

Title	西洋ワサビペルオキシダ-遺伝子のクローニングと大腸菌での発現
Author(s)	藤山, 和仁
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/509
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	ふじ 藤	やま 山	かず 和	ひと 仁
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	9030	号	
学位授与の日付	平成2年	3月	19日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	西洋ワサビペルオキシダー遺伝子のクローニングと大腸菌での発現			
論文審査委員	(主副)			
	教授	岡田	弘輔	
	教授	山田	靖宙	教授 今中 忠行 教授 高野 光男
	教授	大嶋	泰治	教授 菅 健一 教授 吉田 敏臣
	教授	二井	将光	

論文内容の要旨

本論文は臨床検査試薬に用いられている有用酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼのcDNA およびゲノム遺伝子のクローニングを行い、大腸菌で発見させた結果をまとめたものである。

第1章では西洋ワサビ培養細胞より抽出した poly(A)末端を有する mRNA から cDNA ライブラリーを調製し、既知西洋ワサビペルオキシダーゼのアミノ酸一次配列を参考にして作成したプローブを用いて選択し、8個の陽性クローンを得ている。これらのクローンが保有する人工プラスミドの制限酵素地図や決定した塩基配列から3種のアイツザイム遺伝子 (prxC1a, C1b, C1c) であると判定している。このうちの1つ prxC1a は既にアミノ酸配列が報告されているペルオキシダーゼCと同じ構造であるが、N-末端とC-末端にエクストラペプチドを有している。しかしいずれも翻訳開始コドンを欠くcDNAクローンであった。

第2章では、ペルオキシダーゼゲノム遺伝子のクローニングを行っている。西洋ワサビ培養細胞より染色体DNAを調製し、ゲノムライブラリーを作成しその中から、prxC1a, prxC1b の完全なゲノム遺伝子とprxC1c の部分的なゲノム遺伝子を取得したほか、他の2つのアイツザイム遺伝子 prxC2 と C3 を単離している。5種のアイツザイム遺伝子はいずれも3つのイントロンと4つのエキソンからなっており、各イントロンはすべて同じ位置に挿入されている。また5'および3'非翻訳領域にそれぞれプロモーター配列 (TATA, CAAT) とポリ(A)付加シグナルAATAAAAが存在する。prxC1a がコードするペルオキシダーゼCはN末端の30アミノ酸残基およびC末端の15アミノ酸残基がプロセッシングを受けて成熟型ペルオキシダーゼになると推定している。また prxC1a, C1b, C1c 間では塩基配列、アミノ酸配列ともに90%以上の相同性があるが、prxC1a と C2, C3 間では塩基配列でそれぞれ71,60%, アミノ

酸配列では 75, 71%である。

第3章ではペルオキシダーゼアイソザイムCの成熟型蛋白質をコードする遺伝子を構築し、発現ベクター中に挿入し大腸菌中で発現させている。酵素活性は認められないが、電気泳動的ならびに免疫的にペルオキシダーゼCと認められる蛋白質が検出でき、大腸菌では不溶画分に存在することを示している。

論文の審査結果の要旨

西洋ワサビペルオキシダーゼは臨床検査試薬ならびに生化学試薬として汎用されている有用酵素であるが、20種以上のアイソザイムを含みそれらの起源について興味を持たれている酵素である。本論文では西洋ワサビ培養細胞からペルオキシダーゼのcDNA およびゲノム遺伝子をクローン化し大腸菌で発現させたもので、次のような重要な結果を得ている。

- 1) 西洋ワサビ培養細胞から作成したcDNA ライブラリーから3種類のペルオキシダーゼ遺伝子 (prxCla, prxC1b, prxC1c) およびゲノム遺伝子ライブラリーから上記以外に2種 (prxC2, prxC3) の遺伝子を得ており、西洋ワサビでは少くとも5種類のペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子が存在することを明らかにしている。
- 2) 5種類のペルオキシダーゼ遺伝子はすべて4つのエクソンと3つのイントロンからなり、すべて同じ位置にイントロンの挿入があり、進化論的に相関があると考えられる。
- 3) 5' および 3' 非翻訳領域に共通してプロモーター配列 (TATA, CAAT) とポリ(A)付加シグナル (AATAAA) が存在すること。
- 4) prxCla 遺伝子がコードする蛋白質は成熟型ペルオキシダーゼのN-末端に30アミノ酸残基、C-末端に15アミノ酸残基からなるペプチドが付加されており、これらのペプチドは翻訳後プロセッシングされて成熟型ペルオキシダーゼになると考えられる。他のアイソザイム遺伝子も同様である。
- 5) prxCla, prxC1b, prxC1c 間は塩基配列でも、翻訳蛋白質のアミノ酸配列でも90%以上の相同性がある。prxCla と prxC2, prxC3間の相同性は塩基配列で71, 60%, アミノ酸配列で75, 70%であり、prxC2 と prxC3間の相同性は塩基配列で63%, アミノ酸配列で64%である。
- 6) 成熟型ペルオキシダーゼをコードする prxCla 遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入して大腸菌で発現させることに成功している。大腸菌内ではインクルージョンボディを形成しており、触媒活性は認めない。

以上の成果は植物遺伝子工学ならびに酵素工学の発展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。