

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	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/509
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

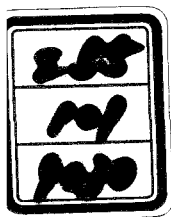
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の
クローニングと大腸菌での発現

1989年

藤山和仁



エフ
101
9036

西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の
クローニングと大腸菌での発現

1989年

藤山和仁

目 次

緒 論

第1章 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子のcDNAクローニング

第1節 緒 言	6
第2節 実験材料及び方法	6
第3節 結 果	10
第4節 考 察	18
第5節 要 約	26

第2章 西洋ワサビペルオキシダーゼのゲノム遺伝子のクローニング

第1節 緒 言	27
第2節 実験材料及び方法	27
第3節 結 果	31
第4節 考 察	55
第5節 要 約	68

第3章 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の $E. coli$ での発現

第1節 緒 言	70
第2節 実験材料及び方法	70
第3節 結 果	72
第4節 考 察	79
第5節 要 約	89

結 論 (総 括)	91
-----------	----

引用文献	94
------	----

本論文に関係のある報告	102
-------------	-----

謝 辞	103
-----	-----

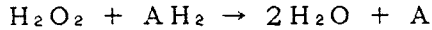
新 著 論

1973年BoyerとCohenによる遺伝子組換え技術の確立により、醗酵工業に新しい流れがもたらされた。従来の醗酵工業は微生物の保持する多様な機能を利用し、一次代謝産物や二次代謝産物を生産していた。これらはアルコール醗酵、有機酸醗酵、アミノ酸醗酵、核酸醗酵、抗生物質生産などと呼ばれた。遺伝子組換え技術の台頭は、本来微生物が生産することのできなかつた、例えばヒトに由来するペプチドホルモンや酵素といった生理活性物質を生産できる可能性を示した。この新しい育種技術は、異なる生物が生合成していたものを微生物が代わりに行うという点で、突然変異を利用し酵素活性を上昇させたり、あるいは代謝制御機構の解除を行うことで育種してきた従来の方向とは大きく異なっていた。その後、1970年代後半から1980年代初めにかけてソマトスタチン、インシュリン、ヒト成長ホルモン、インターフェロンなど本来生体内で微量にしか存在しなかつた物質を大腸菌で遺伝子組換え技術により増幅させて生産することが可能となった。例えばインシュリンの場合、糖尿病の治療に用いるためにウシやブタより抽出していたが、非常に高価であり、しかもヒトのものとはやや構造の異なるものであった。しかし、遺伝子組換え技術で大腸菌で生産したヒトインシュリンは人間に有効であり、純粋で、安価で、短時間で生産できるようになった。そして最近では、ガン治療のために腫瘍壊死因子TNFが生産されるなどますます遺伝子組換え技術が応用・利用されてきている。

一方、植物においては細胞レベルでの操作による植物の品種改良、新しい品種の造成、細胞培養による有用物質生産に関する研究がなされてきた。植物細胞は増殖が非常に遅いため、一次代謝産物を目的とする生産では微生物とは比べものにならず、それぞれの植物が固有に含有する二次代謝産物あるいは特有な有用酵素の生産を目的とするのに焦点が当てられてきた。工業的規模で現在行なわれているのは、オタネニンジン根の培養による二次代謝産物サボニンの生産、ムラサキ細胞培養によるシコニンの生産、オウレン細胞培養によるベルベリンの生産がある。

以上の遺伝子組換え技術を用いた生理活性物質やタンパク質などの新しい生産手段の確立と植物培養細胞による有用物質生産の進展をふまえて、本論文では西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の単離とその解析、ならびに大腸菌を用いた生産に関する研究について述べる。

ペルオキシダーゼは、一般に過酸化水素 (H_2O_2) による酸化反応を触媒する酵素で、基質を AH_2 とするとき、その触媒作用は次のように表わされる。



基質として用いたグアイヤカム (guaiacum) と生体物質との呈色反応が1809年に示され、ペルオキシダーゼという用語は、それから約1世紀の間西洋ワサビより抽出された酵素に特有のものだった¹⁾。ペルオキシダーゼは動物、植物、あるいは微生物と広く存在している。動物では白血球、肝臓、唾液腺、子宮、甲状腺、乳などほとんどの器官や体液に存在し、ミエロペルオキシダーゼ (白血球)²⁾、ヨウ化物ペルオキシダーゼ (甲状腺)³⁾、ラクトペルオキシダーゼ⁴⁾、グルタチオンペルオキシダーゼ⁵⁾ がよく研究されている。微生物では、大腸菌の hydrogen peroxidase I, II^{6, 7)}、*Bacillus stearothermophilus* の耐熱性ペルオキシダーゼ⁸⁾、*Streptococcus faecalis* の NAD⁺-ペルオキシダーゼ⁹⁾、酵母のチトクロム c ペルオキシダーゼ¹⁰⁾、カビ *Caldariomyces fumago* のクロロペルオキシダーゼ¹¹⁾、リグニン分解菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンペルオキシダーゼ¹²⁾、Mnペルオキシダーゼ¹³⁾ などがある。

植物においては、トマト¹⁴⁾、タバコ¹⁵⁾、西洋ワサビ¹⁶⁾、カブ¹⁷⁾、コメ¹⁸⁾、ムギ類¹⁹⁾、マメ類²⁰⁾ など全ての植物に存在する。そして、電気泳動したゲル上でペルオキシダーゼ活性を簡単に検出できることから (ザイモグラム)、栽培種の同定、解析、細胞融合、交配実験などの遺伝子マーカーとして用いられている²¹⁾。一般的に、ペルオキシダーゼは植物内で多様なアイソザイムとアイソフォームを構成し、種々の植物生理学的な働きを担っていることが示唆されている。現在示されているペルオキシダーゼの細胞内での主な役割は、植物ホルモン・インドール酢酸の酸化、細胞壁のリグニン合成、傷害時に誘導され蓄積するエクステンシン分子のチロシン残基を介したイソジチロシン架橋化²²⁾、また植物生活環上では発生や分化、生長などに関与している²³⁾。そして多様なアイソザイムがこれに関与している。Kay らはタバコを用いて、ザイモグラムにより器官発生に際して、種々のアイソザイムが関与していることを証明した²⁴⁾。

ペルオキシダーゼが多様なアイソザイムとアイソフォーム構成を示すことが、植物細胞でのペルオキシダーゼの役割を明らかにしていく上で困難をもたらしている。アイソザイムの多様性は、大きく分けて2つの理由、1) 多重遺伝子族、2) 翻訳後の酵素タンパク質の修飾、が挙げられる²⁵⁾。まず、ペルオキシダーゼアイソザイムは多重遺伝子族については、カブのペルオキシダーゼで4つのアイソザイムの部分アミノ酸配列が示されており²⁶⁾、ペチュニアでは遺伝子座が同定されている3種の遺伝子 (*prxA*, *B*, *C*)²⁷⁾ の存在が証明されている。このような複数個のアイソザイム遺伝子の存在だけでは多様性を説明するには十分ではなく、翻訳後の酵素タンパク質の修飾、前駆体型から成熟型へのプロセッシング、糖鎖の付加、或はフェノール性物質による修飾が多様性を示すもう1つの原因であ

ろう²⁵⁾。前駆体型から成熟化に伴うプロセッシングは、西洋ワサビ²⁸⁾やカブ¹⁷⁾のペルオキシダーゼのN末端がピログルタミン酸であったことからN末側にシグナルペプチドなどが存在したことが推察できた。糖鎖の付加により生じる多様性はゴマで²⁹⁾、フェノール性物質による修飾はピーナッツ培養細胞のペルオキシダーゼで示されている³⁰⁾。

植物ペルオキシダーゼのなかで西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)が最もよく研究されている。HRPは、西洋ワサビの根から抽出され、プロトヘムを1分子含むヘム酵素である。また、多くのアイソザイムあるいはアイソフォームが存在する(以後遺伝子は同じであるが翻訳後にプロセッシングなどの修飾を受けたアイソフォームを含めてアイソザイムと呼ぶことにする)。ザイモグラフにより約30種ものアイソザイムが確認されており³¹⁾、Shannonらにより便宜的にその等電点により酸性、中性、塩基性アイソザイムと分類された¹⁶⁾。現在まで精製され、酵素学的特徴が明らかにされたのは酸性アイソザイム(A1、A2、A3)^{16、32)}、中性アイソザイム(B1、B2、B3、C)³³⁾、塩基性アイソザイム(E1、E2、E3、E5、E6)³⁴⁾である。どのアイソザイムも糖鎖が付加され、分子量が約34,000から約43,000までと変化に富んでいる。この中で中性アイソザイムCはいわゆるHRPとして研究の対象となってきた。アイソザイムCは、西洋ワサビ抽出液中の活性の約40%を占め、分子量が44,000(うち糖鎖部分が約25%)で等電点が8.8-9.0である²⁸⁾。WelinderによりアイソザイムCの308残基よりなる一次構造(分子量33,890)が示され、4つのジスルフィド結合と糖鎖が8ヶ所で付加されていることが明らかになった²⁸⁾。さらに、補欠分子族にプロトヘムを含む以外に2つのCa²⁺を有していた。このタンパク質の結晶は得られている^{34、35)}もののX線構造解析はまだ成功していない。しかし、多種多様な物理的測定手段により酵素反応にともなうヘム鉄の変化の様子、compound I、compound IIと呼ばれる反応中間体などが調べられてきた³⁶⁾。そして、ヘム鉄に直接配位結合するヒスチジン残基(近位ヒスチジン)³⁷⁾、ヘムタンパク質の機能発現に必須なヒスチジン(遠位ヒスチジン)³⁸⁾などが反応過程に関与することが判明した。また、既に結晶構造が解析されているヘムタンパク質のチトクロムcペルオキシダーゼとの類似性からも2つのヒスチジンの他に、いくつかのアミノ酸残基が関与すると推測された³⁹⁻⁴¹⁾。さらに、WelinderとMazzaはカブの4つのペルオキシダーゼアイソザイムについて、2つのヒスチジン残基周辺の一次構造が保存されていることを示した²⁶⁾。アイソザイムCとAを比べると、等電点が異なるだけでなく基質特異性及び反応速度などの速度論的性質が異なっていた⁴³⁾。

一般的に芳香族環を有する化合物を基質として用いてペルオキシダーゼ活性を測定しているが、HRPは基質特異性が広い¹⁾。このため免疫グロブリンにペル

オキシダーゼを化学的に結合させて複合体を作製して2次抗体として用いる酵素免疫法に利用されている。また、例えば血中のグルコース濃度の測定に、グルコースオキシダーゼとともにHRPが呈色反応に用いられるなど、臨床検査試薬としても汎用されている。現在市販されているものは畑で栽培されている西洋ワサビより抽出されているが、約50kgの組織より約200mgの精製酵素(RZ値=3)を得ることができる²²⁾。この酵素の商業的生産のために西洋ワサビの茎や根から誘導した高生産性培養細胞がYamadaらにより確立された⁴⁴⁾。

植物のペルオキシダーゼアイソザイムに見られる多様性にはどのような意義あるのだろうか？そしてペルオキシダーゼ自身は細胞内でどのような働きをしているのだろうか？光合成反応に関するリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ(Rubisco)の小サブユニットも多くのアイソザイムが存在し、トマトの場合には5つの遺伝子に支配されていた⁴⁵⁾。これらは器官特異的に発現し、組織器官の生長分化に依存した発現を示す。それらの遺伝子が光に依存した発現を示すことが個々の遺伝子を単離して遺伝子レベルより解析し示されている。エンドウの場合、これら遺伝子発現制御は5'非翻訳領域に存在するシス作用因子が関与し⁴⁶⁾、またトランスに作用する因子(GT-1)が同定されオン-オフ制御を支配している⁴⁷⁾。このように遺伝子の単離と発現制御機構の解明は、ペルオキシダーゼアイソザイムの生理的役割を明らかにする場合にも有効な手段であると期待できる。また、個々のアイソザイムを大腸菌などで発現させることができれば単一のアイソザイムが得られ、それぞれの酵素学的特徴を解明できる。ペルオキシダーゼはヘムタンパク質として酵素学的・タンパク質化学的に興味ある酵素で、遺伝子を得ることにより部位特異的変異を用いて容易に変異型酵素を作成できるのでいろいろな基礎的データの蓄積が可能である。そこで本研究では西洋ワサビよりペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子及びcDNA遺伝子を単離して遺伝子構造を解析し、大腸菌で発現させた。

第1章では、西洋ワサビ培養細胞よりcDNAライブラリーを作成し、ペルオキシダーゼ間で保存された配列をもとに作成したオリゴヌレオチドをプローブとしてスクリーニングを行い3つのアイソザイム cDNA 遺伝子 prxC1a(pSK1)、prxC1b(pSK2)、prxC1c(pSK3)を得た。このうちの1つ prxC1a は Welinder の報告したアイソザイムCの遺伝子であることが判明した。残りの2つはアイソザイムCとは異なるアイソザイムだった。

第2章では、西洋ワサビ培養細胞よりゲノム遺伝子ライブラリーを調製してアイソザイム遺伝子のクローニングを行なった。3つの cDNA に相当するゲノム遺伝子 (prxC1a、C1b、C1c)を得た。さらに、他の2つのアイソザイム遺伝子 (prxC2、C3)のクローン化に成功した。どのアイソザイム遺伝子も3つのイン

トロンと4つのエクソンから成っていた。prxC1a、C1b、C1c は塩基配列、アミノ酸配列の相同性は90%以上であったが、C1a と C2、C3 間は塩基配列、アミノ酸配列のいずれも75%前後と低かった。アイソザイムC1a(そして恐らくC1b、C1cも)は、N末端とC末端にエキストラペプチドが存在し、プロセッシングされ成熟型酵素になると考えられた。

第3章では、ペルオキシダーゼ前駆体をコードする遺伝子の大腸菌での発現を試みたが、生産することができなかった。N末端エキストラペプチドを持たないペルオキシダーゼ遺伝子および成熟型ペルオキシダーゼ遺伝子をそれぞれ構築し、いずれも大腸菌の発現に成功したが、酵素活性はなく不溶性画分に存在していた。

第1章 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子のcDNAクローニング

第1節 緒言

西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) は補欠分子族としてヘムを持ち、酵素学的によく研究されている。植物生理学的には、ペルオキシダーゼの植物細胞内での役割が議論されている²²⁾。また、本酵素は臨床検査試薬などに用いられている。HRPのcDNAをクローン化し、大腸菌で生産することができれば、さらに多くの知見を得ることが期待できる。そこで本章ではHRPのcDNAをクローニングした。3種のペルオキシダーゼアイソザイムcDNAクローンを得ることができた。さらに、HRPは前駆体タンパク質として生産されることが示唆された。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用植物

京都大学農学部山田康之教授らにより開発された西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) の培養細胞⁴⁴⁾を使用した。

2. 使用菌株及びプラスミド

宿主として *Escherichia coli* DH1 (*F*⁻ *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44* λ⁻)⁴⁹⁾ を cDNA ライブラリーの調製に、また JM109 (*Δ*(*lac-pro*) *thi recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 relA1* [*F*['] *proAB lacI^q lacZΔM15 traD36*])⁴⁹⁾ をプラスミドへのサブクローニングや塩基配列の決定のために用いた。またベクターは cDNA ライブラリーの調製のために pUC9⁵⁰⁾ を、塩基配列の決定には M13 mp10, 11⁵⁰⁾ を使用した。

3. 培地及び培養条件

西洋ワサビ培養細胞の培地には、Linsmaier & Skoog 培地 (MgSO₄ · 7H₂O 370, CaCl₂ · 2H₂O 1760, KNO₃ 1900, NH₄NO₃ 1650, KH₂PO₄ 170, EDTA · Fe · Na 37.3, MnSO₄ · 4H₂O 22.3, CuSO₄ · 5H₂O 0.025, KI 0.88, H₃BO₃ 6.2, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.25, sucrose 3000 mg/ml, 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 10⁻⁵M, kinetin 10⁻⁶M, pH5.6)⁴⁴⁾ を用いた。Linsmaier & Skoog 培地 75 ml を含む 300 ml のマイヤーフラスコに培養細胞を 2% (W/V) 入れ、ロータリーシエイカー (New Brunswick Scientific Co., Inc. model G-10) を用い、暗所で 100 rpm にて

振とう培養し、2週間毎に植え換えた。培養は25°Cで行った。

E. coli の培養はLB培地(1% Tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)、2 X TY 培地 (1.6% Tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl)、H培地 (1% Tryptone, 0.5% NaCl) を用いた^{48, 49)}。

4. 西洋ワサビ培養細胞からの全RNAの抽出及びポリ(A)⁺RNAの精製⁴⁹⁾

培養細胞(新鮮湿重量 60 - 80 g) を液体窒素で凍結し、乳鉢で擦りつぶし、400mM NaCl, 25mM EDTA, 1% diethylpyrocarbonate, 1% SDS, 50 μ g/ml polyvinylsulfate, 35 μ g/ml spermidine trihydrochloride, 10mM vanadyl ribonucleotide complex を含む2倍容量の200mM Tris-HCl 緩衝液(pH 9.0) に懸濁し、よく混合して氷中に約30分間放置した。それを遠心分離(6,000 X g, 5分)後、上清にフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、RNAを抽出した。ペクチンなどの多糖類を除くため、水層に10%(V/V)のエタノールを加え、氷中に30分間静置し、再び遠心分離(6,000 X g, 5分)した上清に最終濃度200mMとなるようにNaClと、2倍量のエタノールを加え、-20°Cで一夜静置し、遠心分離(10,000 X g, 15分)によりRNAを沈澱として回収した。沈澱を70%エタノールで洗浄した後、減圧下で乾固させ粗RNAとした。

粗RNAを滅菌した3回蒸留水(TC Distilled Water DE, Difco Inc.)に溶解させた。オリゴ(dT)セルロースカラム(Type2, Collaborative Research Inc.)を用いて Manniatis らの方法⁴⁸⁾に従い、ポリ(A)⁺RNA画分を精製した。

5. オリゴヌクレオチドの合成及び精製

14mer のオリゴヌクレオチドは、ホスホトリエステル法⁵¹⁾により合成した。35mer のオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystem Co. の Model 381A DNA 合成機を用いて行った。精製は逆相クロマトグラフィー(Cosmosil 5C18-300, ϕ 4.6 X 150mm)で15-30%のアセトニトリルの勾配を20分間かけて、流速1.2ml/minで分画し、最後のピークを分取した。次にジメチルトリチル基を除去した後、5-10%のアセトニトリルの勾配を25分間かけて、流速1.3 ml/minで分取し最終サンプルとした。合成オリゴヌクレオチドの塩基配列の確認はMaxam & Gilbert 法⁵²⁾を用いて行なった。

6. プローブの調製

オリゴヌクレオチドの5'末端ラベルはT4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて [γ -³²P]ATP (111TBq/mmol, ICN) と1 pmol/ μ lのオリゴヌクレオチドを含む反応液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM MgCl₂, 10mM 2-mercaptoethanol) 中で行い⁴⁸⁾、

Sephadex G15 のスパンカラムにより遊離の ATP を除去した。

ニックトランスレーションは cDNA 断片を Rigby らの方法⁵³⁾に従って、5unit の DNA ポリメラーゼ I と 14 μ g/ml DNase I を用いて [α -³²P]dATP (22.2TBq /mmol, ICN) で標識化した。

7. ノーザンハイブリダイゼーション⁵⁴⁾

16% ホルマリン、1mM EDTA を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8, で作成した 1.5% アガロースを用いた。泳動後、アガロースゲルより RNA をナイロンメンブレン (Biodyne transfer membrane P/N BNNG222S ; Pall Inc.) へ移行させた。メンブレンフィルターを 80°C で 2-4 時間焼き付けて RNA を固定した。このメンブレンフィルターを、ハイブリダイゼーション緩衝液 (5 X Denhardt 液 (0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll 400, 0.1% Polyvinylpyrrolidone), 5 X SSPE (3.6M NaCl, 0.2M sodium phosphate, pH7.7, 0.02M EDTA), 0.1% SDS, 150 μ g calf thymus DNA, 1% glycine) 中に 42°C 一晩浸し、プレハイブリダイゼーションを行なった。新しいハイブリダイゼーション緩衝液 (グリシンは除く) に ³²P で 5'末端ラベルした 14mer, 35mer オリゴヌクレオチドプローブ (比活性 1-3 X 10⁶ cpm/pmol, 10⁶-10⁷ cpm/probe) を加えた溶液にメンブレンを移し、さらに 25°C で 2晩保温してハイブリダイゼーションを行った。メンブレンフィルターを室温で 0.1% SDS を含む 2 X SSC 溶液で 15分間、5度洗い、35mer をプローブとして用いた場合はさらに 0.1% SDS を含む 0.2 X SSC 溶液で 10分間、2度洗浄し、乾燥させた後、オートラジオグラフィを行った。

8. cDNA ライブラリーの合成

cDNA の合成は Gubler と Hoffman の方法⁵⁵⁾に従った。西洋ワサビ培養細胞より調製したポリ(A)⁺RNA 画分は、wheat germ による インビトロ 蛋白合成系で翻訳活性を有すること確かめてから使用した。Amersham より購入した cDNA 合成システムを用いて、このキットの説明書に従い 2-4 μ g のポリ(A)⁺RNA を用いて二本鎖 cDNA を合成した。二本鎖 cDNA の 3'末端へのオリゴ d(C) ポリマーの付加は、二本鎖 cDNA 20ng 及びターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (Pharmacia) 17 unit を用いて行った。次に、オリゴ d(C) の付加した二本鎖 cDNA 約 3ng と 23ng のオリゴ d(G) を付加した pUC9 を 65°C で 5分間、58°C、43°C で 60分間、30°C で 1時間保温することで、アニリングさせた。Hanahan の方法⁵⁶⁾に従い、cDNA ライブラリー作成のための高い形質転換頻度を有するコンピテント細胞を調製し、-80°C で保存した。形質転換は凍結コンピテント細胞を解凍し、アニリングした DNA (100ng) を加え、0°C で 15-45分間静置後、42°C、90

秒熱ショックを与え氷上に 1-2 分間置いた。培地を加え、37°C で約 1 時間培養し、大腸菌を LB 寒天培地 (50 μ g/ml アンピシリンを含む) に塗布し 37°C で一夜培養した。

9. サザンハイブリダイゼーション

制限酵素処理した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分画後、Southern の方法⁵⁷⁾に従いゲルから DNA をナイロンメンブラン (Hybond N, Amersham) へ移行させた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションは Jeffrey らの方法⁵⁸⁾に従い、プローブに応じてハイブリダイゼーション・洗浄の温度を変えた。

