCGCGCG CCGCGCGCG CCGCGTGT TTGATGAA GCGCGTATA AAAAGTGA
1401' TCGCGCGCG CCGCGCGAG AAGCGAATG ATCGCGCGT CTGATCGCG AGCACGTC GAACCTGAG CCGCGCGCT TGTAGACG CCGCGCGCG CTGAACCGT CCGTGGCG
* * * * *
1404' TCGCGTGCAG AAGCGAGG AGCGCAAGA ATTGGTCTG GTGATCGA CCGATACCT CAACACAGC TCGTGGCT TCTTAAAG CCGAGGATC CTGAACCGT CCGTGGATC
1521' CCGCGTCAAT TTGCGTGA AGTGTGCG CCGAGTGGC CCGATGCG CCGATGGCA GCGCGCGCT CACATGCG ATTAGCGCG CCGCGCGCG ABAACATCT TCGTGGCG
* * * * *
1524' CCGCGCGCG TTGCGTGA AGTGTGCG CCGAGTGGC CCGATGCG AAGAGCGCG CCGCGCGATC AAGCGTGC ACTTTGCG CCGATGAGG AAAAATCC GCGTGGCG
* * * * *
1641' GCGTTCAG CCGTGAAC GCACC-GACC CCGAAGCG GCGCGTGC CTGCGCGCG AGCACAGCG GTGCGCGCT TCGCGCGCG GCGCGCGCT GCTCGCGCG GCGAATCA
* * * * *
1644' CCGC-TATC CCGAAGCG AAGCGAAG CCGGTAAGC CATCATGAC CAGAGTATG AAGACAAGC GTGCGCGAG TCGAGGTTG CCGAGAGAT GATCAAGAG GCGAAGTAG
1760' AGTGCATGA CCGACTGCG CCGCGTTTC GCGAAGGT GCGCGCGCG GTCAACGCG ACAGGATGA CAGATGCG CCGTGGCG AGCGATCA GATGCGAG GCGCGCGAG
* * * * *
1763' CCGAGTGA GCGACTGCG AGCTACTTC GCGAGAGT GCGAAGCTG GTGAGCGCG ACGGATGA TAGAATGAG GCGTGGCAG AGCGCTGA AAGCGCGAA AGTTCGAG
1880' ACTTCAGCA GCGTCACTG ATGTTGCG TGTGGGAC GATCTTCTG GCGCGTGC ACAGTGCAG CCGACTGAG GCGAAGGCT ACCTGACGT GCGTGGCG CCGACTAC
* * * * *
1883' GGTGGCAC CTGCGCGCG GCGTCACT TGTGGGAC CCGTGTTCG GCGCGTTTC ACAGCTTAA CCGACTGAG AATAAGGT ATGAGTGT GGTCTGCA CCGACTAC
2000' TGTACTGA CTTCCGTC ACCTCAAC CCGCGCGCG CCGCTACT TGGGCTGC CCGCGCGCG CAGATCAAG GTGTTCTGC TCGCGCGCG GAACCTGCG CAGAACCG
* * * * *
2003' TGTACTGA CTTCCGTC GAGTGAAT CCGCGCGCG CCGTACTAC TGGGCGCC GCTTCAGCG CAGCGCGAG GTGTTCACT TCGCGCGCG CAACCTGCG CAGAACCG
2120' AAGTATGG CCGCGTGC GCGAAGCT TCGAGTGC GCGC-ACGG CCGCGCGCG CCGATGAA GCGTGCAG GCGAAGCT GCGCGCGCG TCGCGCGCG CAGCTTCT
* * * * *
2123' AAACCTGCG CCGCGCGCG GCGAAGCT TCGAGTGC CCGC-ACGG CCGCGCGCG CCGATGAA GCGTGCAG GCGAAGCT GCGCGCGCG TCGCGCGCG CAGCTTCT
2239' GAATACATG CCGTTCGCG GCGTGGCG CTGCGCGCG CCGCGTGC CCGCGCGCG TGGGCGTGC CCGTGCAG CCGCGCGCG TCGAAGCG CCGAAGCG TCGCTGCG
* * * * *
2242' GAATACATG TCTTCCGCG CCGCTTTC GTGCGCGCG GCGTCTGCG CCGCGCGCG TGGGCGAG ACTATGCG CCGCGCGCG TCGAAGCG GCGAAGCG CTTTGTGAT
2359' ACAGCGCG TCGAGCGCG CTGCGCGCG TTGCGCGCG TCGTCAAGC ACGCGAATT CCGAAGTGC ACCGCGCG CCGTGGATC CCGAAGCG CCGTCAAGCT GCGAAGCG
* * * * *
2362' ACCAGCGCG TCGAAGCG CTGCGCGCG TTGCGCGCG TCGTGGCG ACGTGAAGT GCGAAGTGC ACGAAGCG CCGTGGATC CCGTGGCG TCGCGCGCG CCGTGGCG
2479' TGA
2482' GCGCGAAG TCGAAGCG TCGCGCGCG CCGGATTC GCGTGAAG TCGAAGCG

```

Fig. 2 Comparison of chitinase genes cloned from *B. cepacia* and *S. marcescens*.
