



Title	キュウリ・アスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子の構造と発現
Author(s)	大川, 淳
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37290
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	おお 大	かわ 川	じゅん 淳
学位の種類	工	学	博 士
学位記番号	第	9 7 2 5	号
学位授与の日付	平 成	3 年	3 月 26 日
学位授与の要件	工学研究科 醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	キュウリ・アスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子の構造と発現		
論文審査委員	(主査) 教 授 高野 光男	教 授 菅 健一	教 授 今中 忠行
	教 授 吉田 敏臣	教 授 山田 靖宙	教 授 二井 将光
	教 授 大嶋 泰治		

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、キュウリのアスコルビン酸オキシダーゼ (ASO) 遺伝子の構造と発現について研究を行い、その成果をまとめたもので、序論と本論3章および総括よりなっている。

序論では植物遺伝子の構造解明や遺伝子発現の研究の現状、あわせてASOの有用性、工業生産の現状を述べると共に、銅タンパク質として構造上解明すべき問題点をあげて、本研究の意義を述べている。

第1章では、キュウリ果実cDNAライブラリーによりASO遺伝子のcDNAをクローニングした。決定された塩基配列から、ASOは554アミノ酸残基からなり、そのアミノ末端側には33アミノ酸残基よりなる分泌シグナル配列が存在すると推定された。一方、他の銅タンパク質であるセルロプラスミン、ラッカーゼと一次構造を比較して、銅との結合に関与するアミノ酸残基を含む4つのヒスチジンに富んだ配列が保存されていることを認めた。

第2章では、得られたcDNAを用いて、キュウリ各器官でのASO遺伝子の発現様式を調べた。その結果、果実で高い発現が見られ、とくに表皮と維管束部分にASOタンパク質、mRNAの両方が多量に存在することを認めた。これらの部分には細胞壁が発達した細胞が局在し、ASOは組織特異的発現制御をうけていると考えられた。また、キュウリ培養細胞では、培地中の銅濃度を増やすとASO活性が上昇することを認めた。

次にASOゲノム遺伝子のクローニングを行い、その構造解析を行った。ゲノム遺伝子は、3つのイントロンに分断された4つのエキソンより構成されていた。転写開始点は、翻訳開始コドンより90bpおよび93bp上流のAとGの2ヶ所存在し、このうちAが主な転写開始点であると考えられた。構造遺伝子の5'上流領域をβ-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結し、タバコプロトプラストに導入した。

トランジェントGUSアッセイ法により、プロモーターとその上流領域の解析を行い、この領域が高いプロモーター活性を有することを認め、そのプロモーター活性を上昇させる部分が領域中に2ヶ所存在することを明らかにした。

第3章では、ASO cDNAを大腸菌で発現することを試みた。ASOタンパク質は菌体内で inclusion body を形成して生産されたが、酵素活性は認められなかった。その可溶化と再構成など試みたが活性を回復させることは出来なかった。

総括では以上の結果を要約した上で、本酵素遺伝子の酵母または培養植物細胞による発現の可能性と、その利用による工業生産の展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

アスコルビン酸オキシダーゼ (ASO) は現在若いキュウリ果皮から工業生産されているが、原料の供給が特定の地域と季節に限られ、高い需要に応えるため新しい細胞工学的生産法の開発が望まれている。またASOは植物細胞における生理的意義とともに、銅タンパク質として構造上解明されるべき点が多い。本論文はこのような観点からキュウリのASO遺伝子の構造とその発現について研究を行ったもので、その成果をまとめると次の如くである。

- (1) キュウリ果実ASO遺伝子のcDNAをクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果ASOは554アミノ酸残基よりなり、そのアミノ末端側には33残基よりなる分泌シグナルが存在することを明らかにした。
- (2) 他の銅タンパク質との一次構造の比較にり、相同性の高い部分をみだし、これが銅との配向部位であることをX線構造解析の結果と合わせて明らかにした。
- (3) ASO cDNAをプローブに用いてキュウリの組織特異的なASO遺伝子の発現を調べ、果実とくに果皮および維管束部分で顕著であると認めた。
- (4) ASOゲノム遺伝子 *aso 1* の構造を決定し、これが3つのイントロンと4つのエキソンより構成されていることおよび転写開始点を明らかにした。
- (5) *aso 1* 5' 非翻訳領域のプロモーター活性が、植物細胞で強力なプロモーターとして知られるカリフラワーモザイクウィルス36Sプロモーターの約8倍であることを認めた。さらに領域中にプロモーター活性を上昇させる部位が2箇所あることを明らかにした。
- (6) ASO cDNAを大腸菌で発現することを試み、活性は持たない免疫学的にASOタンパク質と同様なタンパク質を大腸菌に生産させた。

以上のように本論文の成果は、ASO遺伝子の構造を明らかにしてASOタンパク質の構造を解明し、ゲノム遺伝子の解析から強力プロモーターの存在を示し、また他種細胞における発現の可能性を示した。これらは植物細胞工学に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。