10. コロニーハイブリダイゼーション

50 μ g/ml アンピシリンを含んだ 1.5% LB 寒天培地に置いたフィルターメンブラン (Millipore, HA, 0.4 μ m) 上に、形質転換された *E. coli* DH1 を蒔き、37°C で一夜培養し、プラスミドを増幅させた。このフィルターを 0.5N NaOH で 10 分間、2 回、0.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 5 分間、2 回、さらに 1.5M NaCl / 0.5M Tris-HCl 緩衝液 5 分間、に順次浸して、コロニーを溶菌させ DNA を変性させてからメンブランに移し、風乾後 75°C で固定した。60-65°C で 3 X SSC、0.1% SDS 溶液中に 30 分間浸し、表面の不要物を取り去った。コロニーハイブリダイゼーションは、フィルターに ³²P で標識化したプローブ (5 X 10⁶ cpm/pmol, 5 X 10⁵ cpm/ml) を加え、35mer のオリゴヌクレオチドを用いた場合は 48°C で、14mer のオリゴヌクレオチドを用いた場合は 25°C で約 40 時間保温した。フィルターを 2 X SSC 中で 25°C、30 分間で、2 度洗浄し、次に 4 X SSC 中でハイブリダイゼーションに用いた温度で 30 分間、2 度洗浄し、オートラジオグラフィを行った。

11. プラスミドの調製および大腸菌の形質転換

大腸菌からのプラスミド DNA の調製は、Birnboim と Doly のアルカリ-SDS 変性法⁵⁹⁾に従い、塩化セシウム・エチジウムブロミド平衡密度勾配遠心分離法で精製した。

cDNA ライブラリー調製以外のプラスミドや M13 ファージによる形質転換は、Cohen らの方法⁶⁰⁾に従い、15% グリセロールを含む 50mM 塩化カルシウム溶液を用いて調製したコンピテント細胞を用いた。

12. アガロースゲル・ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びゲルからの DNA の回収

制限酵素処理をした DNA 断片を、0.8-1.5% のアガロースゲル電気泳動、あるいは 4-6% のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。泳動用緩衝液は、50mM Tris-ホウ酸緩衝液、pH8.3、1mM EDTA を使用した。泳動後エチジウムブロミド溶液にゲルを浸し、DNA を染色した。アガロースゲルからの DNA 断片の回収は低融点アガロース (BRL 或はナカライテスク) を用いて、Maniatis らの方法⁴⁸⁾ に従い行なった。ポリアクリルアミドゲルからの DNA 断片の回収は Maxam と Gilbert の方法⁵²⁾ に従った。

1.3. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、M13 mp10, mp11, mp18, mp19 を用いたジデオキシシークエンس法^{49, 50)} で行なった。M13 Sequence kit (東洋紡) 使用し、詳細はキットの説明書に従った。

しかし、適当な制限酵素部位が存在しない場合には、Bal 31 エキソヌクレアーゼを用い逐次 DNA 断片を縮小化し⁴⁸⁾、塩基配列の決定を行なった。Bal 31 エキソヌクレアーゼによる分解は約10 μ g の直鎖状 DNA を用いて、6 unitの酵素量で Bal 31 反応液 (20mM Tris-HCl、pH7.2、600mM NaCl、12.5mM CaCl₂、12.5mM MgCl₂、1mM EDTA) 中で 30℃で行った。20mM EGTAで反応停止後、フェノール抽出でタンパク質を変性させた。エタノール沈澱で DNA を回収し、縮小した部位とは反対側に存在しているサイトを対象として制限酵素で処理した。アガロースゲル電気泳動で分画後、約150bp づつ縮小化された断片を回収し、M13 mp系ベクターと連結して欠失変異体を得た。

第3節 結果

1. プロープに用いたオリゴヌレオチドの設計

1976年、デンマークの Welinder が西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイム C の全アミノ酸配列を報告している (Fig. 1-1)。アミノ酸配列コドンの縮重性を考慮し、2個のメチオニンを含むために全体としての縮重性が比較的低い領域 (Met281-Gly285) を選び 14mer のオリゴヌレオチドを Fig. 1-2 のように設計し、ホスホトリエステル法により合成した (アロープ I)。また、同じく1977年に Welinder と Mazza は西洋ワサビとカブについてプロトヘムに配位しているヒスチジン残基 (His42) 周辺の配列を報告した。この領域は種々のペルオキシダーゼで保存性が高いことから、ヘムに配位しているヒスチジン周辺の配列 (His40-Ala51) を選び、35mer から成るオリゴヌレオチドを Fig. 1-2 のように設計し、

Glu-Leu-Thr-Pro-Thr-Phe-Tyr-Asp-Asn-Ser-Cys-Pro-Asn-Val-Ser-Asn-Ile-Val-Arg-Asp-Thr-Ile-Val-Asn-Glu-	5	10	15	20	25
		carb			
Leu-Arg-Ser-Asp-Pro-Arg-Ile-Ala-Ala-Ser-Ile-Leu-Arg-Leu	30	35	40	45	50
		carb			
Ala-Ser-Ile-Leu-Leu-Asp-Asn-Thr-Thr-Ser-Phe-Arg-Thr-Glu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gly-Asn-Ala-Asn-Ser-Ala-Arg-	55	60	65	70	75
		carb			
Gly-Phe-Pro-Val-Ile-Asp-Arg-Met-Lys-Ala-Ala-Val-Glu-Ser-Ala-Cys-Pro-Arg-Thr-Val-Ser-Cys-Ala-Asp-Leu-	80	85	90	95	100
		carb			
Leu-Thr-Ile-Ala-Ala-Gln-Ser-Val-Thr-Leu-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Trp-Arg-Val-Pro-Leu-Gly-Arg-Arg-Asp-	105	110	115	120	125
		carb			
Ser-Leu-Gln-Ala-Phe-Leu-Asp-Leu-Ala-Asn-Ala-Asn-Leu-Pro-Ala-Pro-Phe-Thr-Leu-Pro-Gln-Leu-Lys-Asp-	130	135	140	145	150
		carb			
Ser-Phe-Arg-Asn-Val-Gly-Leu-Asn-Arg-Ser-Ser-Asp-Leu-Val-Ala-Leu-Ser-Gly-Gly-His-Thr-Phe-Gly-Lys-Asn-	155	160	165	170	175
		carb			
Gln-Cys-Arg-Phe-Ile-Met-Asp-Arg-Leu-Tyr-Asn-Phe-Ser-Asn-Thr-Gly-Leu-Pro-Asp-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr-Thr-	180	185	190	195	200
		carb			
Tyr-Leu-Gln-Thr-Leu-Arg-Gly-Leu-Cys-Pro-Leu-Asn-Gly-Asn-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Asp-Phe-Asp-Leu-Arg-Thr-	205	210	215	220	225
		carb			
Pro-Thr-Ile-Phe-Asp-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Val-Asn-Leu-Glu-Gln-Lys-Gly-Leu-Ile-Gln-Ser-Asp-Gln-Glu-Leu-	230	235	240	245	250
		carb			
Phe-Ser-Ser-Pro-Asn-Ala-Thr-Asp-Thr-Ile-Pro-Leu-Val-Arg-Ser-Phe-Ala-Asn-Ser-Thr-Gln-Thr-Phe-Phe-Asn-	260	265	270	275	280
		carb			
Ala-Phe-Val-Glu-Ala-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Asn-Ile-Thr-Pro-Leu-Thr-Gly-Thr-Gln-Gly-Gln-Ile-Arg-Leu-Asn-	285	290	295	300	305
		carb			
Cys-Arg-Val-Val-Asn-Ser-Asn-Ser					

Disulfide bridges: 11-91, 44-49, 97-301, 177-209.

Fig.1-1 Amino acid sequence as reported by Melinder (27). N-terminal residue is pyroglutamic acid. Boxes I and II denote oligonucleotide probe I (14mer) and II (35mer).

horseradish isozyme C	39															57											
	Leu-His-Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-Asn-Gly-Cys-Asp-Ala-Ser-Ile-Leu-Leu-Asp-Asn																										
Turnip isozyme P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gly	+	+	Leu	+	+	+	+	+	Asp
P2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gly	+	+	Leu	+	+	+	+	+	Asp
P3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Asp
P7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Asp

Probe I 281

Met-Asp-Arg-Met-Gly

Codon 5' ATG GAT CGN ATG GGN 3'
C AGA G

Probe I-1 3' TAC CTA GCT TAC CC 5'

14 mer
TAC CTG TCT TAC CC
TAC CTA TCT TAC CC
TAC CTG GCT TAC CC

Probe II 40

His-Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-Asn-Gly-Cys-Asp-Ala

Codon 5' CAT TTT CAT GAT TGT TTT GTN AAT GGT TGT GAT GCN 3'
C C C C C C C C C C

Probe 35 mer
3' GTG AAG GTA CTA ACG AAA CAC TTA CCC ACA CTG CG 5'

Fig.1-2 Nucleotide sequence of the probes used for screening cDNA of horseradish peroxidase. The basis of amino acid sequence (Fig.1-1) is according to that of Melinder (27).

ホスホアミダイト法により合成した(プローブⅡ)。合成したオリゴヌレオチドのプローブⅠ、Ⅱを ^{32}P で末端をラベルし、西洋ワサビ培養細胞より調製したポリ(A) $^+$ RNAとハイブリダイゼーションさせた。合成プローブはⅠ、Ⅱともにほぼ同じ分子サイズ約1,550ヌクレオチドの位置に特異的にハイブリダイズした(Fig. 1-3)。これは、Welinderの報告したペルオキシダーゼのアミノ酸残基308から考えられる構造遺伝子の大きさ924ヌクレオチドより十分に大きいものであった。よって、両プローブともcDNAライブラリーのスクリーニングに使用できると判断した。

2. cDNA 遺伝子ライブラリーの作成

ポリ(A) $^+$ RNAから二本鎖cDNAを合成した(Fig. 1-4)。この際、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ をDNA合成の基質として取り込ませて、二本鎖cDNA合成のための各ステップ、特に逆転写酵素によるcDNA合成を確認した。このようにして得られた二本鎖cDNAにターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼにより各3'末端にオリゴ(dC)ポリマーを付加した。これを、PstI部位で切断した3'末端側にオリゴ(dG)ポリマーを付加しているpUC9とアニリングさせた。これらのDNAを用いて E. coli DH1 を形質転換し、約53,000個から成るバンクを得た。

3. ペルオキシダーゼ cDNA クローンの選抜

約53,000個のcDNA遺伝子ライブラリーから5'末端をラベルしたプローブⅡを用いたコロニーハイブリダイゼーション法によりペルオキシダーゼcDNAクローンを選別した。第1次選抜で10個の陽性クローンを得ることができたが、このうちさらに第2次選抜でも8個が陽性であった。8個の陽性クローンをさらに単一コロニーとして単離する操作を繰り返して純化した。それぞれをクローン1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8と名付けた。8個の陽性クローンが保有するプラスミドを抽出し、cDNA挿入断片の確認を行なった。制限酵素PstIで切断し、1.2%アガロースゲル電気泳動で分画すると、いずれも1,200bpから1,500bpのcDNA断片が挿入されていた。このアガロースゲルからDNAをナイロンメンブランに移し、プローブⅡ(35mer)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。いずれのクローンの挿入断片もプローブⅡとハイブリダイズした(データ未掲載)。つぎに、挿入断片間の相同性を調べた。8つのクローンの中で最も長いクローン2の挿入断片をニックトランスレーション法により放射能ラベルしたものをプローブとして用いてハイブリダイズさせると、いずれもcDNAの挿入断片のみにハイブリダイズした(Fig. 1-5)。以上のことよりこれら8つのクローンは、プローブⅡと非常に相同性の高い塩基配列をもち、またそれぞれのクローン同士

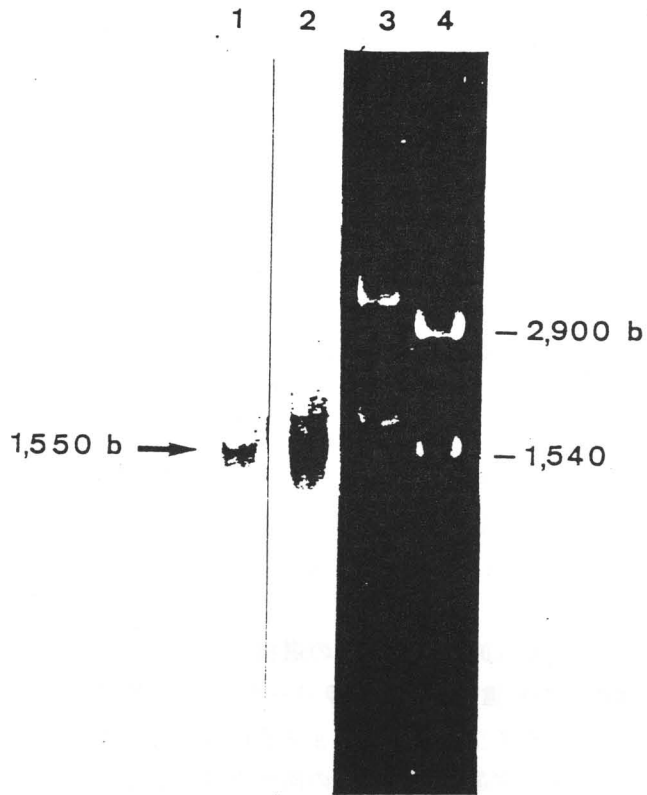
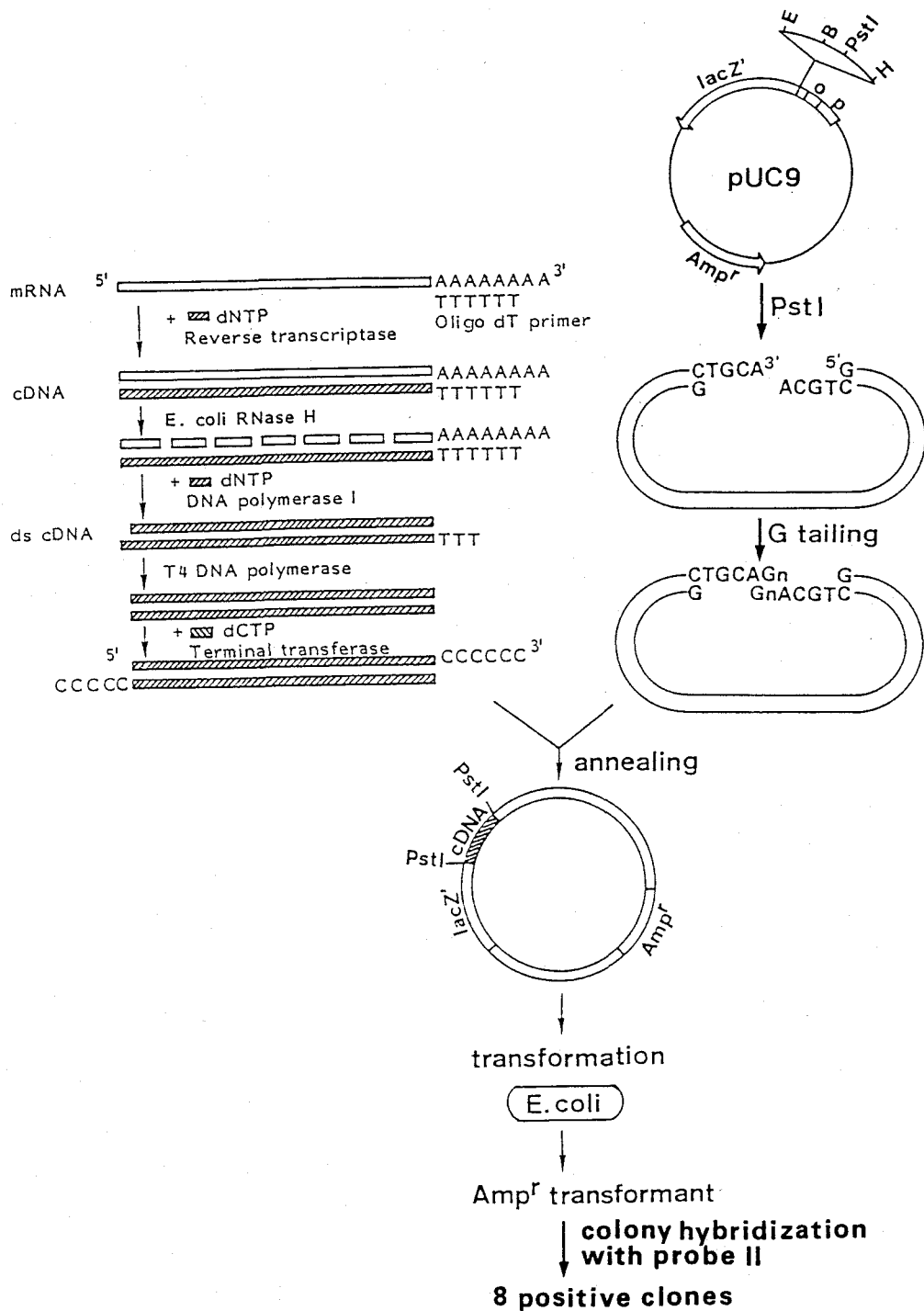


Fig.1-3 Northern hybridization of poly(A)⁺RNA from horseradish cultured cell. Lanes 1 and 2 show results of hybridization with probe I and probe II, respectively; Lanes 3 and 4 show the ethidium bromide staining of poly(A)⁺RNA fraction and *E. coli* 23S(2,900 bases) and 16S(1,540 bases) rRNA, respectively.



Construction of cDNA Banks and Isolation of positive clones

Fig.1-4. Construction of cDNA banks and isolation of positive clones. The double-stranded cDNA is prepared as shown in "Materials and Methods". Positive clones for horseradish peroxidase were isolated by colony hybridization probe II.

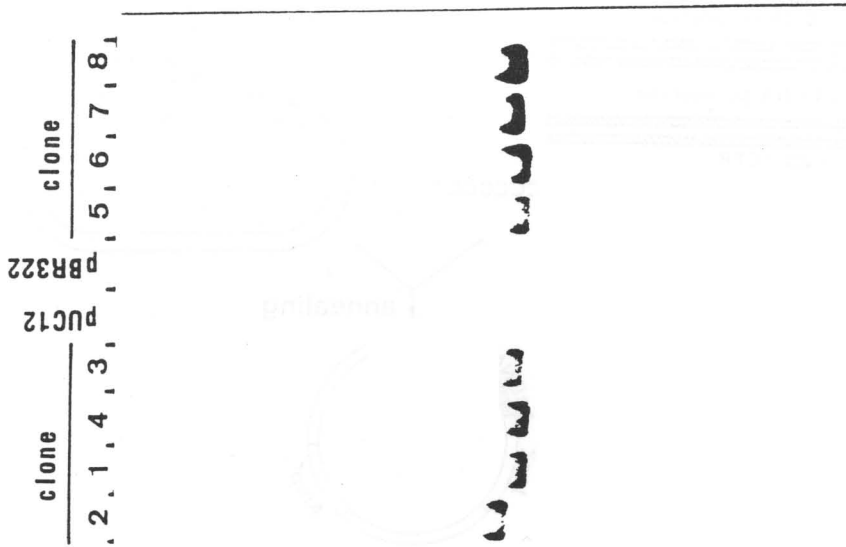


Fig.1-5 Homology among cDNA inserts of positive clones. cDNA insert of the plasmid harbored in clone 2 is used as probe.