 First nucleotide sequence; *B. cepacia* (*ccb1*) ORF
 Second nucleotide sequence; *S. marcescens*. (*chb*) ORF

```

1' MKRTLPSLFA GLLIAALSPV AIGAQPSTA GAAPSAQAQPA AQPANLAALL SNGLALRVAV
1"          MNAFK LSALARLTAT MGFLGGMGSA MADQQLVDQL SQ-LKLNVKM
61' DNNHAAAAGV PCADLGADGA ACATGRLIQ NRGHQAIDG GIWKLYLHSIR RLLRIDRPGF
45" LDNRAGENGV DCAALGADWA SCNRVLF TLS NDG-QAIDGK DWVIYFHSPR QTLRVDNDQF
121' ALRRLTGDLV ELTPOPGSVR LAPGERIELP FVAEYWLLRY SDVIRPRYVY VDGAPPAVLR
104" KIAHLTGDLV KLEPTAKFSG FPAGKAVEIP VVAEYWQLFR NDFLPRWYAT SGDAPKMLA
181' YNDTDELRY VESLPAD--- --AQNNTGN APPVAARPA T-RALPSVK- REQPLPGTL-
164" NDTENLDQF VAPFTGDQWK RTKDDKNILM TPASRFVNSA DLQTLPAGAL RGKIVPTPMQ
233' -----DL R-GVELALPN LPDAQVAALR DRATTLG--L DGARVPVWGA VAPRRLPADI
224" VKVHAQDADL RKGVALDLST LVKPAADVVS QRFALLGVPV QTNGYPIKTD IQPGKFKGAM
282' ATPGGYRLAI GPRGVFIEGY DRAGLYYGVQ TLFSLAPA-G GGAIPAMLIE DAPRFTHRGM
284" AVSGAYELKI GKKEAQVIGF DQAGVYGLQ SILSLVPSDG SGKIATLDAS DAPRFPYRGI
341' HVDLARNFKH PATLRLRIDQ MSAYKLNRLH LHLSDDEGWR IEIPGLPELT EIGGRRCHDP
344" FLDVARNFHK KDAVLRLLDQ MAAYKLNKFH FHLSDDGWR IEIPGLPELT EVGGQRCHDL
401' SETRCLLPQL GSGPDNRSGG GYLTRDDYVA LVRYAAAHFV EIIPIDMPA HARAAVTME
404" SETTCLLPQY GQGPD--VYG GFFSRQDYID IKYQAQRI EVIPEIDMPA HARAAVSME
461' ARYRRLHAAG REQEANAYRL LDPQDTSNLT TVQFYDRRSN LNPCVPGALN FASKVIREIA
462" ARYKKLHAAG KEQEANEFRL VDPTDTSNTT SVQFFNRQSY LNPCLDSSQR FVDKVI GEIA
521' AMHADAQAPL HIWHYGGDEA KNIFLGAGFQ PLNGTDPNKG RIDLAAQDKP WARSPACTAL
522" QMHKEAGQPI KTWHFGGDEA KNIRLGAGYT DKAKPEPGKG IIDQSNEKPK WAKSQVCQTM
581' LORGEIKSID ELPTRFAQQV SAAVNANGID TMAAWQDGIK HANGPQDFST RHVMVSLWDT
582" IKEGKVADME HILPSYFGQEV SKLVKAHGID RMOAWQDGLK DAESSKAFAT SRVGVNFWDT
641' IFWGASDSAR DLSGKGYLTV LALPDYLYFD FPYTLNPRER GYYWGSHTAD EYKVFSLAPE
642" LYWGGFDSVN DWANKGYEVV VSNPDYVYMD FPEYVNPDER GYYWGTFRFSD ERKVFSAFAD
701' NLPQNAEVMG DRDGNTFEVT GTGPAPRIEG MGGQAWGEVM RNDTFLEYMA YPRLLALAER
702" NMPQNAETSV DRDGNHFNK SDKPWPGAYG LSAQLWSETO RTDPQMEYMI FPRALSVAER
761' AMHRADWELP YAAGVRYKRG DTHHVDTAAL QRDWAGFATL LTQRELPKLD RAGVGYRKPT
762" SWHRAGWEQD YRAGREYKGG ETHFVDTQAL EKDWLRFANI LGQRELAKLD KGGVAYRPLV
821' FTLTNP
822" PGARVAAGKL EANIALPGLG IEYSTDGGKQ WQRYDAKAKP AVSGEVQVRS VSPDGKRYSR

```

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences deduced from the *ccb1* and *chb* genes.
 First amino acid sequence; *B. cepacia* (*ccb1*)
 Second amino acid sequence; *S. marcescens* (*chb*)
 Large dots (*) are identical, whereas small dots (.) are similar among the sequence.

引用文献

1. Bailey, J.A., J.W. Mansfield (eds.) "Phytoalexins", Halsted, Wiley, New York (1982). Technology. (Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W. eds.) pp.223-230. Ancona, Italy.