はよく似た塩基配列を有していることが示唆された。

塩基配列の決定のために 6塩基認識の制限酵素を用いて各クローンが保有するプラスミドの制限酵素地図を作成した。Fig. 1-6 に示すように、制限酵素地図よりクローン 1, 2, 4 が保有するプラスミドグループ(グループ1)、クローン 7, 8 のプラスミドグループ(グループ2)そしてクローン 3, 5, 6 のプラスミドグループ(グループ3)に分けることができた。グループ1については、クローン 1 のプラスミドの挿入断片が他の2つとは逆向きになっており、それぞれの cDNA 断片の長さは異なっていた (Fig. 1-6)。他のグループのプラスミド間では、挿入方向及び挿入断片の長さに違いはみられなかった。8つのクローンのプラスミド挿入断片は塩基配列では相同性があるにもかかわらず、制限酵素地図では3つのグループに分かれたことから、3種のアイソザイム遺伝子をクローン化できたと推測した。

4. 塩基配列の決定

制限酵素地図により分けた3つのグループの中で、グループ1の最長の挿入断片を持つクローン 2 が保有するプラスミドを pSK1、グループ2のクローン 8 のものを pSK2、グループ3のクローン 5 のものを pSK3 とした。制限酵素地図及び塩基配列決定のストラテジーを Fig. 1-8 に示した。塩基配列は M13 フェージを用いたジデオキシ法により全て両鎖とも決定した。適当な位置に適当な制限酵素部位が存在しないときは Bal 31 エクソヌクレアーゼを用いて逐次断片を縮小化し、縮小化された部分より塩基配列の決定を行なった。

まず始めに最も長い挿入断片を持つ pSK1 の cDNA 断片の塩基配列を決定した (Fig. 1-9)。cDNA 全体としては 1310bp から成り、翻訳開始のメチオニンが欠くが、バリンから始まりメチオニンで終わる 335 アミノ酸残基のオープンリーディングフレームが存在し、完全な遺伝子の一部と思われた。この配列は、N 末端及びC 末端側にあるそれぞれ余分なペプチド(エキストラペプチド)以外は Welinder の報告したピログルタミン酸からセリンまでの 308 アミノ酸残基の西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイムC のもの²⁸⁾と同一で、このアイソザイムC をコードする cDNA 遺伝子であると判断した。N 末端のピログルタミン酸はグルタミンから派生したものであることが明らかになった。また、グループ1のクローン 1 とは別のクローン 4 では、Fig. 1-9 の塩基配列の 1229 の位置にポリAが付加していた。ポリAが付加する位置に差が認められた。

一方、他の2つのクローンについても同様に塩基配列を決定したが(Fig. 1-8, 1-9, 1-10)、pSK2 はアロリンからメチオニンまでの 330 残基、pSK3 はメチオニンからメチオニンまでの 332残基をコードするオープンリーディングフレーム

あるいはその一部と思われる配列が存在し、それぞれ西洋ワサビペルオキシダーゼCのアミノ酸配列と非常によく似ていた (Fig. 1-12)。特に、ヘムの配位に参与する2つのヒスチジンの周辺配列やジスルフィド結合をつくるシステイン残基などは同じであった。これらのことから、pSK2 及び pSK3 の保持する cDNA はペルオキシダーゼCとは異なるアイソザイムをコードするものと判断した。pSK2 は Welinder の報告したN末端のピログルタミン酸に相当するグルタミンまでの残基を欠いていた (Fig. 1-12)。また、pSK3 はグルタミン残基より上流の配列を有し、その中にはメチオニン残基が存在するが他のものとの類似より翻訳開始のメチオニンではないと考えられた。

第4節 考察

西洋ワサビ培養細胞よりペルオキシダーゼアイソザイムCをコードする cDNA (pSK1) をクローニングすることができた。塩基配列決定の結果、Welinder の報告したアミノ酸配列に全く一致した。さらに、pSK1 以外の他に pSK2 及び pSK3 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列はペルオキシダーゼアイソザイムCのそれと非常によく似ており、特にヘムと関係のある2つのヒスチジン残基の周辺の配列が全く同じであったことなどから他のアイソザイム遺伝子であると判断した。しかし、アイソザイムC以外のアイソザイムについてはその一次構造は報告されておらず、どのアイソザイムであるか特定できなかった。これまでに塩基性、中性、酸性アイソザイムのアミノ酸組成が報告されている^{32, 33, 34)}。今回得られた2つのアイソザイムのアミノ酸組成と比較したが、明確な結論を得ることができなかった。しかし、推測されるアミノ酸配列はアイソザイムCと比べると C(C1a) と C1b, C1c は 92%, 93% で、C1b と C1c 間では 94% と高い相同性があり、アミノ酸組成でも顕著な差はみられなかったことから、この2つはアイソザイムCと同じ中性グループに属するものと思われる。

cDNA ライブラリーよりペルオキシダーゼクローンの選抜に 35mer からなるオリゴヌレオチドをプローブとして用いた。このプローブの設計には、Welinder と Mazza の報告したヘムに配位するヒスチジン周辺の保存された配列²⁶⁾を用いた。3つのペルオキシダーゼの明らかになったアミノ酸配列について、3種のアイソザイムのこのヒスチジン周辺は Welinder の報告したものと同じであった。その塩基配列も3者で全く同じであった。プローブと比較すると、35塩基中31塩基が同じで、89%の相同性であった。プローブの設計には、コドンの縮重を考慮せねばならない。用いたアミノ酸配列中には、コドンの3番目の文字の縮

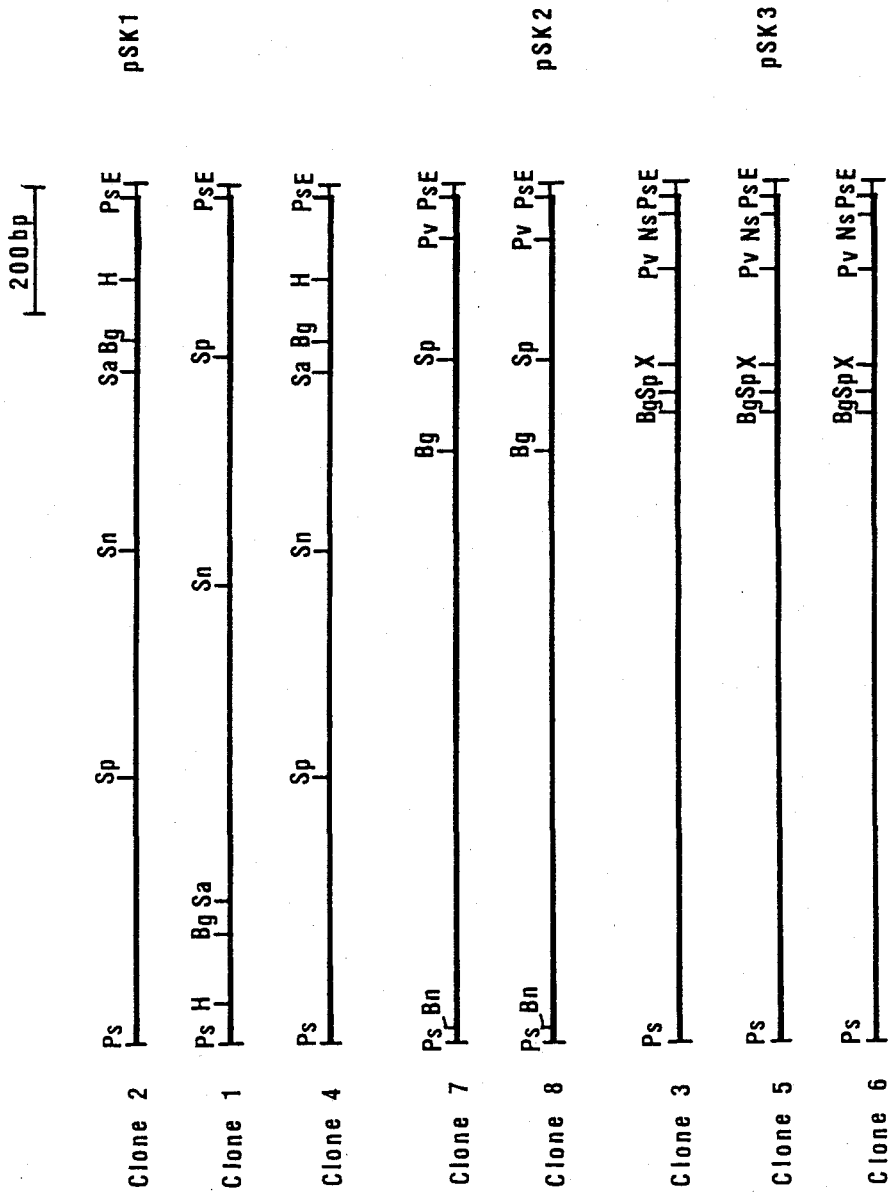
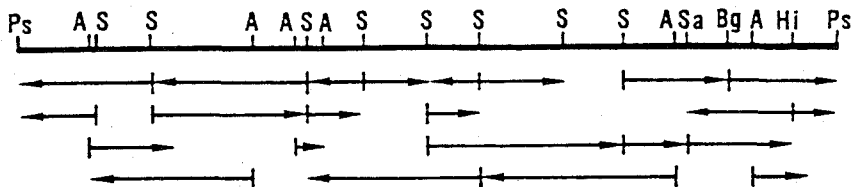
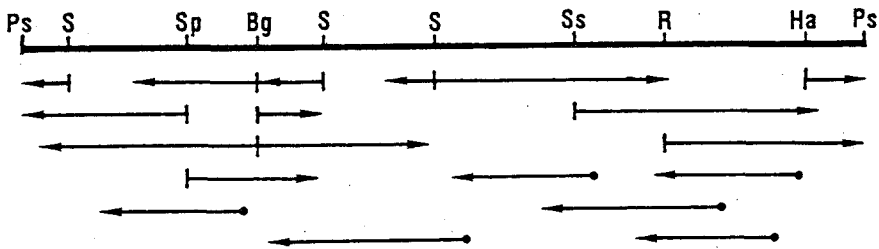


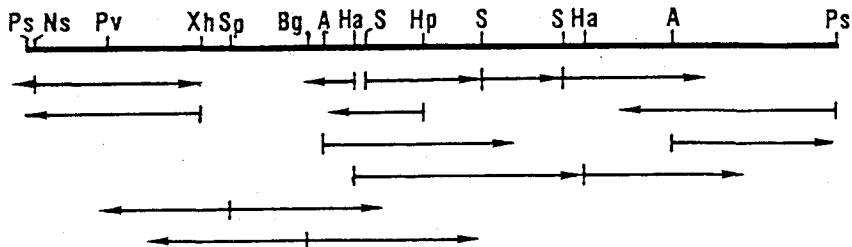
Fig.1-6 Restriction maps of cDNA clones. Abbreviations: Ps, PstI; H, HindIII; Bg, BglII; Sp, SphI; Sn, SnaBI; Sa, SalI; Pv, PvuI; X, XhoI; E, EcoRI; Ns, NsiI; Bn, BanII; BolI. Thin line indicates the vector region. Bold bar represents the cDNA fragment.



DNA sequencing strategy for pSK1



DNA sequencing strategy for pSK2



DNA sequencing strategy for pSK3

Fig.1-7 Sequencing strategies of 3 positive clones. Arrow with vertical bar end represents the direction and the extent of sequencing. Arrow with dot end represents deletion derivatives obtained by Bal 31 exonuclease digestion.

GTATGCTTATTCTTCATGCTTCTTTGTCTGATGCTCAACTTACCCTACCTTCTACGAC	60
ValCysLeuIleLeuHisAlaSerLeuSerAspAlaGlnLeuThrProThrPheTyrAsp	20
AATTCATGTCCTAATGTCTCTAACATCGTACGGGATACTATTGTCAATGAGCTAAGATCA	120
AsnSerCysProAsnValSerAsnIleValArgAspThrIleValAsnGluLeuArgSer	40
GACCCTCGTATTGCCGCGAGCATCCTTCGTCTTCACTTCCAGCATGCTTTGTTAATGGT	180
AspProArgIleAlaAlaSerIleLeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValAsnGly	60
TGTGACGCATCGATCTTGTTAGACAACACAACATCATTTCGAACAGAGAAAGATGCGTTT	240
CysAspAlaSerIleLeuLeuAspAsnThrThrSerPheArgThrGluLysAspAlaPhe	80
GGAAACGCAAACCTCGGCAAGAGGATTTCCAGTGATTGATAGAATGAAAGCCGCGGTGGAG	300
GlyAsnAlaAsnSerAlaArgGlyPheProValIleAspArgMETLysAlaAlaValGlu	100
AGTGCATGCCCAAGAACCGTTTCATGCGCAGATTTGCTCACCATTGCAGTCAACAATCT	360
SerAlaCysProArgThrValSerCysAlaAspLeuLeuThrIleAlaAlaGlnGlnSer	120
GTCACCTTGGCGGGAGGTCCTTCTTGAGAGTTCCTTGGGCAGAAGAGATAGCTTACAA	420
ValThrLeuAlaGlyGlyProSerTrpArgValProLeuGlyArgArgAspSerLeuGln	140
GCATTTCTGGATCTTGCTAATGCAATCTTCCAGCTCCATTCTTCACACTTCCACAACCT	480
AlaPheLeuAspLeuAlaAsnAlaAsnLeuProAlaProPhePheThrLeuProGlnLeu	160
AAAGACAGCTTTAGAAATGTTGGCCTCAACCGTCTTCTGATCTCGTTGCACTGTCCGGG	540
LysAspSerPheArgAsnValGlyLeuAsnArgSerSerAspLeuValAlaLeuSerGly	180
GGCCACACATTTGGTAAAAATCAGTGTGGTATTATTATGGACAGATTATACAACCTTCAGC	600
GlyHisThrPheGlyLysAsnGlnCysArgPheIleMETAspArgLeuTyrAsnPheSer	200
AACACCGGTTTACCCGATCCTACTCTCAACACTACTTATCTCCAAACTCTCGTGGACTA	660
AsnThrGlyLeuProAspProThrLeuAsnThrThrTyrLeuGlnThrLeuArgGlyLeu	220
TGTCCCCTCAATGGTAATCTAAGCGCTTTGGTGGATTTTGATCTACGTACGCCAACGATT	720
CysProLeuAsnGlyAsnLeuSerAlaLeuValAspPheAspLeuArgThrProThrIle	240
TTTGACAACAAATACTATGTGAATCTCGAAGAGCAAAAAGGACTTATCCAAAGCGACCAA	780
PheAspAsnLysTyrTyrValAsnLeuGluGluGlnLysGlyLeuIleGlnSerAspGln	260
GAGTTGTTCTCTAGCCCCAATGCCACTGACACAATCCCTTTGGTGAGATCAATTTGCTAAT	840
GluLeuPheSerSerProAsnAlaThrAspThrIleProLeuValArgSerPheAlaAsn	280
AGCACACAAACATTCTTCAATGCATTTGTGGAGGCGATGGATAGGATGGGAAACATTACA	900
SerThrGlnThrPhePheAsnAlaPheValGluAlaMETAspArgMETGlyAsnIleThr	300
CCTCTTACAGGAACCTCAAGGACAGATCAGGTTGAATTGTAGGGTGGTGAACCTCAACTCT	960
ProLeuThrGlyThrGlnGlyGlnIleArgLeuAsnCysArgValValAsnSerAsnSer	320
CTACTCCATGATATGGTGGAGGTCGTTGACTTTGTTAGCTCTATGTGAGCATAGTCGACG	1020
LeuLeuHisAspMetValGluValValAspPheValSerSerMet***	335
CCATATGTGGCATCCATAATATATATATAAAATATAAAACGCTCTAAGATGTTACTTGA	1080
GCATGAGAAGATCTCTATCGGTTGTGGAGTATCTGAGTAGCTCTTATGTATTTCTGTTTG	1140
ATTTTGGCTTTTGAAGACGTTTCCGACCTTCCGGTAATCGGTTAAGCTTGATGGATT	1200
GGACGTTCTATACTATAAA*AAATGACATAAAAGAGATGTATTTGAC(A)n	1248

Fig.1-8 DNA sequence of cDNA insert on pSK1. The amino acid sequence between the vertical lines is identical with that reported by Welinder (27). The underlined sequence is complementary to probe II. Asterisk indicates the poly(A) addition site of clone 4. Polyadenylation signal is represented by box.

<u>CCTACCTTCTACGACACTTCATGTCCTAATGTCTCAAACATCGTACGAGACATCATTATT</u>	62
ProThrPheTyrAspThrSerCysProAsnValSerAsnIleValArgAspIleIleIle	20
AATGAGCTACGATCGGACCCCTCGTATCACCGGAGTATCCTTCGTCTTCACTTCCACGAC	122
AsnGluLeuArgSerAspProArgIleThrAlaSerIleLeuArgLeuHisPheHisAsp	40
<u>TGCTTTGTTAATGGTTGTGACGCATCGATATTGTTAGACAACACAACATCATTCTAACA</u>	182
CysPheValAsnGlyCysAspAlaSerIleLeuLeuAspAsnThrThrSerPheLeuThr	60
GAGAAAGATGCGCTTGGAAACGCAAACCTCGGCTAGAGGATTCCTACAGTTGACAGAATC	242
GluLysAspAlaLeuGlyAsnAlaAsnSerAlaArgGlyPheProThrValAspArgIle	80
AAGGCCGCGGTGGAGAGGGCATGCCAAGAACAGTTTCATGCGCAGATGTGCTTACCATT	302
LysAlaAlaValGluArgAlaCysProArgThrValSerCysAlaAspValLeuThrIle	100
GCAGCTCAACAATCTGTTAATTTGGCAGGAGTCTCTTGGAGGGTTCCTTTGGGAAGA	362
AlaAlaGlnGlnSerValAsnLeuAlaGlyGlyProSerTrpArgValProLeuGlyArg	120
AGAGACAGCTTACAAGCATTTTTAGATCTTGCTAATGCAAATCTTCCAGCTCCATTCTTT	422
ArgAspSerLeuGlnAlaPheLeuAspLeuAlaAsnAlaAsnLeuProAlaProPhePhe	140
ACACTTCCACAACCTAAGGATGCCTTCGCAAAAGTTGGCCTCGACCGTCCTTCTGATCTC	482
ThrLeuProGlnLeuLysAspAlaPheAlaLysValGlyLeuAspArgProSerAspLeu	160
GTTGCTCTCTCCGGTGGTCACACATTTGGAAAAAATCAGTGTAGATTTATTATGGACAGA	542
ValAlaLeuSerGlyGlyHisThrPheGlyLysAsnGlnCysArgPheIleMETAspArg	180
TTATACAACCTCAGCAACACCGGACTACCCGACCCTACCCTCAACACTACTTACCTTCAA	602
LeuTyrAsnPheSerAsnThrGlyLeuProAspProThrLeuAsnThrThrTyrLeuGln	200
ACTCTTCGTCAACAATGTCCCCTAATTGGAAACCAAAGTGTATTGGTGGATTCGATCTG	662
ThrLeuArgGlnGlnCysProLeuIleGlyAsnGlnSerValLeuValAspPheAspLeu	220
CGTACGCCAACGGTTTTTCGATAACAAATACTATGTGAATCTTAAAGAGCAAAAAGGTCTC	722
ArgThrProThrValPheAspAsnLysTyrTyrValAsnLeuLysGluGlnLysGlyLeu	240
ATTCAGAGTGACCAAGAGTTGTTCTCTAGCCCCAATGCCACTGACACAATCCCCTTGGTG	782
IleGlnSerAspGlnGluLeuPheSerSerProAsnAlaThrAspThrIleProLeuVal	260
AGGTCATTTGCTGATGGCACACAAAAATTCTTCAATGCGTTTGTGGAGGCTATGAATAGG	842
ArgSerPheAlaAspGlyThrGlnLysPhePheAsnAlaPheValGluAlaMETAsnArg	280
ATGGGAAATATTACACCTCTTACAGGAACTCAAGGAGAAATCAGGTTGAATTGTAGGGTG	902
METGlyAsnIleThrProLeuThrGlyThrGlnGlyGluIleArgLeuAsnCysArgVal	300
GTGAACTCCAACCTCTCTACTCCATGATATAGTGGAGGTCGTTGACTTTGTTAGCTCTATG	962
ValAsnSerAsnSerLeuLeuHisAspIleValGluValValAspPheValSerSerMET	320
TGAGAAAAGTTGAGTCAATATCTGGCTACCAGAGTACACGTTAAGATAAATAAAGCGCTC	1022
TCAAGATGTTACTTGAGAAGGAGAAGATATTTATTGGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGT	1082
<u>TCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCCTTTGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTT</u>	1142
<u>ATGGGTTTGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGTTCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCCTT</u>	1202
<u>TGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTTATGGGTTTGGACTTTCTATCCTGAATAA</u>	1262
GATGACACAATAAAGAGATGTTACTTGAG	1291

Fig.1-9 DNA sequence of cDNA insert on pSK2. The amino sequence between the vertical lines is similar to that reported by Welinder(27). The underlined sequence is complementary to probe II. Asterisks represents the stop codon. Polyadenylation signal is represented by box. Horizontal arrow indicates the directed repeats.

	TT	2
ATGCTTCATGCATCTTTTTCCAATGCTCAACTTACCCCTACCTTCTACGACAATTCATGT	62	
METLeuHisAlaSerPheSerAsnAlaGlnLeuThrProThrPheTyrAspAsnSerCys	20	
CCTAACGTCTCAAACATAGTACGGGACATCATTATCAATGAGTTACGATCGGACCCTAGT	122	
ProAsnValSerAsnIleValArgAspIleIleIleAsnGluLeuArgSerAspProSer	60	
ATCGCCGCGAGCATCCTTCGTCTTCACTTCCACGACTGCTTTGTTAATGGTTGTGACGCA	182	
IleAlaAlaSerIleLeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValAsnGlyCysAspAla	80	
TCGATCTTGTTAGACAACACAACATCATTTCGAACAGAGAAAGATGCGTTTGGAAACGCA	242	
SerIleLeuLeuAspAsnThrThrSerPheArgThrGluLysAspAlaPheGlyAsnAla	80	
AACTCGGCTCGAGGATTTCTGTGGTTGACAGAATCAAGGCGCGGTGGAGAGGGCATGC	302	
AsnSerAlaArgGlyPheProValValAspArgIleLysAlaAlaValGluArgAlaCys	100	
CCAAGAAGTGTTCATGCGCAGATGTGCTTACCATTGCAGCTCAACAATCTGTTAATTG	362	
ProArgThrValSerCysAlaAspValLeuThrIleAlaAlaGlnGlnSerValAsnLeu	120	
GCAGGAGGTCTTCTTGGAGGGTTCCTTTGGGAAGAAGAGACAGCCGACAAGCATTTTTA	422	
AlaGlyGlyProSerTrpArgValProLeuGlyArgArgAspSerArgGlnAlaPheLeu	140	
GATCTCGCTAATGCGAATCTTCCAGCTCCATCCTTCACACTCCAGAACTTAAGGTGCT	482	
AspLeuAlaAsnAlaAsnLeuProAlaProSerPheThrLeuProGluLeuLysAlaAla	160	
TTTGCAAATGTTGGCCTCAACCGTCTTCTGATCTCGTTGCTCTCTCTGGTGGTCACACA	542	
PheAlaAsnValGlyLeuAsnArgProSerAspLeuValAlaLeuSerGlyGlyHisThr	180	
TTTGGTAAAAATCAATGTGCGATTTATTATGGACAGATTATACAACCTTCAGCAACACCGGA	602	
PheGlyLysAsnGlnCysArgPheIleMETAspArgLeuTyrAsnPheSerAsnThrGly	200	
CTACCCGACCCTACCCTCAACACTACTTACCTTCAAACCTCTTCGTCAACAATGTCCCCGT	662	
LeuProAspProThrLeuAsnThrThrTyrLeuGlnThrLeuArgGlnGlnCysProArg	220	
AATGGTAACCAAAGCGTCTTGGTGGATTTTCGATCTGCGTACGCCAACAGTTTTCGATAAC	722	
AsnGlyAsnGlnSerValLeuValAspPheAspLeuArgThrProThrValPheAspAsn	240	
AAATACTATGTGAATCTTAAAGAGCAAAAAGGTCTCATCCAGAGTGACCAAGAGTTGTTC	782	
LysTyrTyrValAsnLeuLysGluGlnLysGlyLeuIleGlnSerAspGlnGluLeuPhe	260	
TCTAGCCCCAATGCCACTGACACAATCCCCTTGGTGAGATCATATGCTGATGGCACACAA	842	
SerSerProAsnAlaThrAspThrIleProLeuValArgSerTyrAlaAspGlyThrGln	280	
ACATTCTTCAATGCCTTTGTGGAGGCCATGAATAGGATGGGAAACATTACACCTCTTACA	902	
ThrPhePheAsnAlaPheValGluAlaMETAsnArgMETGlyAsnIleThrProLeuThr	300	
GGAACTCAAGGAGAAATCAGGTTGAACTGTAGGGTGGTGAACCTCCAACCTCTCTACTCCAT	962	
GlyThrGlnGlyGluIleArgLeuAsnCysArgValValAsnSerAsnSerLeuLeuHis	320	
GATATAGTGGAGGTCGKTGACTTTGTTAGCTCTATGTGAGAAAAGTTGACTCAATATCTG	1022	
AspIleValGluValValAspPheValSerSerMET***		
GCTACCAGAGTATACGTTAAGATAAATAAAGCGCTCTCAAGATGTTACTTGAGAAGGAGA	1082	
ATATCTTTATTGGTGTGTAGTGTGTAGGGTATCTAAGTTGTTCTCTGTTTTTATGTTTGT	1142	
GTTGGCCTTTGAATGCGTTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTGATGGGTTTGGACGTTCTAT	1202	
CCTAATAAAGATGATAAAATAAATAATAACCCCCCCCCCCCC	1243	

Fig.1-10 DNA sequence of cDNA insert on pSK3. Refer to caption of Fig.1-9.

```

pSK1  -12          -1 1          18
2      V C L I L H A S L S D A | Q L T P T F Y D N S C P N V S N I V
3      - - - M - - - F N - - - T
      R D T I V N E L R S D P R I A A S I L R L H F H D C F V N G
          I   I
          I   I
          S
          T
      C D A S I L L D N T T S F R T E K D A F G N A N S A R G F P
          L
          L
      V I D R M K A A V E S A C P R T V S C A D L L T I A A Q Q S
      T V   I   R   V
      V   I   R   V
      V T L A G G P S W R V P L G R R D S L Q A F L D L A N A N L
      N
      N
      P A P F F T L P Q L K D S F R N V G L N R S S D L V A L S G
          S   E   A A   A   A   D   P
          S   E   A A   A   A   D   P
      G H T F G K N Q C R F I M D R L Y N F S N T G L P D P T L N
      T T Y L Q T L R G L C P L N G N L S A L V D F D L R T P T I
          Q Q   Q   V
          Q Q   R   Q   V
      F D N K Y Y V N L E E Q K G L I Q S D Q E L F S S P N A T D
          K
          K
      T I P L V R S F A N S T Q T F F N A F V E A M D R M G N I T
          D G   K
          Y   D G   N
      P L T G T Q G Q I R L N C R V V N S N S | L L H D M V E V V D
          E E
          E
      F V S S M
  
```

Fig.1-11 Comparison of amino acid sequences deduced from cDNA sequences of horseradish peroxidase genes. The amino acid sequences are identical or homologous with that reported by Welinder(27). The proximal and distal histidine residues are enclosed in boxes.

重が2つのアミノ酸が9つ、4つのアミノ酸が2つあった。ここではコドンの3番目の文字を複数にせず、単一の塩基に固定した。塩基の選択には特に指針は持たなかったが、得られたクローンはよく一致していた。しかし、スクリーニングに用いたプローブと相同性が低い塩基配列を持つアイソザイムや、異なるアミノ酸配列を持つアイソザイムなどはこのプローブでは選択できない。この3つのアイソザイム遺伝子以外に、さらに他にいくつかのアイソザイム遺伝子がある可能性も考えられる。そして、合成されたタンパク質が翻訳後に生じる修飾あるいはプロセッシングによりさらに多様性を示すのであろう。今回クローン化した pSK1 の塩基配列より推測されるアミノ酸配列は、Welinder の報告したベルオキシダーゼアイソザイムC のそれと一致した。Welinder は 1972年に初めて西洋ワサビベルオキシダーゼのアミノ酸配列を発表した⁶²⁾。また 1976年には Clarke と Shannon⁶³⁾らは部分アミノ酸配列を発表し、同じアイソザイムC であるにもかかわらず違いがあることを示した。その後 Welinder はさらに詳細に検討して 1976年に完全なアミノ酸配列を示し²⁸⁾、Clarke らの配列に不十分な精製のために生じたと思われる誤りがあることを指摘した。今回得たクローンのアミノ酸配列も Welinder のものを支持していた。Clarke らの配列は他のアイソザイムクローンの配列とも一致しなかった。

Welinder の示したアイソザイムC のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸であった²⁸⁾。カブのベルオキシダーゼの場合も同じくピログルタミン酸である。このことは、N末端でプロセッシングが起こっていることを示唆していた。cDNA より推定されたベルオキシダーゼC のアミノ酸配列よりN末端及びC末端側にエキストラペプチドが存在することが明らかになった。ピログルタミン酸は塩基配列より考察するとグルタミンに由来している。ベルオキシダーゼは植物細胞内では細胞壁に存在していると言われており²²⁾、シグナルペプチドのような局在化に関与する機能を有する領域が存在することが推測できる。このようなことからベルオキシダーゼのN末端側に局在化に関与するエキストラペプチドが存在することは興味深い。一方C末端側については、Welinder は全アミノ酸配列を決定した際に²⁸⁾、C末端が単一でないことを問題にしていた。決定した配列では Val-Asn-Ser であったが、カルボキシペプチダーゼA を用いて決定したC末端は約60%がセリンで、残りはアスパラギン、バリンであった。Welinder はC末端残基の不均一さは化学的なものか、或は遺伝子的な変異によるものか、のどちらかであると考へた。しかしクローニングの結果からは、化学的なものか、C末端エキストラペプチドのプロセッシングに伴う分解によるものか、のどちらかである。C末端エキストラペプチド自身の役割についてはよくわかっていない。しかし、動物細胞の場合にはN末端以外に、C末端にもシグナルペプチドを持つタンパク

質が存在するとの報告がある。

cDNA はポリ(A)⁺RNA を鋳型とし、オリゴ dTをプライマーとして逆転写酵素を用いて合成する。一般的に逆転写酵素は、他の DNAポリメラーゼよりも DNA 合成反応時に誤った塩基を取り込むことが多い。3種のペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子のうちの2つは逆転写酵素の誤りによる可能性もあるが、取り込み時の誤りの頻度は約 1000塩基に 1塩基程度と言われており、3種のアイソザイム遺伝子の場合には C1a と C1b 間、C1a と C1c 間、C1b と C1c 間で相同性が 93%、92%、94% で逆転写酵素の取り込みの誤りよると考えるには、異なる塩基が多すぎる。また、得られた全て cDNA のクローンは、翻訳開始コドン ATG を含む完全なペルオキシダーゼをコードする cDNA ではなかった。そのため、N末端にエキストラペプチドの存在が示唆されたにもかかわらずその全構造がわからず、また pSK2 についてはアイソザイムC のN末端であるピログルタミン酸に相当する位置までの3つのペプチドをコードする部分さえ欠いていた。以上のことを解決するにはゲノム遺伝子を単離すれば、cDNA で欠けた部分の情報のみならず、アイソザイム遺伝子の同定・確認ができるであろう。

第5節 要約

西洋ワサビ培養細胞より抽出したポリ(A)⁺RNA より、Gubler と Hoffman の方法を用いて約5万個より成る cDNA ライブラリーを作成した。スクリーニングにプローブとして用いるために、既に報告されているアミノ酸配列をもとに 14、35 オリゴヌクレオチドを合成した。これをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法で cDNA ライブラリーをスクリーニングし、8個の陽性クローンを取得した。陽性クローンの保有するプラスミドの制限酵素地図を作成すると、3つのグループに分けることができた。各クローン間でサザンハイブリダイゼーションにより高い相同性が認められた。さらに各グループより1つを選び、pSK1、pSK2、pSK3 と命名した。これらの cDNA 挿入断片の塩基配列を決定した。pSK1 の塩基配列より推測されるアミノ酸配列は、N末端及びC末端に余分なペプチド(エキストラペプチド)を有するが、報告されている配列と全く一致した。残りの2つも同様に pSK1 の配列と C1b 及び C1c は 93%、92% と高い相同性があり、酵素活性上あるいは機能上重要なアミノ酸残基は保存されていたことより別の2つのペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子であると結論した。以上の結果から西洋ワサビには少なくとも3つのペルオキシダーゼ遺伝子が存在する事がわかった。pSK2、pSK3の cDNA にコードされているアイソザイムもN末端、C

末端側にエキストラペプチドが存在していた。しかし、得られた cDNA はいずれも、翻訳開始コドン ATG を含まず、完全長なペルオキシダーゼ cDNA 遺伝子ではなかった。

第2章 西洋ワサビペルオキシダーゼのゲノム遺伝子のクローニング

第1節 緒言

西洋ワサビのペルオキシダーゼは約30種類ものアイソザイムが存在することが示されている²⁷⁾。この多様性が多数の遺伝子に起因するものなのか、あるいは数種のアイソザイム遺伝子の転写物のプロセッシングや差次的スプライシング、さらに翻訳後の複雑な修飾（プロセッシング、糖鎖の付加など）によるものかは不明である。

また、ペルオキシダーゼは植物体の分化に関与し、器官特異性があると報告されている²⁴⁾。一般的にこのような特異性は遺伝子の5'非翻訳領域にある調節領域に支配を受けている⁴⁶⁾。第1章では完全なペルオキシダーゼ cDNA 遺伝子を得ることができなかった。これらのことを踏まえて、本章ではゲノム遺伝子のクローニングを試み、cDNA に相当する3種のゲノム遺伝子、さらに別の2種の遺伝子を単離することができた。塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定し、遺伝子構造の検討をした。他の植物ペルオキシダーゼのアミノ酸配列と比較検討し、微生物及び植物由来のペルオキシダーゼ間で近位、遠位ヒスチジン周辺の配列と比較した。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用菌株

入ファージを取り扱う場合の指示菌として *Escherichia coli* NM539 (supF hsdR [P2 COX3])⁶⁵⁾ を用いた。

プラスミドへのサブクローニングや塩基配列決定のためには *E. coli* JM103 (Δ (lac-pro) thi strA supE endA sbcB15 hsdR4 [F' traD36 proAB lacI^o lacZ Δ M15])⁶⁶⁾ 及び DH5 α (F- endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (argF-lacZYA)U196 ϕ 80dlacZ Δ M15)⁶⁴⁾ を用いた。

2. ファージ 及び プラスミド

ゲノムライブラリー作成のために λ EMBL4 (Promega Co.)⁶⁵⁾ を用いた。またプラスミドへのサブクローニングには pUC18, pUC19 を用い、塩基配列決定のためには M13mp18, mp19 を用いた。

3. 培地

入ファージを取り扱う場合、指示菌の調製には 0.2% マルトースを含む LB培地を、ファージのプレーティングには 10mM MgSO₄ を含む LB寒天培地（寒天濃度 1.2%）及び上層用 LB培地（寒天濃度 0.7%）を用いた。プラスミド或は M13 ファージを取り扱う場合については、第1章第2節で述べた。

4. 西洋ワサビ培養細胞より染色体DNAの調製⁶⁶⁾

培養細胞より染色体 DNA の抽出は、Blin と Stafford の方法⁶⁶⁾に従った。第1章第2節で述べたように培養した細胞約50gを液体窒素存在下、ワーリングブレンダーで破碎した。200 ml の H緩衝液（25mM MES, 10mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 20mM KCl, 25mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol, 40% glycerol, 600mM sucrose）を加え、テフロンホモジナイザーでさらに細かく砕いた。遠心分離（KUBOTA KR-20000T, RA-6, 4,000rpm, 20分間, 4℃）した後に、ペレットを 100ml の W緩衝液（25mM MES, 10mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 20mM KCl, 25mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol, 25% glycerol, 500mM sucrose）に懸濁し、水中に 30分間放置した後遠心分離（RA-6, 4,000rpm, 20分間, 4℃）した。ペレットを 30ml の S緩衝液（10mM Tris-HCl, pH7.9, 5mM EDTA）に懸濁し、3ml の Det 緩衝液（200mM EDTA, 10% sodiumsarkosylate）、1ml proteinase K（Sigma）溶液（8mg/ml）を加え、37℃で1時間保持し、遠心分離（RA-6, 10,000rpm, 20分間, 4℃）で上澄液を集めた。4.7ml の上澄液に CsCl 4.7g、エチジウムブロミド（EtBr）（5mg/ml）0.5ml を加え、Bazaral と Helinski の方法⁶⁷⁾に従い、CsCl-EtBr 平衡密度遠心分離を行なった。条件は日立分離用遠心機（80P 或は 55P）、ローターは RPV65T を使用し、50,000 rpm、12時間、18℃で行なった。染色体 DNA 画分を分取し、イソアミルアルコールで EtBr を除去し、TE 緩衝液に対して透析した。一部の DNA 溶液をとり、0.6% アガロースゲル電気泳動により十分な分子量（50kbp 以上）を持っていることを確認した。これを精製染色体 DNA として使用した。

5. 染色体DNAの Sau3AI による部分分解⁴⁸⁾

50μg の染色体 DNA を用いて Sau3AI で部分分解した。これに先立ち 10-20 kbp の断片が最も多く得られような Sau3AI の酵素単位と DNA 量の間を求め、これにより必要な Sau3AI の酵素量を算出して使用した。37℃で1時間分解後、1/10容量の停止液（200mM EDTA, 5% SDS）を加えて反応を停止し、一部を 0.7% アガロースゲル電気泳動により分解状態を確認した。エタノール沈澱により DNA を回収し、40μl の TE緩衝液に懸濁した。これを 10-40% のスクロー

ス密度勾配遠心により分画した。条件は、日立分離用遠心機（80P 或は 55P）、ローターは RPS40T を使い、18℃、16時間、33,000rpm により行なった。遠心管の底に穴をあけ、500 μ l づつ分取した。各フラクションより1部とり0.7% アガロース電気泳動により、DNA サイズを確認して目的の長さ（10-20 kbp）の断片を含む画分をエタノール沈澱し、減圧乾燥した。得られた沈澱物を 20 μ l の TE 緩衝液に溶解し、再び一部とり 0.7% アガロースゲル電気泳動によりその分子量を確認した。10-20 kbp の長さを持つ DNA を含む画分をまとめて、アルカリホスファターゼ処理をした。フェノール処理後、エタノール沈澱で DNA を回収し、10 μ l の TE 緩衝液に溶解させた。

6. 西洋ワサビゲノム遺伝子ライブラリーの作成⁶⁵⁾

ベクター DNA は、2.2 μ g の λ EMBL4 DNA を BamHI、SalI で切断後、フェノール処理し、エタノールで沈澱して用いた。この DNA（2.2 μ g）と Sau3AI で部分分解して得た西洋ワサビのゲノム DNA 1 μ g を 10 μ l の反応系で T4 DNA リガーゼを用いて、一晚、15℃ で反応させた。連結反応液を市販のパッケージングシステム（Packagene, Promega社）を用いて、その説明書に従いパッケージングした。指示菌は *E. coli* NM539 を使い、その調製は Murray らの方法⁶⁵⁾に従った。パッケージング液を SM 緩衝液（5.8g NaCl, 2.0g MgSO₄ · 7H₂O, 50ml 1M Tris-HCl, pH7.5, 5ml 2% ゼラチン を蒸留水で 1l に調製しオートクレーブしたもの）で適当に希釈したファージ液 0.1ml と指示菌 0.1ml を混合し、37℃ で 20分間保持し、上層寒天（0.7%寒天を含む LB 培地）3ml を加え、LB 寒天培地にプレーティングし 37℃ で培養した。

7. プロープの調製

プローブには pSK1（第1章第3節）の cDNA を PstI 断片として切り出し、³²P で標識して用いた。³²P による標識化は、[α -³²P]dCTP（比活性約 22.2TBq /mmol）で、Amersham 社の Multiprime DNA labeling system か Boehringer Mannheim Yamanouchi社の Random Primed DNA Labelling kit を用いて、それぞれの説明書に従い行なった。両キットとも Feinberg と Vogelstein のランダムヘキサマープライマー法⁶⁷⁾を基にしている。

8. プラークハイブリダイゼーション⁶⁸⁾

西洋ワサビゲノム遺伝子ライブラリーのファージプラークをナイロンメンブラン（Hybond N, Amersham社）に移し、約10分間風乾させた。変性液（0.5M NaOH, 1.5M NaCl）に 5分間浸し変性させ、中和液（0.5M Tris-HCl, pH7.5, 1.5M

NaCl) に 5 分間、2 度浸して中和した。メンブランを風乾後、80°C で 2 時間乾燥させて DNA をメンブランに固定した。0.1% SDS を含む 2 X SSC に、60°C、30 分間保温し、メンブラン上の夾雑物を除去した。プレハイブリダイゼーション液 (6 X SSC, 5 X Denhardt 液, 0.5% SDS, 100 μ g/ml calf thymus DNA) 中で 60°C で数時間保温し、次に 32 P で標識化したペルオキシダーゼ cDNA 断片をプローブとして加え、60°C、約 20 時間ハイブリダイズさせた。その後、2 X SSC、60°C でメンブランを数回洗浄し、乾燥させてオートラジオグラフィを行った。得られた陽性クローンは、1 つのプレート上で全てのアークがプローブと反応するという単一種のファージ液が得られるまでアークハイブリダイゼーションを繰り返し、純化した。

9. ファージ粒子からの DNA の調製

プレートライゼート法⁴⁸⁾を用いて、単一のファージを含む溶液中のファージ濃度 (力価) を上げた (約 10^9 /ml) 。

高力価のファージ溶液を用いて、*E. coli* NM539 に感染させて以下 2 つの方法を適宜用いてファージ粒子を調製した。11 の培養スケールでファージ粒子を多量に調製する際には、Manniatis らの方法⁴⁸⁾に従った。

また、5ml の培養スケールで調製する際には、Manniatis らの方法⁴⁸⁾を改変した。即ち、培地に LB 培地を用いて溶菌させ、1.5ml 用エッペンドルフチューブに 1ml の溶菌液と 1 滴のクロロホルムを入れて遠心分離を行なった (8,000rpm、5 分間、室温) 。上澄液を別のチューブに移し、100 μ l の 5M NaCl と約 500 μ l の 40% PEG 4000 溶液を加えて混合し、4°C に 30 分間放置した。この溶液を 12,000rpm で 10 分間遠心分離後、上澄液を捨て残ったペレットに 200 μ l の TE 緩衝液を入れてよく懸濁した。前記懸濁液に 200 μ l のフェノール溶液を加えよく混合し、12,000rpm で 5 分間遠心分離した。水層を別の新しいチューブに移し、400 μ l の クロロホルム / イソアミルアルコール 溶液を加えよく攪拌混合し 8,000rpm、5 分間の遠心分離により有機溶媒層と水層に分けた。水層を別のチューブに移し、100 μ l の 7.5M 酢酸アンモニウム溶液を加え、さらに 750 μ l の冷エタノールを加えて -80°C で、5 分間放置後遠心分離 (12,000rpm、10 分間) により DNA を回収した。これに 200 μ l の TE 緩衝液を加えて再度エタノール沈澱を繰り返した。

10. その他の材料及び方法

制限酵素・修飾酵素処理は、各々の使用書などに従った。プラスミド DNA の調製、アクリルアミドゲルあるいはアガロースゲル電気泳動、サザンハイブリダ

イゼーション、塩基配列の決定などは第1章第2節に示した通りに行なった。

第3節 結果

1. 西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソザイムゲノム遺伝子 prxC1c 単離

Manniatis らは単一コピーの遺伝子を全ゲノム DNA からサザンハイブリダイゼーションにより検出するためには少なくとも $10\mu\text{g}$ のゲノム DNA が必要であると述べている。そこで西洋ワサビのゲノム DNA $10\mu\text{g}$ を用いて EcoRI で分解し、1% アガロースゲル電気泳動により分画した。サザントランスファーにより DNA をナイロンメンブラン (Hybond N, Amersham社) に移した。プローブを ^{32}P で標識化した pSK1 の cDNA 断片を用いて 65°C でサザンハイブリダイゼーションを行なった。得られたハイブリドは $2 \times \text{SSC}$ 、 65°C で3度、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 65°C で1度という厳しい条件で洗浄した。その結果、約15kbp、約4kbp の大きさのハイブリダイズする断片を確認した。この約4kbp の EcoRI 断片をクローニングするために、ゲノム DNA を EcoRI で分解し、アガロースゲル電気泳動により分画し、ゲル上の相当する位置から約4kbp の大きさを持つ断片を回収した。この断片を EcoRI で分解した pUC18 に連結し、E. coli DH α を形質転換して約700個の組換え体を得た。pSK1 の cDNA をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。約4kbp の挿入断片をもつ陽性クローンを取得し、その一部の塩基配列を決定した。Fig. 2-1 に示すような構造をしていると推測した。この断片は pSK3 に対応するアイソザイムゲノム遺伝子 (prxC1c) をコードしていたが、prxC1c の第1イントロンより上流は含まず、従って第1エキソンに相当する部分を得ることができなかった。

2. 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の単離

西洋ワサビ培養細胞より調製したゲノム DNA を Sau3A I で部分分解し、BamHI で分解した λ EMBL4 をベクターに用いて、約6万個のゲノム遺伝子ライブラリーを作成した。pSK1 の cDNA を ^{32}P で標識化しプローブとして使用し、ブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行なった。9個の陽性クローン (クローン 2, 4, 8, 9, 10, 15, 19, 22, 23) を得た。これらクローンとのハイブリダイゼーションのシグナルの強さは、クローンによって違っており、大きく3種類に分けることができた。クローン 8, 9, 10, 22 はシグナルが強く、クローン 15 は弱く、クローン 2, 4, 19, 23 は両者の中間程度の強さだった。各々のクローンよりファージ DNA を抽出した。調製した DNA を EcoRI で分解

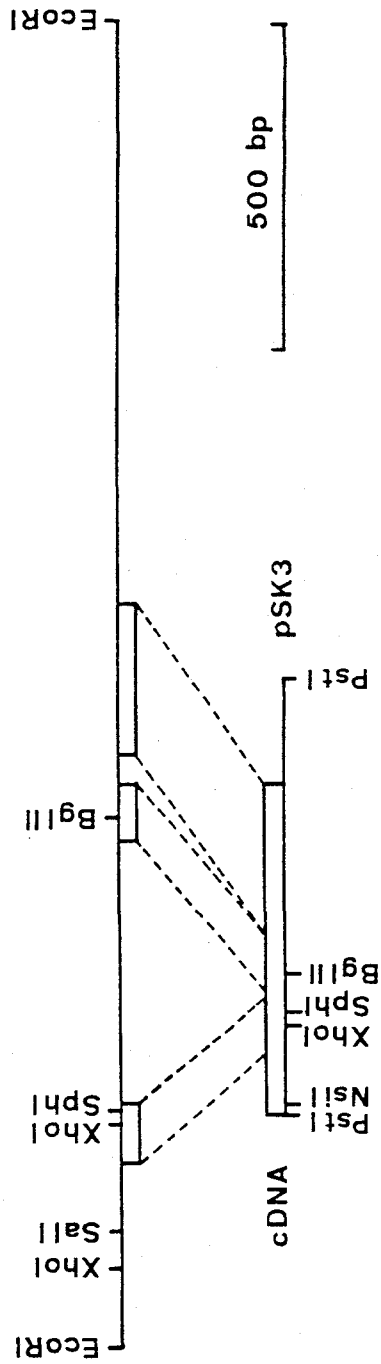


Fig.2-1 Restriction map and genomic structure of *prxC1c*. The gene structure of *prxC1c* cDNA fragment is shown below (refer to text in Chapter 1). Open box indicates exons or coding regions.