2. Devin, S.E., and Boeke, J.D. 1994. Efficient integration of artificial transposons into plasmid targets *in vitro*: a useful tool for DNA mapping, sequencing, and functional analysis. *Nucleic Acids Res.* 22:3765-3772.
3. Devin, S.E., Chisoe, S.L., Eby, Y., Wilson, R.K., and Boeke, J.D. 1977. A transposon-based strategy for sequencing repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Genome Res.* 7:551-563.
4. Dziadik-tumer, 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.*
5. 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.
6. Fukamizo, T., K.J. Kramer: Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid, *Insect Biochem.*, 15, 1-7 (1985).
7. Fukamizo, T., K.J. Kramer: Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid, *Insect Biochem.*, 15, 141-145 (1985).
8. Fukamizo, T., Sonoda, K., Toyoda, H., Ouchi, S., and Goto, S. (1990). Solid state C-NMR analysis of cell components of *Fusarium oxysporum*. *Agric. Biol. Chem.* 54:2761-2762
9. Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted break points for DNA sequencing. *Gene.* 28:351-359.
10. Hadwiger, L.A., D.F. Kendra, B.W. Fristensky, W. Wagoner: Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in *Funji*, *Chitin in Nature and technology* Ends. R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G.W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 209-214 (1986).
11. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96:23-28.
12. 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.
13. 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. Jeuniaux, and G.W. Gooday, eds.). 55-62, Cold Spring Harbor, New York.
14. 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.
15. Marra, M., Weinstock, L.A., and Mardis, E.R. 1996. End sequence determination from large insert cloning using energy transfer fluorescent primers. *Genomic Methods.* 6:1118-1122.
16. Neu, H.C. and Heppel, L.A. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts.
17. 長 祥隆 (1995). キチン・キトサン. キチン・キトサン研究会編 pp:96-103 技報堂出版株式会社.
18. Robbins, P.W., Alblight, 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.
19. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA.* 74:5463-5468.
20. 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.

-
21. Toyoda,H.,Matsuda,Y.,Yamaga,T.,Ikeda,S., Morita,M.,Tamai,T., and Ouchi,S., (1991). Supression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells Plant Cell Report.10:217-220.
 22. 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.