後、1% アガロースゲル電気泳動で分画し、DNA 断片をナイロンメンブランに移した。pSK1 の cDNA をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行ない、cDNA と相同性のある断片を検出した (Fig. 2-2)。クローン 15 及び 23 は、プレートライゼート法による高濃度ファージ液の調製段階で他の陽性クローンが混入していたようで、いずれもハイブリダイズしていた約 7kbp の断片は他の陽性クローンの混入したものだった。再びファージ DNA を *EcoRI* で分解し、アガロースゲル電気泳動で分画後、ハイブリダイズしたバンドに相当する断片をそれぞれ回収して pUC18、或は pUC19 にサブクローニングした。サブクローニングした断片の制限酵素地図を作成し、さらに部分的な塩基配列を決定することにより、9種の陽性クローンは、ブランクハイブリダイゼーションの際のシグナルの強さと同様に、クローン 8、9、10、22、クローン 2、4、9、13、及びクローン 15 の3つのグループに分類できた。各々のグループに属するクローンはゲノム上のほぼ同じ位置を含む断片をクローニングしていた。

3. ペルオキシダーゼゲノム遺伝子 *prxC1a*, *prxC1b* の塩基配列の決定

ブランクハイブリダイゼーションで最も強いシグナルを示したグループからクローン 22 を選び、アイソザイムC の cDNA とハイブリダイズする *EcoRI* 断片 (約7kbp) をサブクローニングし、制限地図を作成した。また、pSK1の cDNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションによりペルオキシダーゼ遺伝子と相同性のある位置を限定していった (Fig. 2-3)。そこで Fig. 2-3 に示すようなストラテジーに従い、塩基配列を決定した。この断片上には、pSK2 の cDNA 部分に対応するゲノム遺伝子 *prxC1b* 及び pSK1 の cDNA 部分に対応するゲノム遺伝子 *prxC1a* の *Bgl* II 部位より上流がタンデムに含まれていた。クローン 22 の場合 *Bgl* II 認識部位 (AGATCT) 内の塩基 GATC が *Sau*3A I の認識部位にあたりこの部分までが入 EMBL4 にクローニングされていた。しかし別のクローン 9 では pSK1 の *Bgl* II よりさらに下流も含まれており、その部分の塩基配列を決定した。クローン 22 とクローン 9 で得られたデータを組み合わせ、*prxC1a* と *prxC1b* の全塩基配列を得た (Fig. 2-4)。pSK1、pSK2 の各 cDNA と比較してエキソンの構造を決定した。アイソザイムC1aとC1bのゲノム遺伝子は3つのイントロンと4つのエキソンを持つ構造をしていた。

4. ペルオキシダーゼゲノム遺伝子 *prxC2*, *prxC3* の塩基配列の決定

ブランクハイブリダイゼーションで中程度シグナルを示したグループよりクローン 2 を選び、pSK1 の cDNA とハイブリダイズした *EcoRI* 断片 (約4kbp) をクローン化して制限酵素地図を作成し、Fig. 2-5 に示すようなストラテジーに従

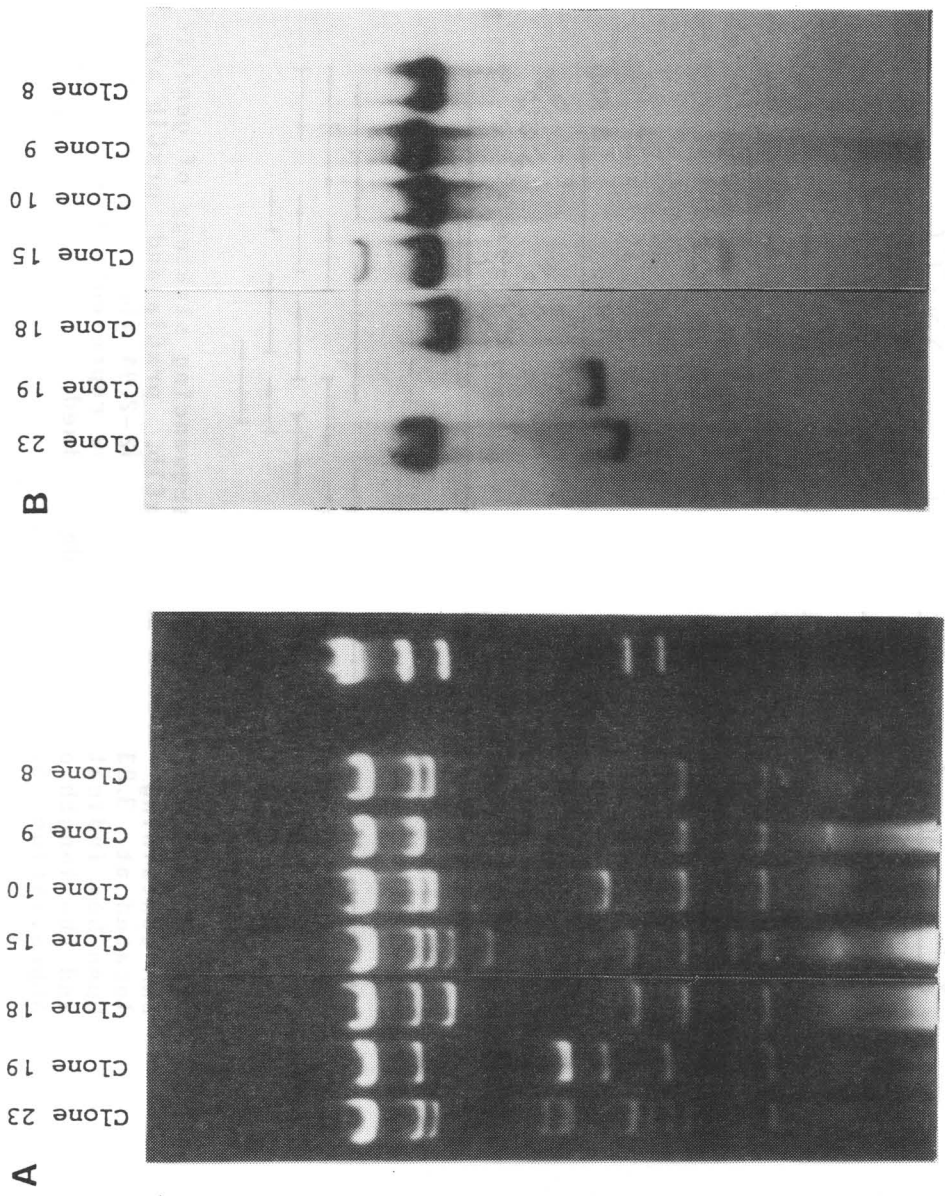


Fig.2-2 Southern hybridization of positive phages clones digested with EcoRI. (A) Agarose gel electrophoresis. (B) Southern blotting. The phages are isolated from clones 8, 9, 10, 15, 18, 19 and 23.

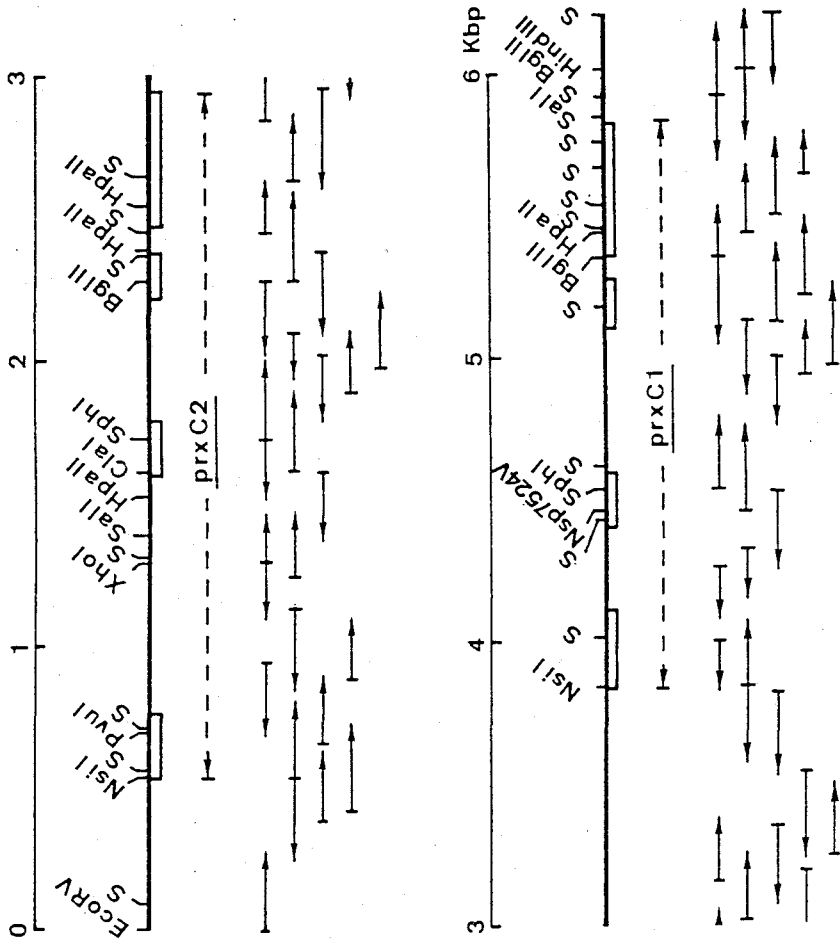


Fig.2-3 Restriction maps and sequencing strategy of genomic DNA containing prxC1a and prxC1b. prxC1a and prxC1b are located at 3.83-5.82 kbp and 0.52-2.94 kbp, respectively. Open box indicates exons. Arrow represents the direction and the length of sequence determined. Abbreviation: S, Sau3AI.

GATATCCACATGTTTCAATTCTATTGGTCCAATTTTTTTTTTCCTTAAATTTATTTTTAG	60
AACGAGACTCACATTCATCTCAATTCTATTGATCTAATTTTTTTTTTAAACGATTGTAGA	120
GACTCATGTGAGTCATATAGAAGTGCTCTAACTATGAAGAGTAGTCTTGACTTGCTTTGT	180
CCATTTTTGATATAACGTTTATATCATAACACATTTTACATGGTAATTTGTCATGCGAAGG	240
CAGGAAACGAGGATGATTGGAGATAACTTGAGAAAATAAAATTATACGTATCTTTGTACCA	300
ACAACTGCAATTTCGTCAAAAACCGTGCCCACTCCTACCTACCCGC	360
<u>TATATAT</u> GAGTAGTTA	
GTTGACAAGAAGAAAAGCCTTCATTTGCTGTTGAGAGAAAAGCCCTT	420
<u>CAAT</u> TGAGAAAAT	
CAAAGCCTCCAGGTTTGACCCGTATTGCC	480
<u>TATAAAA</u> GGATT	
<u>TATATAAG</u> GATATGGACCTTA	540
CTCCTATTCTCGGTTAAACACAATTAATTAGTTTTCTTTTTATCTTTAAAAATATGCATT	
	MetHisS
CCCCTTCTTCTACTTCGTTTACTTGGATCTTAATCACATTGGGATGTCTTGCGTTTTATG	600
erProSerSerThrSerPheThrTrpIleLeuIleThrLeuGlyCysLeuAlaPheTyrA	
CGTCTTTGTCCGATGCTCAGCTTACCCCTACCTTCTACGACACTTCATGTCCTAATGTCT	660
laSerLeuSerAspAlaGlnLeuThrProThrPheTyrAspThrSerCysProAsnValS	
CAAACATCGTACGAGACATCATTATTAATGAGCTACGATCGGACCCTCGTATCACCGCGA	720
erAsnIleValArgAspIleIleIleAsnGluLeuArgSerAspProArgIleThrAlaS	
GTATCCTTCGTCTTCACTTCCACGACTGCTTTGTTAAT	780
<u>GTAAGATAATACTTTTTTCATAT</u>	
erIleLeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValAsn	
<u>TTCTATTGCGTTATGAATTATTGTGCGTTTTATCCTTTAGATATTGATAAATCACCTCAA</u>	840
GTCAAAATTTAATAAAACATTAAATAAAATATGATACAAAGAGTCAATTTGTTTTGTAGG	900
AATATAATAGAAATTTCAACATGTTTTTAAATATGGGTCCAAAATGTTGAAAACGACATT	960
TCTTATGAAAAAGAGTGAGTATGTATTAATCATAATTTGCTATAATTATCGGGTTGTGA	1020
AAGTAGTTCATTTCATTTTGACATGTAGATGGTTGCATAGTACGTTTTGTCTACAACATT	1080
TTTTTCTTGATTCATTTTACAAAATTACAAGTTCCTGCCTCCGAAAAATATGTATAGC	1140
CTTACTATGACATAATTACATAATTTACATTCAATAATAATTTTTATTTTTATATAATA	1200
ATTTTTATTTTTATTTATATAAAAAAGAAAGATATTATTGTTTGTGGTGTGAGTTGGGTG	1260
AAATCGTATCCTAAATAAAAGTCACTCGAGTAACGGTCTGATCCAGATTAATAAATCAG	1320
TACCAAATTTACATGGTTAGATGTCGTGTGTTAGATTTTGCTGTTGAATAATTAATAAC	1380

Fig.2-4. Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of genomic DNA containing prxCla and prxClb. TATA and CAAT boxes are boxed. Underlined sequence denotes polyadenylation signal. Vertical arrow shows the poly(A) addition site. Horizontal arrow shows the homologous regions between prxCla and prxClb in the 5' and 3' junction of introns.

TTA ACTCTCGT CGACAATGATAATGCTAAAATATTTATGAAATCGGATTCACGCCCGTGT 1440
 TACAGTATTAAGAGCATGGTGGCCGTACCAAACACGATACGAATTTAATGGTGACAAAAAA 1500
 TCTCTGTAAATTGTTACCGGTGGTAAAGAGTTAGCTATGGATGTAATACATGTACTAAT 1560
AATTTGTTAATTAATATTTTGGATGTTTGAAGGGTTGTGACGCATCGATATTGTTAGAC 1620
 GlyCysAspAlaSerIleLeuLeuAsp
 AACACAACATCATTTCTAACAGAGAAAGATGCGCTTGAAACGCAAACCTCGGCTAGAGGA 1680
 AsnThrThrSerPheLeuThrGluLysAspAlaLeuGlyAsnAlaAsnSerAlaArgGly
 TTTCCTACAGTTGACAGAATCAAGGCCGCGGTGGAGAGGGCATGCCCAAGAACAGTTTCA 1740
 PheProThrValAspArgIleLysAlaAlaValGluArgAlaCysProArgThrValSer
 TGCGCAGATGTGCTTACCATTGCAGCTCAACAATCTGTAAATTTGGTATGCTCCATTCAT 1800
 CysAlaAspValLeuThrIleAlaAlaGlnGlnSerValAsnLeu
 TACAAACATTGTTTTTTAATTTTAAACATATTTTTTAGTTGTTTGAGAGCGTCACAATCTA 1860
 TATTTAGTATCAACAACCTGTTGACTATATGAGGTATTCATGGATTAATCGAGAAATATT 1920
 CAAAACGCGTGGTCCCGTTAAGAAAATTTGACAAGTTTAATATCATTGGAAAAATTAGGT 1980
 CTCATCACAAGTTTTTACCTTGGTAGGCAAAGCTACTTTATAATTAACCAAAAAGGATAA 2040
 TTTTCATTTTTTCCAAAAATAGTGGAGATAAAACAAACTCCACTTTGAGTATATCATCAA 2100
 TCAATTTATACTACATGTTTATCTTTTTCTCTTTACATATTGAAACTCCGAGTGACAAA 2160
 TTAATCTCACAAAAATAATTATTTTTGAATATAATGGTTACTATTATATTATAGGCAGGAG 2220
 AlaGlyG
 GTCCTTCTTGAGGGTTCCTTTGGGAAGAAGAGACAGCTTACAAGCATTTTTTAGATCTTG 2280
 lyProSerTrpArgValProLeuGlyArgArgAspSerLeuGlnAlaPheLeuAspLeuA
 CTAATGCAAATCTTCCAGCTCCATTCTTTACACTTCCACAACCTAAGGATGCCTTTGCAA 2340
 laAsnAlaAsnLeuProAlaProPhePheThrLeuProGlnLeuLysAspAlaPheAlaL
 AAGTTGGCCTCGACCGTCTTCTGATCTCGTTGCTCTCTCCGGTAGTTAACAAAAGAAAA 2400
 ysValGlyLeuAspArgProSerAspLeuValAlaLeuSerG
 TTAACACCATTTGATATAAGTTCAATTAGATATTTTATTATTGATCTTATTATATGGTC 2460
TTTCTTTTGTAGGTGGTCACACATTTGGAAAAATCAGTGTAGATTTATTATGGACAGA 2520
 lyGlyHisThrPheGlyLysAsnGlnCysArgPheIleMetAspArg
 TTATACAACCTCAGCAACACCGGACTACCCGACCCTACCCTCAACACTACTTACCTTCAA 2580
 LeuTyrAsnPheSerAsnThrGlyLeuProAspProThrLeuAsnThrThrTyrLeuGln

ACTCTTCGTCAACAATGTCCCCTAAATGGAAACCAAAGTGTATTGGTGGATTTTCGATCTG 2640
 ThrLeuArgGlnGlnCysProLeuAsnGlyAsnGlnSerValLeuValAspPheAspLeu
 CGTACGCCAACGGTTTTTCGATAACAAATACTATGTGAATCTTAAAGAGCAAAAAGGTCTC 2700
 ArgThrProThrValPheAspAsnLysTyrTyrValAsnLeuLysGluGlnLysGlyLeu
 ATTCAGAGTGACCAAGAGTTGTTCTCTAGCCCCAATGCCACTGACACAATCCCCTTGGTG 2760
 IleGlnSerAspGlnGluLeuPheSerSerProAsnAlaThrAspThrIleProLeuVal
 AGGTCATTTGCTGATGGCACACAAAAATTCTTCAATGCGTTTGTGGAGGCTATGAATAGG 2820
 ArgSerPheAlaAspGlyThrGlnLysPhePheAsnAlaPheValGluAlaMetAsnArg
 ATGGGAAATATTACACCTCTTACAGGAACTCAAGGAGAAATCAGGTTGAATTGTAGGGTG 2880
 MetGlyAsnIleThrProLeuThrGlyThrGlnGlyGluIleArgLeuAsnCysArgVal
 GTGAACTCCAACCTCTACTCCATGATATAGTGGAGGTCGTTGACTTTTGTTAGCTCTATG 2940
 ValAsnSerAsnSerLeuLeuHisAspIleValGluValValAspPheValSerSerMet
 TGAGAAAAGTTGAGTCAATATCTGGCTACCAGAGTACACGTTAAGATAAAATAAGCGCTC 3000
 TCAAGATGTTACTTGAGAAGGAGAAGATATTTATTGGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGT 3060
TCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCCTTTGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTT 3120
ATGGGTTTGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGTTCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCCTT 3180
TGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTTTATGGGTTTGGACGTTCTATCCTGAATAA 3240
 GATGACACAATAAAAAGATGTTACTTGAGAAAATGTTATTTTACATTTCTCTTTTTCTAG 3300
 ATATTCTATAACATACTTTTCATTTTCTTACCATACTTTCTACGAAATTTCCAATCAACTT 3360
 TTTTGTGCGTAAAAAAATTTCTTACGAATTTTCTACCATTTTTCGATTTCTTACCAGACATT 3420
 TCATACTAACAAATTTAGTAGAAAAACAGTCATTTTTACCCTTTTCTGCGATATAAGCCG 3480
 TAGGAATTAAGCATTCTTCTGTATCACTAGGCATGGTGTCTCGTGTGTGTGTACACA 3540
 AAGATAAAAAAATTCATAAAGAATTAATAAATGAATATTATGGGGTTTACTCTATAATAC 3600
 TTAATAAATATAAAGAGTGAAGATGGTAAATTAACAAATTTAGTCCACATTTTATTATTAG 3660
 TGAAATGTTTATATGATTTCAAATAAATAGATTTCTACTAATTAGTAATGATTACCCCA 3720
 AAGAAAAAGCCTCCAAGTTAGACTCGTTTTGCGTATAAAGGATTCTTAAAGATATGC 3780
 ACTTCCATCATCTTCTCAGTAATATAGTTTTCCCTTTAAAAATGCATTTCTCTTCTTCT 3840
 MetHisPheSerSerSer

TCTACTTTGTTCACTTGTATAACCTTAATCCCATTGGTATGTCTTATTCTTCATGCTTCT 3900
SerThrLeuPheThrCysIleThrLeuIleProLeuValCysLeuIleLeuHisAlaSer
TTGTCTGATGCTCAACTTACCCCTACCTTCTACGACAATTCATGTCCATAATGTCTCTAAC 3960
LeuSerAspAlaGlnLeuThrProThrPheTyrAspAsnSerCysProAsnValSerAsn
ATCGTACGGGATACTATTGTCAATGAGCTAAGATCAGACCCTCGTATTGCCGCGAGCATC 4020
IleValArgAspThrIleValAsnGluLeuArgSerAspProArgIleAlaAlaSerIle
CTTCGTCTTCACTTCCACGACTGCTTTGTAAATGTAATAACTACTACTTTTCATATTTCTAT 4080
LeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValAsn
TCGTTACGAATTATTATATGTTTCATGTAACTGATTTTTAAATGCTTATCTATTCATAC 4140
TGTCTAATTACATTTATCATTGAAATTTGATTATTAATCAGTTTTAATGTGATTAATAT 4200
AAATTTTAAAAAATGTGATTAATATATAAACATTTTGATGATAAAATTTTTAATTTGTT 4260
TATTTTTCTTTTTTTTTACTGAATAAAATTTTTTTTAGTGGATGACAAAAATGTTACATT 4320
GTTGCCGTGGTAAAGATTCAACTGTATATGGATGTAATACATTGAATAATAATTTATTAA 4380
ATGATATATTGGATTTTTGAAAGGGTTGTGACGCATCGATCTTGTTAGACAACACAACAT 4440
GlyCysAspAlaSerIleLeuLeuAspAsnThrThrS
CATTTCGAACAGAGAAAGATGCGTTTGGAAACGCAAACCTCGGCAAGAGGATTTCCAGTGA 4500
erPheArgThrGluLysAspAlaPheGlyAsnAlaAsnSerAlaArgGlyPheProValI
TTGATAGAATGAAAGCCGCGGTGGAGAGTGCATGCCCAAGAACCGTTTCATGCGCAGATT 4560
leAspArgMetLysAlaAlaValGluSerAlaCysProArgThrValSerCysAlaAspL
TGCTCACCATTGCAGCTCAACAATCTGTCACTTTGGTATGCTCCATTGATCCCCTAACT 4620
euLeuThrIleAlaAlaGlnGlnSerValThrLeu
TTTATTCATTACAATTATTGCTTTTTAATTTTTAATATATCAAATAGTCACTTTACATATCA 4680
ACACGGCAACCTAAGTTTAGAAAAACAAAAATCGGGATATTTTTAGCTGTTTGAGAACGA 4740
CATGGAAATTATTTAGTTGTTTCAGAAGGGTCACAATCAATATATAGTATCAACTTTCCA 4800
ATCATATGACTAGTATTCAAATTAATCGGGAGATATTTGAAACGCGTGGTCCCCGTAGA 4860
GAAAACTTGAAATGTTTAATATCACTGAAAAAATTAATCTCATTAAACAAGAATATACTT 4920
ACTTGGCAATACTACGTTTTTAGTTAACCAAAAAGAATGGTTTTTCATATTTTTCAAGAAA 4980
GAGTGGAGACTTAAAACTTCACTTCAAGCATATATATCATCAATGAATTTAAATTACAC 5040
ATATTTTTCTCTTAACACATTGAAACTTCTAAATGAGGAAAATAATAATCAAAACAAAAT 5100

GGTTATTATTATAGGCGGGAGGTCCTTCTTGGAGAGTTCCTTTGGGCAGAAGAGATAGCT 5160
AlaGlyGlyProSerTrpArgValProLeuGlyArgArgAspSerL

TACAAGCATTCTGGATCTTGCTAATGCAAATCTTCCAGCTCCATTCTTACACTTCCAC 5220
euGlnAlaPheLeuAspLeuAlaAsnAlaAsnLeuProAlaProPhePheThrLeuProG

AACTTAAAGACAGCTTTAGAAATGTTGGCCTCAACCGTTCTTCTGATCTCGTTGCACTGT 5280
lnLeuLysAspSerPheArgAsnValGlyLeuAsnArgSerSerAspLeuValAlaLeuS

CCGTAATTAACAAAAATATATTAACACACCATTTGATATAGTTGTATTTAGTGAGTTT 5340
erG

ATTAAGATCTCTCTTTCTTTTGTAGGGGGCCACACATTTGGTAAAAATCAGTGTCCGT 5400
lyGlyHisThrPheGlyLysAsnGlnCysArgP

TTATTATGGACAGATTATACAACCTCAGCAACACCGGTTTACCCGATCCTACTCTCAACA 5460
heIleMetAspArgLeuTyrAsnPheSerAsnThrGlyLeuProAspProThrLeuAsnT

CTACTTATCTCCAAACTCTTCGTGGACTATGTCCCCTCAATGGTAATCTAAGCGCTTTGG 5520
hrThrTyrLeuGlnThrLeuArgGlyLeuCysProLeuAsnGlyAsnLeuSerAlaLeuV

TGGATTTTGATCTACGTACGCCAAGCAGATTTTGGACAACAAATACTATGTGAATCTCGAAG 5580
alAspPheAspLeuArgThrProThrIlePheAspAsnLysTyrTyrValAsnLeuGluG

AGCAAAAAGGACTTATCCAAAGCGACCAAGAGTTGTTCTCTAGCCCCAATGCCACTGACA 5640
luGlnLysGlyLeuIleGlnSerAspGlnGluLeuPheSerSerProAsnAlaThrAspT

CAATCCCTTTGGTGAGATCATTGCTAATAGCACACAAACATTCTTCAATGCGTTTGTGG 5700
hrIleProLeuValArgSerPheAlaAsnSerThrGlnThrPhePheAsnAlaPheValG

AGGCGATGGATAGGATGGGAAACATTACACCTCTTACAGGAACTCAAGGACAGATCAGGT 5760
luAlaMetAspArgMetGlyAsnIleThrProLeuThrGlyThrGlnGlyGlnIleArgL

TGAATTGTAGGGTGGTGAACCTCCAACCTCTCTACTCCATGATATGGTGGAGGTCGTTGACT 5820
euAsnCysArgValValAsnSerAsnSerLeuLeuHisAspMetValGluValValAspP

TTGTTAGCTCTATGTGAGCATAGTCGACGCCATATGTGGCTACCATAATATATATAAAA 5880
heValSerSerMet

TAATAAAACGCTCTTAAGATGTTACTTGAGCATGAGAAGATCTCTATCGGTTGTGGAGTA 5940

TCTGAGTAGCTCTTATGTATTTCTGTTTGATTTTGGCTTTTGAAGACGTTTCCGACCTTC 6000

CGGTAATCGGTTTAAGCTTGTATGGATTTGGACGTTCTATACTAATAAAAATGACAATAA 6060

AAGAGATGTATTTGACAATAAGCAGATATATATATACGCAAAATTACAGCAAAAAAATAA 6120

ATTTAACGATAATTTCTGTAGATAAAACATACTCTGCTATGAGATTATTAATTCATTAT 6180

C 6181

い塩基配列を決定した (Fig. 2-6)。また、この EcoRI 断片上にペルオキシダーゼ遺伝子をすべてコードしていなかったため、3'末端側の領域を含むような別の制限酵素断片をクローニングして塩基配列を決定した。

ブランクハイブリダイゼーションで最も弱いシグナルを示したクローン 15 から pSK1 の cDNA とハイブリダイズした 1.5kbp と 0.8kbp の EcoRI 断片をサブクローニングした。Fig. 2-5 に示すようなストラテジーに従い塩基配列を決定した。両 EcoRI 断片上にペルオキシダーゼ遺伝子を完全にコードしていなかったため、3'末端側の領域を含む別の制限酵素断片をクローン化し、また両 EcoRI 断片の間に別の小さな EcoRI 断片が存在する可能性もあるためにこの領域カバーする別の制限酵素断片をクローン化して最終的な塩基配列を決定した (Fig. 2-7)。クローン 2 とクローン 15 の塩基配列及びそれから推測されるアミノ酸配列を、先に決定した prxC1a、prxC1b と比較し、エクソン部分と全体のアミノ酸配列を推定した (Fig. 2-6, 2-7)。その結果、クローン 2 及びクローン 15 のコードするアミノ酸配列は、prxC1a、C1b、C1c のものと異なっていたが、全体としてペルオキシダーゼアイソザイム C のそれと類似しており別の第 4、第 5 のアイソザイム遺伝子と判断して、これらを prxC2 及び prxC3 と命名した。prxC2 は 347 残基、C3 は 349 残基のアミノ酸をコードしていた。

5. 5種のペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子の構造

①ペルオキシダーゼゲノム遺伝子の構造

完全長の遺伝子が得られている prxC1a、C1b、C2、及び C3 は、4つのエクソンにより構成されていた (Fig. 2-8)。prxC1c については部分的に明らかになっているゲノム遺伝子と cDNA 遺伝子とから、同様に4つのエクソンから成り立っているものと考えられる。第1エクソンはN末端側のエキストラペプチドの長さは異なるが、第2、第3エクソンは5種のアイソザイム間で同じであり、第4エクソンについては prxC3 がアミノ酸3残基分の 9bp 短かった。いずれの場合もコード領域を分断するイントロンの挿入位置は全く同じであった (Fig. 2-13)。

5種の遺伝子間 (エクソン部) の相同性は、Fig. 2-9 に示したような prxC1a、C1b、C1c 間では 90% 以上の非常に高い相同性を示した。しかし、prxC2、C3 は C1a、C1b、C1c に対してそれぞれ 76% 以下という低い相同性であった。特に、C3 は C1a、C1b、C1c に対して全体的に相同性が低く、C2 との相同性は 63% と最低だった。

② 5'非翻訳領域

5'非翻訳領域の塩基配列 (Fig. 2-10) の明らかになっている4種のアイソザイム

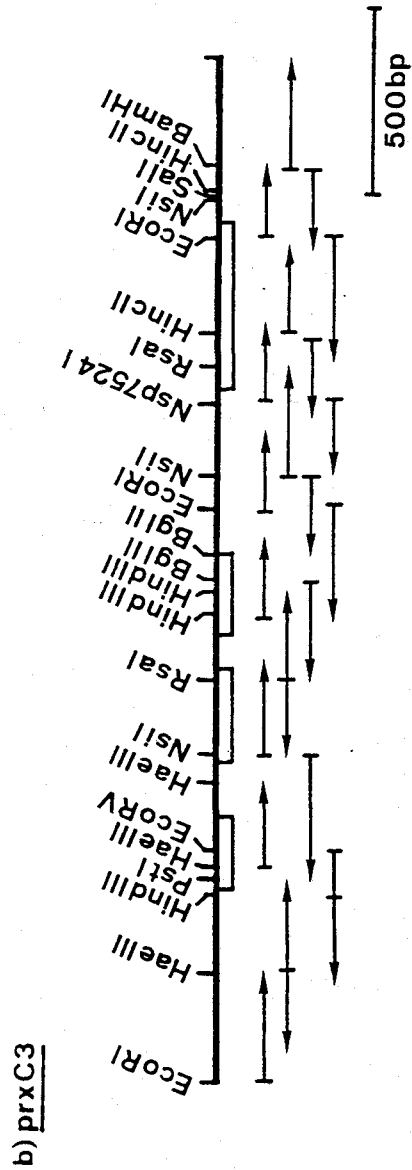
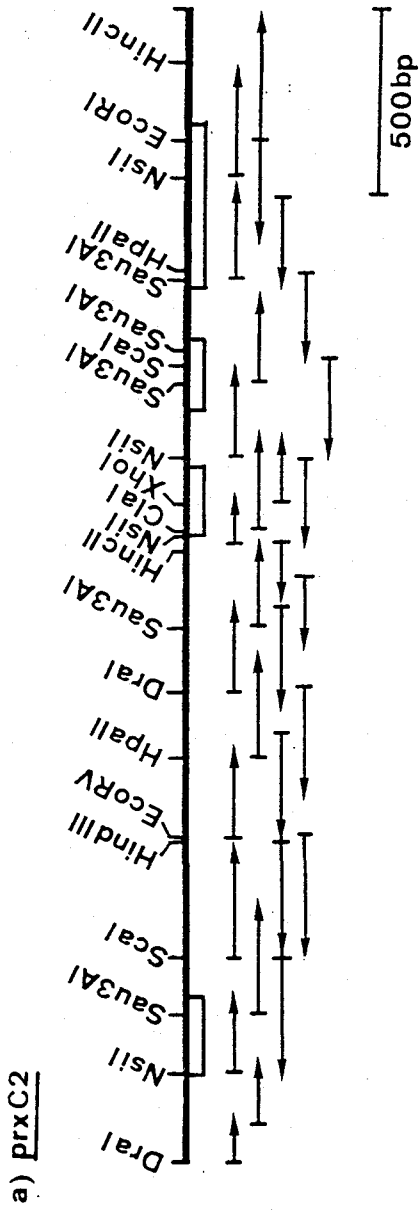


Fig.2-5 Restriction maps and sequencing strategy of horseradish peroxidase isozyme genes(prxC2 and prxC3). Open box denote exons.

tttaaaccactttgtacagaattatttaaaccacattgctcgattatcttccacatgtaata 60
 agtcaggattattggataagaggtatatttatacaccacttgagtacaaatatctccaataat 120
 tcacaaaaagtaaaagccgccgagctagatccttttttgcctataaaaaggatttgtaag 180
 acgaaactttattcactcaacttcaaacctaaccaagaattttatcttagagagcaaaag 240
 aaaATGCATTCTCTCCAGTTTGATAAAAATTGGGATTTCTTCTTCTTCTTCTTAATGTA 300
 MetHisSerSerSerSerLeuIleLysLeuGlyPheLeuLeuLeuLeuLeuAsnVal
 TCATTGTCTCACGCTCAACTAAGCCCTTCATTTTACGATAAAACATGTCCACAAGTCTTT 360
 SerLeuSerHisAlaGlnLeuSerProSerPheTyrAspLysThrCysProGlnValPhe
 GACATTGCAACCAATACCATTAAAACTGCGCTGAGATCAGACCCTCGCATCGCTGCGAGC 420
 AspIleAlaThrAsnThrIleLysThrAlaLeuArgSerAspProArgIleAlaAlaSer
 ATCCTTCGTCTTTCATTGCCAGACTGCTTTGTTAATgtaagataccactagattcaatat 480
 IleLeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValAsn
 tttcacgtatatattaattaaggccaaatgactttttattaacgctagtaaaaaacctgt 540
 ttaagtacttcaactgtaaactaccatcttaaatctagctaactctatatgggttacaata 600
 tttttgtacacaagatttatattagatattatataaaaattaaaattattcatatgggtgct 660
 aatacttgtcgccgttcaccaatataatccataaattattgtcctgtcgcagaaaaaata 720
 caaaagagttgaaatatactaaaaataaatcttactagagatgagtatttatcatagat 780
 ttggtgtcgttttcggatattgattgattaagaaattttattatataagaatgtcttttgg 840
 tcctgatataatcaccaatcacagcttgatattaggatatcaaaaagtgatagacatttt 900
 gatttgggttcgactcaaatggttttttttgcctaaaaatcgactcaaatggttcgttc 960
 tcggtttattcatttcaaatagaatataactcaataaaagtctcaaaactgtataaaagttg 1020
 tgtagttttggttattgaaatgttgggtttcttttggttcagattaaaacaaaagaaaa 1080
 caccggagttaaataaaaaatagaataacaaaataaaattattatatcaacaaaaaatat 1140
 gtcttttagttaaatattttataagaacttgattcgacttattttgactaattttggtt 1200
 caatttggagggggcagttttataaatggaccaatcgcttcttaagcaaatatgat 1260
 ttaaatagtacaacgtagattgctttcttatcttaactctcaagtttcagattctgtcgt 1320
 caaagtatagttcaagatgattagtttaataattagcgaactcatggctgtttcaattaa 1380
 tcggcaaaaacaaaaacaagtattggacttttgatggatttttatttgggagatcaaatc 1440
 agtttttttgtccaccatcgaaatttgaactctaaattttcaaaatctctctttttttt 1500
 tttttttgttaaacctctttataattttttttctcacagcaaatcattatttactgat 1560
 tagatagctcaggataggatgggaaacacaaattcttgactgtttacggatgtaagat 1620
 gttttgatttaactatgaatatggtagttgactaaatgtgaagaactatatttaattttg 1680
 aaacagGGATGTGATGCATCGATATTGCTAGACAACACTACATCATTTAGGACTGAGAAA 1740
 GlyCysAspAlaSerIleLeuLeuAspAsnThrThrSerPheArgThrGluLys

Fig.2-6. Nucleotide sequence of horseradish peroxidase isozyme gene prxC2. Untranslated sequence are in lower case letters. The entire amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is shown below the coding region. TATA boxes are underlined and CAAT boxes are double underlined. Polyadenylation signals are marked with horizontal arrows.

GATGCGTTTGGGAACGCAAGATCAGCTCGAGGCTTCGACGTAATCGACACAATGAAGGCT 1800
 AspAlaPheGlyAsnAlaArgSerAlaArgGlyPheAspValIleAspThrMetLysAla
 GCCGTGGAGAAAAGCATGTCCTAAAACCGTTTCATGTGCTGATTGCTCGCCATTGCAGCT 1860
 AlaValGluLysAlaCysProLysThrValSerCysAlaAspLeuLeuAlaIleAlaAla
 CAAAAATCTGTCGTTTTGgtattctctcttttacaatgctatgcatctatacatctttatt 1920
 GlnLysSerValValLeu
 tttcttttcttttttcatttaaatggttttcatatcatctttattgatttttaatttttagga 1980
 gaaacaagtattttaaacatgcaaatataattgtttacttgaaaatgaaaataaaatagG 2040
 A
 CGGGAGGTCCTTCATGGAAGGTTCCAAGTGAAGAAGAGACAGCTTAAGAGGGTTCATGG 2100
 laGlyGlyProSerTrpLysValProSerGlyArgArgAspSerLeuArgGlyPheMetA
 ATCTCGCTAATGATAACCTTCCAGGTCCATCCTCTACACTTCAAGTACTTAAGGACAAAT 2160
 spLeuAlaAsnAspAsnLeuProGlyProSerSerThrLeuGlnValLeuLysAspLysP
 TCAGAAATGTCGGACTCGACCGTCCTTCTGATCTCGTTGCTCTTTCTGgtacattatagt 2220
 heArgAsnValGlyLeuAspArgProSerAspLeuValAlaLeuSerG
 taaaaacattttcattttcatatataacctatagttgtagtcattaataaactctaaatt 2280
 attattttgcttttggtttattaattcttttgatatttttcttttggttagGTGGTCACACCT 2340
 lyGlyHisThrP
 TTGGCAAAAACCAATGTTCAGTTCATAATGGATCGGCTTTACAACCTTCAGTAACTCCGGTA 2400
 heGlyLysAsnGlnCysGlnPheIleMetAspArgLeuTyrAsnPheSerAsnSerGlyL
 AACCCGACCCAACCCTTGATAAATCGTACCTCAGCACGCTAAGAAAAACAATGCCACGTA 2460
 ysProAspProThrLeuAspLysSerTyrLeuSerThrLeuArgLysGlnCysProArgA
 ATGGAACCTGAGTGTATTGGTAGATTTTGATTTACGTACACCGACAATCTTTGACAACA 2520
 snGlyAsnLeuSerValLeuValAspPheAspLeuArgThrProThrIlePheAspAsnL
 AATACTATGTGAATCTCAAAGAGAAACAAAGGTCTTATCCAGAGTGACCAAGAGTTATTCT 2580
 ysTyrTyrValAsnLeuLysGluAsnLysGlyLeuIleGlnSerAspGlnGluLeuPheS
 CTAGCCCTGATGCTTCTGACACTATCCCTTTGGTCCGAGCATAACGCTGATGGTCAAGGAA 2640
 erSerProAspAlaSerAspThrIleProLeuValArgAlaTyrAlaAspGlyGlnGlyL
 AGTTTTTTGATGCATTTCGTGGAGGCAATGATAAGGATGGGAAATCTTTCACCTTCAACTG 2700
 ysPhePheAspAlaPheValGluAlaMetIleArgMetGlyAsnLeuSerProSerThrG
 GGAAACAAGGAGAAATTAGATTGAATTGTAGAGTGGTGAATTCTAAACCTAAAATCATGG 2760
 lyLysGlnGlyGluIleArgLeuAsnCysArgValValAsnSerLysProLysIleMetA
 ATGTGGTTGATACTAATGACTTTGCCAGCTCCATCtgaagaaatgactttctcctaataa 2820
 spValValAspThrAsnAspPheAlaSerSerIle
taaatgatcaatggttatctttttctttactacttttcttattttcttttaggttatttatat 2880
 atctttatttatatagcacaaactaaaaattattatgaataaaaacaaatccaatacata 2940
 aatttaataactctgttgacagaaaaaaaattactaactcaactaaaaattaaagatcat 3000
 atggttcaaagtcaaaatttaatatcatcatttttcattctcattttatccaactcacca 3060
ataaatccgctacactcaatgtcatcaaggaaaat 3095

gaattcaat^{tt}tcagaaggaatcatttaatttatg^{tttt}gaaataaatattgaatcaaga 60
 atataggcgggatcaccatctct^{ttt}atag^{tatt}taatg^{tcg}attg^{caata}aaatct^{ttt}at 120
 ggtaatatgat^{caatat}^{caa}c^{tt}tagtagcttattatcttagg^{tt}gatt^{ta}attatcac 180
 agcgacaaatacagccaaaaactaaaagt^{tata}aaattatgtgcaataatcttagcattgt 240
 ctaagaaatcgg^tgaatagatttgaaa^{tt}taattgtccttcaaccactctatag^tatgg 300
 ccttagaa^{caata}c^{ct}taatac^{caaaa}g^{aaaa}aatcaacctaacag^tg^{taaa}atact^{tata} 360
 aaagaaaactccagctactct^{tata}tag^{gt}ttccttctacgccttagctagattcacac 420
 catcagccacactctcaactgatcaaatcatag^{ttt}gtcttcttctcaaaaag^{aaaa}ag 480
 aaaaATGGGGTTTTCTCCTCTCATTTCCTGCAGTGCTATGGGAGCCCTAATATTGAGTTG 540
 MetGlyPheSerProLeuIleSerCysSerAlaMetGlyAlaLeuIleLeuSerCy
 CTTCTGCTTCAAGCTTCAAAC^{TCTAAT}GCTCAGTTGAGGCTGACTTCTACTTTAGGAC 600
 sLeuLeuLeuGlnAlaSerAsnSerAsnAlaGlnLeuArgProAspPheTyrPheArgTh
 TTGCCCATCTGTTTTCAATATTATTGGGGATATCATTGTCGATGAACTGAGGACTGATCC 660
 rCysProSerValPheAsnIleIleGlyAspIleIleValAspGluLeuArgThrAspPr
 TCGTATTGCCGCTAGCCTTCTTCGCCTTCACTTTCATGACTGCTTTGTTCGTg^{taagt}gt 720
 oArgIleAlaAlaSerLeuLeuArgLeuHisPheHisAspCysPheValArg
 aaggacttaact^{tttttttt}taactatgacgtgttcattggacgtaactact^{ttt}cac 780
 cattaattccatatagaa^tagaggccaaaaggaatattcgaatcaataaatacaagc 840
 tcatataatgtcatatata^{tata}at^{ttt}gttagGGTGTGATGCATCGATCCTGC 900
 GlyCysAspAlaSerIleLeuL
 TTGACAATTCCACGTCGTTCCGAACCGAAAAAGATGCTGCTCCAAACGCAAATTCAGCTA 960
 euAspAsnSerThrSerPheArgThrGluLysAspAlaAlaProAsnAlaAsnSerAlaA
 GAGGATTTGGTGTATAGATAGAATGAAAACATCCCTTGAGAGAGCTTGCCCAAGAACAG 1020
 rgGlyPheGlyValIleAspArgMetLysThrSerLeuGluArgAlaCysProArgThrV
 TGTCTTGTGCAGATGTTCTCACCATCGCCTCTCAAATATCAGTGCTTTTGG^tatgtacat 1080
 alSerCysAlaAspValLeuThrIleAlaSerGlnIleSerValLeuLeu
 gatttataacggatgatattaatccaat^{atg}ttatggatttgacgtcaatg^{ctt}tataag 1140
 ttatgaaatttgattc^{aaa}atg^{tt}atgaatttgatgtcaattc^{ttt}tata^tatg^{tt}tata 1200
 gTCGGGAGGTCCATGGTGGCCGGTTCCGTTGGGGAGGAGACAGCGTGAAGCTTTCTT 1260
 SerGlyGlyProTrpTrpProValProLeuGlyArgArgAspSerValGluAlaPhePh
 CGATTTGGCTAATACAGCTCTTCCCTCTCCATTTTTCACTCTTGCTCAACTTAAAAAAGC 1320
 eAspLeuAlaAsnThrAlaLeuProSerProPhePheThrLeuAlaGlnLeuLysLysAl
 TTTCCGCTGAGGTTGGCCTAAACCGCCCTCAGATCTAGTCGCTCTTCTG^taaaaatatt 1380
 aPheAlaAspValGlyLeuAsnArgProSerAspLeuValAlaLeuSerG

Fig.2-7. Nucleotide sequence of horseradish peroxidase isozyme gene prxC3. See legend of Fig.2-6.

catgatgttttctaataataagtgTTTTTgatctagctagatctatgcaattcattttatat 1440
aatgatagctaaatggatgcactcctccactaagtctggaatttacatattaatttataa 1500
ggtatagaattacaaatttataaattcaaaattttattattttgaattctattaatgatc 1560
tactattataaattcattttatttttgtaatttcttaggaatgatttgcttttggtttga 1620
aatgcatgaccaagtatataaaataaataaaaaaggataatataattaataataataaat 1680
accatctcaaacaaaatgtcttcaagcacgtgattttgaattaaaaacatgaattagtaaa 1740
acgaaaaaatcatgactTTTTTgttgcaaacTTTTTgtTTTTTTTTTTTaaattttccaa 1800
ctgacaaaccataaaaaacttaaacatgcaatgtatctaaaccttagttattgtcaaaatg 1860
gtagGTGGTCACACATTTGGAAGAGCACAAATGCCAATTTGTGACACCTCGTCTCTACAAC 1920
lyGlyHisThrPheGlyArgAlaGlnCysGlnPheValThrProArgLeuTyrAsn
TTCAACGGTACAAACAGACCAGACCCAACTCTGGACCCAACTTACCTTGTCCAACTCGT 1980
PheAsnGlyThrAsnArgProAspProThrLeuAspProThrTyrLeuValGlnLeuArg
GCATTGTGCCCTCAAAACGGAAACGGCACCGTTCTGGTCAACTTCGATGTCGTGACTCCG 2040
AlaLeuCysProGlnAsnGlyAsnGlyThrValLeuValAsnPheAspValValThrPro
AATACTTTTGATCGTCAATACTACACCAATCTTCGTAATGGGAAAGGTCTGATTCAGAGT 2100
AsnThrPheAspArgGlnTyrTyrThrAsnLeuArgAsnGlyLysGlyLeuIleGlnSer
GACCAAGAGCTCTTCTCGACTCCAGGAGCCGACACGATCCCCTAGTAAACCTATACAGC 2160
AspGlnGluLeuPheSerThrProGlyAlaAspThrIleProLeuValAsnLeuTyrSer
AGCAACACGTTTCGGTCTTTCGGAGCATTTCGTTGATGCAATGATTAGGATGGGAAATCTT 2220
SerAsnThrPheAlaPhePheGlyAlaPheValAspAlaMetIleArgMetGlyAsnLeu
AGACCTTTGACTGGAECTCAAGGCGAGATAAGACAGAATTGTAGGGTTGTGAATTCGCGA 2280
ArgProLeuThrGlyThrGlnGlyGluIleArgGlnAsnCysArgValValAsnSerArg
ATTAGGGGTATGGAGAACGATGATGGAGTTGTGAGTCTATTtgattatgttggaatat 2340
IleArgGlyMetGluAsnAspAspGlyValValSerSerIle
ggttatgtaacaaatcataaatgtgtgggaacatgcatgctgactaaaataaaagctctc 2400
acgagttatgacttgtgagattacaactgaaaaaaccaaaggaaagaaaagatcagattt 2460
tggatccaagtaaggatgaggaagtccttgtagtctccagaaacatcaccgataatag 2520
cgttatccatgcttgaattgtacatggtgaaatactctcctctcaccttcatcaaatcaa 2580
tctctgcacgcgtcacaattgctctcatcaacgaatcttcatctgttccaaaaccctcaa 2640
tcgaatctcttacaacctgccaaataaataaacacaaacttgaggaacacaaacaccttct 2700
ctacttaatctatggcaatttcacaccttgcaa 2733

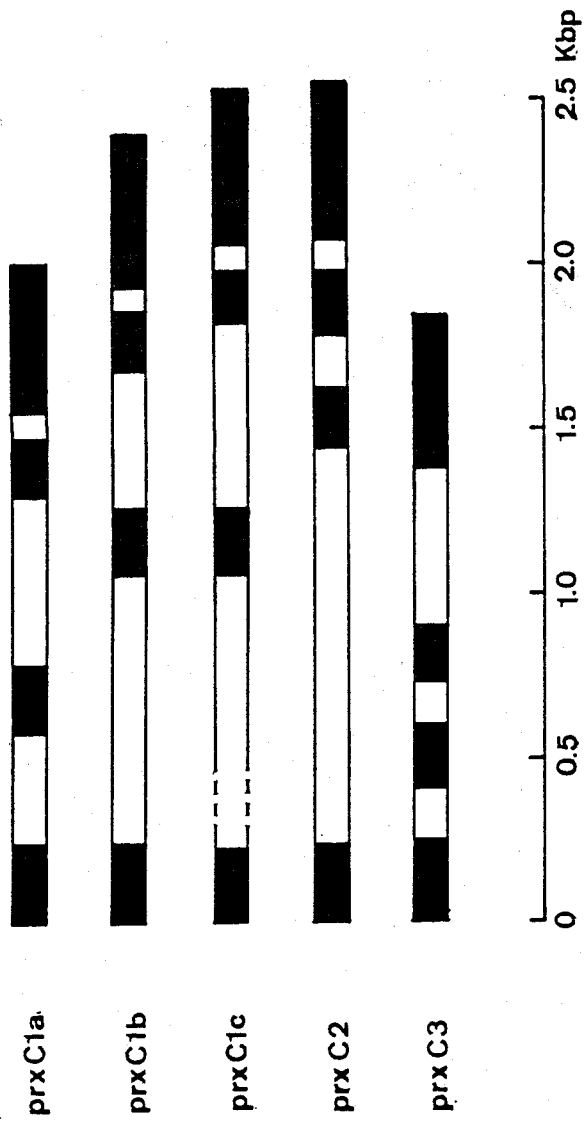
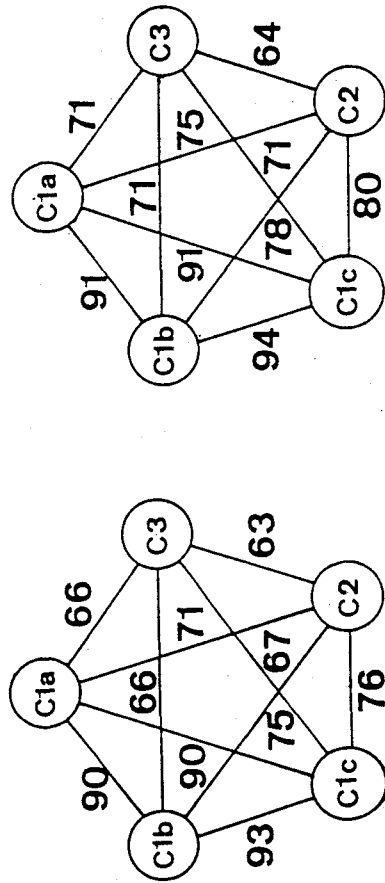


Fig.2-8. The genomic DNA structures of the 5 peroxidase isozymes. Shaded box indicates exons and open box introns.



AMINO ACID

DNA

Fig.2-9. Homology among nucleotide and amino acid sequences of horseradish peroxidase isozymes.

遺伝子はいずれも、真核生物の転写開始のプロモーター配列 TATA box (コンセンサス配列 TATAAA) に相当する配列が翻訳開始コドン ATG より上流 60-210bp の間に複数個存在していた。また、TATA box の上流によく存在している CAAT 配列は prxC1b、C2、及び C3 で存在した。prxC1a は CAAT 配列に類似した配列 CAAA が -101bp、-140bp、及び -185bp の位置に存在した。植物遺伝子における TATA box について Joshi は、CAC TATA A/T ATAG であることが多いとを報告している⁶⁹⁾。4つのペルオキシダーゼ遺伝子の場合、完全に一致しているものは少ないが TATA 配列のすぐ下流数塩基では類似していた。

また真核生物において、翻訳開始コドン ATG の 3bp 上流の位置 (-3) の塩基が翻訳の効率に影響を与え、その塩基が A の場合に高いとされている⁷⁰⁾。このペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子の場合も、すべて A だった。植物遺伝子の翻訳開始コドン付近のコンセンサス配列について、Joshi は酵素遺伝子では AACAC C ATG GC⁶⁹⁾ と、また Letcke らは AACA ATG GC⁷¹⁾ と報告している。いずれの場合も -3 の位置は A である点は同じであるが、ペルオキシダーゼ遺伝子では Letcke らの配列の方に類似していた。しかしコンセンサス配列で翻訳開始コドン ATG に続く塩基は GC で、この GC で始まるコドンはアラニンであるが、prxC2 のみがアラニンで、他はヒスチジン (CAT/C) であった。

③ 3'非翻訳領域

5種の遺伝子の 3'非翻訳領域 (Fig. 2-11) にはポリ A 付加シグナル AATAAA が数個存在した。このうち prxC1a、C1b、C1c については cDNA が得られているのでポリ A が付加されている位置がわかる。その位置を Fig. 2-11 では矢印で示している。この3種の遺伝子の場合、ポリ A の付加した塩基より約 20塩基上流付近に存在している AATAAA 配列、即ち prxC1a では停止コドン TGA より 210bp、222bp、prxC1b では 309bp、prxC1c では 208bp 下流にある AATAAA 配列が実際にシグナルとして働いていると推測した。prxC1b は、93bp よりなる長い順方向の繰り返し配列が存在した。

④ コドン使用頻度

5つのアイソザイム遺伝子のコード領域のコドン使用頻度を Table 2-1 に示した。コドンの3文字目は A 或は T が多かった。植物遺伝子において、コドンの3文字目が双子葉類では、A、T が多く、単子葉類では、G、C が多いという報告がある^{72, 73)}。西洋ワサビは、双子葉類であり、その傾向に沿っていた。

-240
 C1a GGGTTTACTCTATAATACTATAAAAATATAAAAAGTGAAGAAGATGGTAAATTAACAATAATTAG
 C1b TGTACCAACAACCTGCAATTCGTCAAAACCGTGGCCCACTCTACCTACCCCGCTATATAAAGA
 C2 AAACCACTTTGTACAGAAATATAAACAACATTTGTCGTATATCTTCCACATGTAATAAGT
 C3 GAAATCGGTGAATAGATTTGAAAAATTTAAATTTGTCTTCAACCCACTCTATAGTATGCGCCTT

-180
 TCCACATTTTATATATAGTGAATGTTTTATATATGATTTCAAAAAAATAGATTTCTACTAAT
 GTAGTTAGTTGACAAGAAGAAAAAGCCCTTCAITTTGCTGTTGAGAGAAAGCCCTTCAATTTG
 CAGGTATTTGGATAAGAGATATAATTTATACACCCACTTGAGTACAAATATCTCAATTAATTC
 AGAACAATACCTAATAACCAAAAAAGAAAAAATCAACCTAACAGTGTMAAATACTATAAAG

-120
 TAGTAATGATTAACCCCAAAAAAGAAAAAGCCCTCAAGTTAGACTCGTTTTGCCATAAATA
 AGAAATCAAAGCCTCCAGGTTTGACCCGTAATGCTTATAAAAAGGATTTATATAAGATAATG
 CAAAAGTAAAGCCCGGAGCTAGATCCTTTTGGCTTATAAAAAGGATTTGTTAAGACG
 AAATACTCCAGCTACTATAAATGCTGTTCCCTTCTACCGCCTTAGCTAGATTCACACCATC

-60
 GGATTTTAAAGATATGCACTTCCATCATCTTCTCAGTAATATAGTTTTCCCCCTTTAAAA
 GACCTTACTCCTATTTCTCGGTTAAAACACAAATTAATTAGTTTTCTTTTATCTTTAAAAAT
 AAACTTATTCACCTCAAACCTTCAAACCTAACCAAGAATTTTATCTTAGAGAGCAAAGAAA
 AGCCACACTCTCAAACCTGATCAATCATAGTTTGTCTTCTTCCAAAAAAGAAAAAGAAA

ATG
ATG
ATG
ATG

Fig.2-10. The 5'-noncoding regions of peroxidase isozymes genes. TATA and CAAT boxes are enclosed with boxes. Base A at -3, previously suggested to modulate translation (70), is marked with an asterisk.

60

C1a TGAGCATAGTCGACGCCATATGTGGCTACCATAATATATATTTAAAATAATAAAACGCTCT

C1b TGAGAAAAGTTGAGTCAATATCTGGCTACCAGAGTACACGTTAAGATAAATAAAAGCGCTC

C1c TGAGAAAAGTTGACTCAATATCTGGCTACCAGAGTATACGTTAAGATAAATAAAAGCGCTC

C2 TGAAGAAATGACTTTCTCCTAATAATAAATGATCAATGTTATCTTTTTCTTTACTACTTT

C3 TGATTATGTTGGGAATATGGTTATGTAACAAATCATAAAATGTGTGGGAACATGCATGC

120

C1a TAAGATGTTACTTGGAGCATGAGAAGATCTCTATCGGTTGTGGAGTATCTGAGTAGCTCTT

C1b TCAAGATGTTACTTGGAGAAGGAGAAGATATTTATTGGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGT

C1c TCAAGATGTTACTTGGAGAAGGAGAATATCTTTATTGGTGTGTAGTGTAGGGTATCTAA

C2 CTTATTTCTTTTAGGTTATTTATATATCTTATTATATATAGCAACTACTAAAAATTATT

C3 GACTAAATAAAAGCTCTCACGAGTTATGACTTGTGAGATTACAACGAAAAACCAAAGG

180

C1a ATGTATTTCTGTTTGATTTTGGCTTTTGAAGACGTTTCCGACCTTCCGGTAATCGGTTTA

C1b TCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCTTTGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTT

C1c GTTGTTCTCTGTTTTTATGTTTGTGTTGGCCTTTGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAA

C2 ATGAATAAAACAAATCCAATACATAAAATTTAAATAACTCTGTTGACAGAAAAAAATTAC

C3 AAAGAAAAGATCAGATTTTGGATCCAAGTAAGGTGATGAGGAAGTCTTGTAGTCTCCAG

240

C1a AGCTTGTATGGATTTGGACGTTCTATACTAATAAAATGACAATAAAAGAGATGTATTTG

C1b ATGGGTTTGTGTGTAGAGAGTATCTAAGTTGTTCTCTGTTTTTATGTTTGAGTTGGCCTT

C1c CTTGTATGGGTTTGGACGTTCTATCCTAATAAAGATGATAAAAATAAAATAAA

C2 TAACTCAACTAAAATTAAGATCATATGGTTCAAAGTCAAATTTAATATCATCATTTTTT

C3 AAACATCACCGATAATAGCGTTATCCATGCTTGAATTGTACATGTTGAAATACTCTCCTC

300

C1a ACAAATAAGCAGATATATATATACGCAAAATTACAGCAAAAAAATAAATTTAACGATAAAT

C1b TGAATGCGTTTCGTGAATCGGTCTAAACTTTTATGGGTTTGGACGTTCTATCCTGAATAA

C2 ATTCTCATTTTTATCCAACCTACCAAATAAATCCGCTACACTCAATGTCATCAAGGAAAAT

C3 TCACCTTCATCAAATCAATCTCTGCACGCGTCACAATTGCTCTCATCAACGAATCTTCAT

360

C1a TCTGTAGATAAAACATACTCTGCTATGAGATTATTAATTCATTATC

C1b GATGACACAATAAAAAGATGTTACTTGGAGAAAATGTTATTTTACATTTCTCTTTTCTAG

C3 CTGTTCCAAAACCCTCAATCGAATCTCTTACAACCTGCCAAATAATAAACACAAACTTGA

Fig.2-11. The 3'-noncoding regions of peroxidase isozyme genes. Box denotes polyadenylation signals. Horizontal arrow shows the directed repeats of prxClb. The poly(A) addition sites are marked with vertical arrow.

Table 2-1. Codon usage for horseradish peroxidase genes.

	C1a	C1b	C1c	C2	C3		C1a	C1b	C1c	C2	C3
TTT Phe	13	12	11	12	9	TAT Tyr	2	2	2	1	0
TTC	10	10	9	8	14	TAC	3	4	4	5	6
TTA Leu	5	4	4	3	0	TAA Ter	-	-	-	-	-
TTG	11	9	7	9	7	TAG	-	-	-	-	-
CTT Leu	12	14	12	15	15	CAT His	3	2	2	2	1
GTC	8	6	7	6	5	CAC	3	3	3	3	2
CTA	5	5	2	3	5	CAA Gln	11	12	13	9	10
CTG	2	1	1	2	6	CAG	2	3	1	2	3
ATT Ile	8	6	4	4	9	AAT Asn	15	14	14	11	11
ATC	7	9	9	8	4	AAC	12	11	15	9	12
ATA	1	2	2	4	4	AAA Lys	6	7	5	18	5
ATG Met	7	5	5	7	6	AAG	0	2	2	4	0
GTT Val	7	10	10	6	9	GAT Asp	13	11	9	16	14
GTC	4	2	3	4	7	GAC	11	13	13	14	9
GTA	2	2	1	5	1	GAA Glu	1	1	2	1	3
GTG	9	9	10	6	6	GAG	7	8	7	5	4
TCT Ser	13	9	8	9	8	TGT Cys	7	6	5	6	3
TCC	2	4	3	5	3	TGC	3	3	3	2	7
TCA	6	5	5	9	4	TGA Ter	1	1	1	1	1
TCG	2	4	3	2	5	TGG Trp	1	2	1	1	2
CCT Pro	8	10	9	9	6	CGT Arg	5	5	5	4	6
CCC	3	4	4	1	2	CGC	0	0	0	1	2
CCA	7	5	5	6	10	CGA	1	2	5	2	2
CCG	0	0	0	1	3	CGG	2	0	1	1	0
ACT Thr	10	8	6	6	10	AGT Ser	1	3	2	5	4
ACC	6	6	5	4	4	AGC	9	4	6	6	4
ACA	10	12	11	6	6	AGA Arg	10	7	6	9	9
ACG	2	2	1	2	3	AGG	3	6	5	2	7
GCT Ala	7	8	9	10	15	GGT Gly	5	5	7	7	8
GCC	3	3	5	3	4	GGC	3	2	2	2	3
GCA	9	9	9	8	7	GGA	8	11	8	9	10
GCG	6	6	4	4	1	GGG	1	0	0	3	4

Data for prxC1a, prxC1b, prxC2, and prxC3 include overall coding region, but lacked upstream of Met⁻⁹ for prxC1c.

⑤イントロンの構造

酵母から動植物に至るまでイントロンは、GT で始まり、AT で終わる一般的な構造を持つ。5種のペルオキシダーゼ遺伝子のイントロンもその例外ではなかった (Fig. 2-12)。イントロンのスプライシング機構に関する研究が進められており、特にイントロンの5'側の配列がU1 SnRNAと塩基対を形成して切り出されることなどが明らかになってきた。植物遺伝子のイントロン構造を理解するためにいくつかのコンセンサス構造^{74, 75)}が示されている (Fig. 2-12)。3'側よりも5'側の方が、よりコンセンサス配列の傾向に沿っていた。また、植物のU1 SnRNAの配列ではマメ類のものが報告されている。インゲンマメのU1 SnRNA⁷⁶⁾の5'側の8塩基対を、イントロンの5'側と比較する (Fig. 2-12) と、4~7塩基が塩基対を形成し得た。

6. 5種のペルオキシダーゼアイソザイムの一次構造

①アミノ酸配列

5種の遺伝子から推測されるアミノ酸配列を Fig. 2-13 に示した。アイソザイムC1aがWelinderの報告したアイソザイムCに一致するが²⁸⁾、N末端及びC末端にそれぞれ30残基、15残基のエキストラペプチド (以下、N-及びC-エキストラペプチドと呼ぶ) が存在していた。アイソザイムC1b、C1c、C2、及びC3をC1aと比較して、いずれのタンパク質もC1aと同様に、N末端及びC末端でプロセシングが起これると仮定して成熟型酵素を考えた。翻訳産物では成熟型酵素のN末端に相当するグルタミン残基より、上流には24-30残基、C末端のセリン残基より下流には13-15残基からなるエキストラペプチドが存在し、翻訳後にプロセシングが起これば成熟型ペルオキシダーゼと成ることが示唆された。

推定される成熟型酵素は、C1a、C1b、C1c、C2で308アミノ酸残基、C3では307残基から成る。構造上或は活性上重要ないくつかのアミノ酸残基が保存されていた。即ち、ジスルフィド (S-S) 結合を形成する8つのシステイン残基 (Cys 11、43、48、91、97、177、209、301)、ヘムに配位すると言われている His170、ヘム及び過酸化水素と関係している His42、Arg38、芳香族性の基質を安定化する Arg183、Tyr185⁷⁷⁾が完全に保存されていた。さらに、遠位ヒスチジン His170、近位ヒスチジン His170 周辺のアミノ酸配列はよく保存されていた。また、アイソザイムCで明らかになった糖鎖が付加しているアスパラギン残基については、一般的に言われている N-glycosylation signal (Asn-Xaa-Ser/Thr) に従っていた²⁸⁾。他のアイソザイムではこの N-glycosylation signalの位置がアイソザイムCとは異なっているところもあり、完全に保存されていなかった。

これら5種のアイソザイム間のアミノ酸配列レベルでの相同性は、Fig. 2-9に

示すように C1a、C1b、C1c 間では 90% 以上で、特に C1b、C1c は 94% であるが、C2 は C1a、C1b、C1c と 71-80% で比較的 C1c に近いが、C3 はこの3つとは相同性が低く 71% しかなかった。また C2 と C3 は最も低く 64% しかなかった。この相同性は塩基配列レベルとあまり大きな差はなかった。

② N末端及びC末端エキストラペプチド

N末端側については (Fig. 2-14)、アイソザイムC で報告されているN末端アミノ酸残基がピログルタミン酸で²⁸⁾、それに相当するのはグルタミンであることが明らかになった。そのグルタミンのN末側の残基がアラニンであり、このアラニン-グルタミンの配列は全ての場合で保存されており prxC1a 以外のアイソザイムも C1a と同様にプロセッシングを受けるものと考えられる。N-エキストラペプチドの構造は、疎水性アミノ酸を多く含み、アイソザイムC1a、C1b、C2 では塩基性アミノ酸としてヒスチジンを有していた。この疎水性アミノ酸に富み、塩基性アミノ酸も存在するという構造は、細胞内局在に参与するシグナルペプチドに特徴的であり、このN-エキストラペプチドがシグナルペプチド様の働きをしていると考えられた。しかし、アイソザイムC3 はそのエキストラペプチドの中には全く塩基性アミノ酸を持たず、他の場合とは異なる機能を有している可能性がある。ところでこのエキストラペプチドはアミノ酸構造に -OH 基を持つセリン及びスレオニン残基が多いが、このことは細胞内局在性になんらかの意味を持つのかも知れない。

C末端側については (Fig. 2-13)、C1a、C1b、C1c はその配列が非常に保存されており C1a と同様にプロセッシングを受けると考えられるが、C2、C3 についてはほとんど類似性がない。N-エキストラペプチドと同様に疎水性アミノ酸と、塩基性アミノ酸、特に C1a、C1b、C1c ではヒスチジン、C2 ではリジン、C3 ではアルギニン、が存在していた。

③ アミノ酸組成

ペルオキシダーゼアイソザイムの推測される成熟型に相当する部分のアミノ酸組成を Table 2-2 に示した。C1a、C1b、C1c 間ではよく似ているが、C2 ではリジン残基が 20 個で (C1a は 6 個)、アスパラギン酸残基が 28 個 (C1a は 21 個) と大きく異なっており、全体として塩基性アミノ酸残基の方が多い。このことから C2 は塩基性アイソザイムである可能性がある。

④ 植物由来ペルオキシダーゼとの比較

最近、タバコ⁷⁸⁾、ジャガイモ⁷⁹⁾より酸性ペルオキシダーゼがクローニングさ

れその塩基配列及びアミノ酸配列が報告されている。アミノ酸配列のみが明らかにされているカブペルオキシダーゼも加え、最も高い相同性が得られるようにギャップを入れて西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイムC (C1a) と比較した (Fig. 2-15)。

近位ヒスチジン His170 及び遠位ヒスチジン His42 の周辺配列のみだけでなく、他の領域、特に Val195-Ala105、Ala280-Arg298 がよく保存されていた。しかし、Leu192-Ala217 の間の配列は大きく異なっていた。またジスルフィド結合を形成する8つのシステイン残基がほぼ同様の位置に保存されていた。アミノ酸配列の全体的な相同性は 36-50% であった。また、308アミノ酸残基の内 73残基が4つのペルオキシダーゼの間で同じであった。

⑤他の生物由来のペルオキシダーゼとの比較

原核生物^{6,83)}、酵母⁸⁰⁾、カビ^{81,82)}についても種々のペルオキシダーゼがクローニングされ、そのアミノ酸配列が導かれている。その中でヘム分子を補欠分子族とするペルオキシダーゼについて、ヘムに配位すると考えられるヒスチジン残基周辺の配列を比較した (Fig. 2-16)。大腸菌⁷⁾及び *Bacillus stearothermophilus*⁸⁾ 由来のペルオキシダーゼは、ヘムを有することが明らかにされているが、ヒスチジンが関与しているかどうかは酵素化学的に明らかではない。そこで比較的良好な領域を探して比較した。Fig. 2-16 は西洋ワサビペルオキシダーゼC1a の His42 及び His170 を基準にして並べた。配列の比較では、Dayhoff らが示しているように、(Ala, Gly), (Leu, Ile, Val, Met), (Phe, Tyr, Trp), (Asp, Asn, Glu, Gln), (Ser, Thr) を同じグループとした⁸⁴⁾。全体的に植物 (西洋ワサビ、カブ、タバコ、ジャガイモ) 間では非常によく保存されていた。遠位ヒスチジン His42 付近では、基質である H₂O₂ と関係する Arg38 が全てのペルオキシダーゼで保存されていた。また、植物間で保存されている Phe41 がカビのリグニンペルオキシダーゼではフェニルアラニンであったが、原核生物及び酵母由来のものではトリプトファンであった。近位ヒスチジン His170 付近では、植物・微生物ともによく保存されていた。特に微生物由来のペルオキシダーゼについては、遠位ヒスチジン付近では局所的にしか類似性がなかったが、近位ヒスチジン付近では広範囲にわたり類似性が認められた。しかし西洋ワサビペルオキシダーゼと全体においてはほとんど類似性がなかった。

第4節 考察

植物酵素は多様なアイソザイムを示し、さらにファゼオリン⁸⁵⁾などの貯蔵タ

	5' - JUNCTION	3' - JUNCTION
Consensus 1	AG GTAAGT	TTGCAG
	T A	A AT
2	AG GTA	
Intron 1 PRX C1a	AT GTAAATTA	TGAAAG GG
C1b	AT GTAAGATA	TGAAAG GG
C2	AT GTAAGATA	AAACAG GG
C3	GT GTAAGTGT	TTGTAG GC
Intron 2 PRX C1a	TG GTATGCTC	TTATAG GC
C1b	TG GTATGCTC	TTATAG GC
C2	TG GTATTCTT	AAATAG GC
C3	TG GTATGTAC	TTATAG TC
Intron 3 PRX C1a	CG GTAATTAA	TGTTAG GG
C1b	CG GTAGTTAA	TGTTAG GT
C2	TG GTACATTA	GGTTAG GT
C3	TG GTAAAAATA	TGGTAG GT
U1 snRNA	--TC CATTGATA	

Fig.2-12. Structure of introns of peroxidase isozyme genes. Consensus sequences, 1 and 2, and nucleotide sequence of U1snRNA are shown in refs. 74, 75 and 76.

```

-30                                     1                                     30
C1a MHFSSSSTLFTCITLIPLVCLILHASLSDAQLTPTFYDNSCPNVSNIVRDTIVNELRSDP
C1b  SP - S W - T G AFY                                     T I I
C1c  -----M F N                                         I I
C2   S -----LIKLGFL L NV H S S KT Q FD AT KTA
C3   G PLISCSAMGA - S L Q N N S D FRT S F IG I D T

      * * * * *
      60                                     90
RIAASILRLHFHDCFNGCDASILLDNTSFRTEKDAFGNANSARGFPVIDRMKAAVESA
T L L TV I R
S V I R
R D T K
L R S AP G TSL R

      120                                     150
CPRTVSCADLLTIAAQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAFLDLANANLPAPFFTLPLQK
V N
V N R S E A
K A K V K S RGM D G SS QV
V S I L S W P VE F TL S A K

      * * * * *
      180 * * * * *
SFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPTLNTTYLQTLRGLCP
A AK D P QQ
A A P QQ
K D P Q S K DKS S K
A AD P RA Q VTP NG_NR DP VQ A

      240                                     270
LNGNLSALVDFDLRTPTIFDNKYYVNLEEQKGLIQSDQELFSSPNATDTIPLVRSFANST
Q V V K DG
R Q V V K Y DG
R V K N D S AY DG
Q GTV N VV NT RQ T RNG T G - NLYSSN

      300 * * * * * 308 * * * * * 323
QTFNAFVEAMDRMGNITPLTGTQGGQIRLNCRVVNSNSLLHDMVEVDFVSSM
K N E I
N E I
GK D I LS S K E KPKIM V DTN A I
FA G D I LR E Q RIRGMENDDG -- I

```

Fig.2-13. Amino acid sequences of 5 horseradish peroxidase isozymes deduced from DNA sequence. Only the amino acid residues that vary from that of isozyme C1a are shown in the other isozymes. Putative N- and C-termini are boxed, and vertical line denotes the positions that correspond to intron placement in the coding region. Asterisk denotes distal HIS170, proximal HIS42, and other hypothetical functional residues (see text). Cys residues are marked with closed circle. Putative N-glycosylation site, Asn- Xaa- Ser/Thr, are underlined. Dash line indicates gaps along the sequence.

	-20
C1a	MetHisPheSerSerSerSerThrLeuPheThrCysIleThrLeu
C1b	Pro --- SerTrp ---
C2	Ser -----LeuIleLys
C3	Gly ProLeuIleSerCysSerAlaMetGlyAla
	-10
C1a	IleProLeuValCysLeuIleLeuHisAlaSerLeuSerAspAla
C1b	Thr Gly AlaPheTyr
C2	LeuGlyPheLeuLeu Leu AsnVal His
C3	--- Ser Leu Gln Asn Asn
	-1

Fig.2-14 N-terminal extra-amino acid sequences of 5 peroxidase isozymes. The C-terminus of the extrapeptide is numbered -1. Gaps along the sequence, which are included for better alignment, are indicated by dash line.

Table 2-2. Amino acid composition of 5 HRP isozymes in mature forms deduced from the nucleotide sequences.

	C1a	C1b	C1c	C2	C3	C1a	C1b	C1c	C2	C3
Lys	6	9	7	20	5	13	14	14	13	14
His	3	3	3	3	3	17	18	18	17	20
Arg	21	20	22	19	25	25	21	23	28	20
Asp	21	21	20	27	21	25	25	23	17	23
Asn	27	25	28	18	20	8	8	8	8	8
Glu	7	8	8	6	6	4	3	3	5	3
Gln	13	15	14	11	12	20	19	18	18	22
Gly	17	17	17	20	21	5	5	6	6	6
Ala	23	23	25	23	23	1	1	1	1	2
Val	17	19	20	18	21	Total	308	308	308	307
Leu	35	34	30	30	32					

	Distal Histidine *	Proximal Histidine *
Horseradish C1a	31 RIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLD	155 VGLNRSDDLVALSGGHTFGRNQCRR
C1b	31 RI ¹ ASILRLHFHDCFVNGCDASILLD	155 VGLDRPSDDLVALAGGHTFGRNQCRR
C1c	31 SIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLD	155 VGLNRPDDLVALSGGHTFGRNQCRR
C2	31 RIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLD	155 VGLDRPSDDLVALSGGHTFGRNQCRR
C3	31 RIAASLLRLHFHDCFVNGCDASILLD	155 VGLNRPDDLVALSGGHTFGRNQCRR
Turnip P1	IGASLIRLHFHDCFVNGCDGSILLD	VGLN-TTDVVVLSGAHTFGR
P2	IGASLIRLHFHDCFVNGCDGSILLD	VGLN-TTDVVVLSGAHTFGR
P3	IGASLIRLHFHDCFVNGCDASILLD	VGLN-TNDLVALSGAHTFGR
P7	31 RMGASILRI ¹ FHDCFVNGCDGSILLD	VGLS-TRDMVALSGAHT ¹ GC ¹ SR ¹ CV
Tobacco	31 RAGAK ¹ LIRLHFHDCFVNGCDGSILLD	153 RGM ¹ -L ¹ TDLVALSGAHTFGRAR ¹ Q
Potato	86 RMGASLIRLHFHDCFVNGCDGSILLD	211 DKNFTLR ¹ EMVAI ¹ GAHT ¹ GFAR ¹ CS
Fungus Lig1	36 AEAHESIRL ¹ V ¹ FHDSIAISPAMEAQQK	161 AGEFDEI ¹ ELV ¹ MLSAHSVA ¹ AVNDV
Lig2	36 AEAHEALRMV ¹ FHDSIAISPALOSQK	162 AGGFDEI ¹ ETV ¹ WLLSAHSIA ¹ AAANDV
Lig3	36 AEAHESIRL ¹ V ¹ FHDAIAISPAMEPOAS	160 AGEFDEI ¹ ELV ¹ MLSAHSVA ¹ AAANDI
Yeast Cyt C	41 GYCPVLV ¹ RI ¹ A ¹ HTSGTWKHDNTGGS	160 ORL ¹ MDREVV ¹ AI ¹ MG ¹ A ¹ IL ¹ GRI ¹ HL ¹ K
E.coli	96 SYAGL ¹ FT ¹ RAM ¹ WHGAGTYRSIDGRGGA	255 MGMNDEET ¹ VAL ¹ IAGGHT ¹ L ¹ GK ¹ THGA
B.stearo.	90 HYG ¹ PL ¹ F ¹ IR ¹ MA ¹ WHSAGTYRIGDGRGGA	247 MGMNDEET ¹ VAL ¹ IAGGHT ¹ FGR ¹ AHRG

Fig.2-16. Conservative amino acid sequence around the proximal and distal histidine of plant and microbial peroxidases. Fungal lignin peroxidase 1(78), 2 and 3(79), yeast cytochrome c peroxidase(80), and hydrogen peroxidases of *Escherichia coli*(6) and *Bacillus stearothermophilus*(83) are included. Box denotes conserved amino acid substitution as described in Fig.2-15.

ンパク質は非常に類似した多種のタンパク質から成り立っている。そしてこれらの多様性は多くは遺伝子レベルより生じ、多重遺伝子族と呼ばれる。西洋ワサビにおけるペルオキシダーゼも30種類ものアイソザイムが存在することがザイモグラムにより示されていたが、cDNA及びゲノム遺伝子のクローニングより多重遺伝子族として存在することが明らかになった。第1章で述べた3種のcDNAに相当するゲノム遺伝子(うち prxC1c は完全ではなかった)を取得し、さらに2種の別のアイソザイム遺伝子(prxC2、prxC3)を取得した。合計で5種のペルオキシダーゼ遺伝子が西洋ワサビに存在することが明らかになった。このうち prxC2、C3 については、prxC1a、C1b、C1c と相同性の低い各々の3'非翻訳領域をプローブとして、培養細胞より抽出した poly(A)⁺RNA 中に prxC2、C3 に由来すると思われる mRNA をノザンハイブリダイゼーション法により検出した(データ未掲載)。よって prxC2、C3 は偽遺伝子ではなく、培養細胞で発現しているものと思われる。cDNA クローニングではこの prxC2、C3 のクローンが得られなかったが、選抜に用いたプローブ(35mer)との相同性を、得られたゲノム遺伝子と比較してみると83%(29/35)、80%(28/35)と低かったために見出されなかったものと考えられる。またゲノム遺伝子のクローニングにおいては、スクリーニングに用いたブランクハイブリダイゼーションの条件が比較的厳しく(ハイブリダイゼーション温度が60°C)、またプローブには prxC1a のcDNAのみを用いたので他のアイソザイム遺伝子を見出せなかった可能性もある。事実 prxC3 と prxC1a の塩基配列レベル(エキソン部)での相同性は63%で、ブランクハイブリダイゼーションのシグナルが最も弱かった。それ故に、今回得られた5個の遺伝子全てで、ペルオキシダーゼの30種類もある多様性を説明できるかどうかは将来の問題であるが、少なくとも5個の遺伝子から生じたものであると考えられる。ペチュニアには3種のペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子(prxA、B、C)が同定され²⁷⁾、またカブでは4種のアイソザイムのアミノ酸配列が報告されている²⁸⁾ことからカブには少なくとも4種の遺伝子があることが示唆されていた。

cDNA 遺伝子とゲノム遺伝子の塩基配列の比較より、HRP 遺伝子は5種とも3つのイントロンを含む4つのエキソンより構成されていることが明らかになった。さらに、各イントロンはその長さは異なるものが、5種のアイソザイムの対応するアミノ酸配列の位置にすべて存在していた。Goらはヘモグロビンなどを例にとりエキソンにコードされるペプチドはドメインのようなタンパク質構造上の1つの単位であり、そのドメイン間にイントロンが存在することを提唱した⁸⁶⁾。HRPのアイソザイムの一次構造においてもすべて同じ位置にイントロンが存在することから4つのエキソンがそれぞれドメイン構造を成しているのかも知れない。結晶構造の解析が待たれる。ところで最近トマトより2つのペルオキシダー

ゼ遺伝子TAP1、TAP2 が単離された⁸⁷⁾。HRPの prxC1a と prxC1b と同様に、TAP1、TAP2 は Fig. 2-17 に示したようにタンデムに並んで存在した。これまでいくつかのアイソザイム遺伝子がクローニングされているが、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 ADH I, ADH II の場合⁸⁸⁾ はそれぞれ第1染色体、第4染色体にコードされ、またオオムギの α -アミラーゼ1及び2の場合⁸⁹⁾ はそれぞれ第6染色体、第1染色体、というように別々の染色体にコードされていることが多い。トマトのペルオキシダーゼ遺伝子 TAP1、TAP2 にはイントロンが2つしかなく、HRPのイントロン3に相当するものが欠けていた(Fig. 2-17)。2つのイントロンはアミノ酸配列上でHRPとほぼ同じ位置にあった。Gilbertらにより提唱されている"exon shuffling"説⁹⁰⁾。それによればイントロンは、shuffling の過程で遺伝子間を隔てていた非転写領域のスペーサーや一部タンパク質をコードしていた領域の痕跡で、太古の時代は比較的長かったのが、なんらかの圧力のもとでゲノムの縮小が起こり、スペーサーやイントロンといった不要な領域が除去されたというものである。このような例は、藍藻、双子葉、単子葉のリブソス二リン酸カルボキシラーゼ(Rubisco) 小サブユニット間で認められた⁹¹⁾。HRPの prxC3 以外のゲノム遺伝子のイントロン3は、イントロン1と2と比べると非常に短い。以上のことを考え合わせると、トマトの TAP1、TAP2 ではHRPのイントロン3に相当するものが脱落し、エキソン3とエキソン4が結合したと考えることもできる。

5種のアイソザイム遺伝子の塩基配列より推測されるHRPタンパク質 C1a、C1b、C1c、C2、C3 はそれぞれ 353、351、332、347、348 アミノ酸残基であった。Welinder の報告したアミノ酸配列に一致する C1a には、cDNAクローニングでは明らかにならなかったN末端エクストラペプチドが 30 アミノ酸残基よりなり、C末端側の15残基のエクストラペプチドとともにプロセッシングされて成熟型タンパク質となることが明らかになった。C1b、C1c は C1a と非常によく類似した構造を持ち同様にエクストラペプチドを有し、同様にプロセッシングされると推測できる。C2、C3 はN末端エクストラペプチドの長さがやや異なっていたが、同様にプロセッシングされると考えた。C末端側はかなり異なるのでプロセッシングを受けるのか、さらには同じ位置で起こるのかということが問題として残る。N末端エクストラペプチドはその長さが 24-30残基までと異なり、そして構成するアミノ酸組成(疎水性、或は塩基性アミノ酸)もアイソザイム間での差が認められたことから、酵素の局在性に特異性を与えているものと考えられる。分泌性タンパク質あるいは酵素タンパク質の局在化について酵母或は動物では非常によく研究されている。その多くはシグナルペプチドが関与している。植物の場合には、シグナルペプチドについての研究があまり進んでいない。しかし、このシグナル

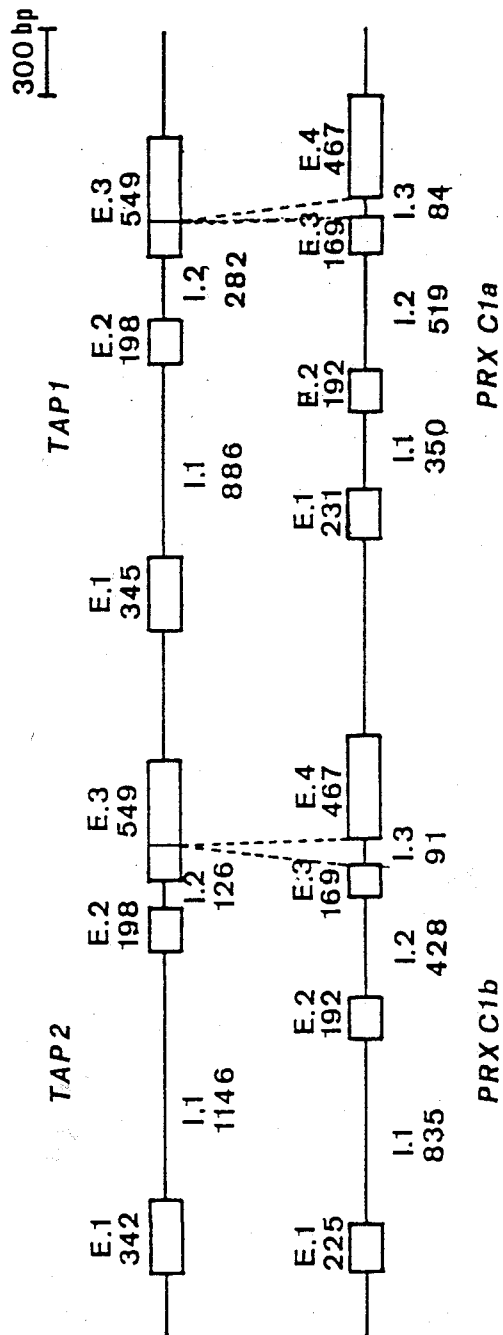


Fig. 2-17. Comparison of gene structures of tomato peroxidases (TAP1 and TAP2) and of horseradish peroxidases (PRXC1a and PRXC1b).
Abbreviations: I, Intron; E, Exon. Numbers stand for the lengths of regions.

ペプチド以外にトランジットペプチドと呼ばれる葉緑体の二重の包膜を通過するために必要なペプチドが存在し、Rubiscoの小サブユニットのものがよく研究されている。Rubisco小サブユニットのトランジットペプチドについては多くの植物でその遺伝子が単離されて構造が明らかにされ、その構造が比較的保存されていた⁹²⁾。そして、エンドウマメのトランジットペプチドではIle-Thr-Serの配列が葉緑体に局在化し、プロセッシングを受けるのに必須であった⁹³⁾。ペルオキシダーゼのN末端エキストラペプチドにはこのような配列は存在しなかったが、多くのシグナルペプチドやトランジットペプチドに見られるように、セリンあるいはスレオニンといった-OH基を持つアミノ酸の含量が高い。植物の場合には、真核生物のシグナルペプチドの特徴と言われている疎水性アミノ酸・塩基性アミノ酸だけでなく、セリンやスレオニン残基も局在性に寄与しているのかも知れない。ペルオキシダーゼの酸性アイソザイムが細胞壁に局在化しリグニン合成などに関与しているといわれている。西洋ワサビ細胞培養液中にペルオキシダーゼ活性が認められた⁹⁴⁾。Schlossらはタバコの培養細胞では、酸性ペルオキシダーゼと一部の塩基性ペルオキシダーゼが細胞壁、特にペクチン層に存在し、その一部が培地に遊離してくると報告している⁹⁵⁾。クローン化されたタバコ酸性ペルオキシダーゼのアミノ酸配列⁷⁸⁾は西洋ワサビの中性アイソザイムCと類似していた。さらにN末端側には22アミノ酸残基のエキストラペプチドが存在した。この酸性ペルオキシダーゼは、傷害にตอบสนองして誘導されることからリグニン合成に関与していると考えられており、N末側のエキストラペプチドが細胞壁への移動のような局在性に関与しているようである。現在のところ西洋ワサビペルオキシダーゼに関しては何ら知見は得られていないが、タバコの例から考えて、エキストラペプチドがシグナルペプチド様の働きをし、局在性に特異性を与えているものと推察している。

C末端にエキストラペプチドが存在するという報告は現在までに β -エンドグルカナーゼ(タバコ)⁹⁶⁾、ペクチンエステラーゼ(トマト)⁹⁷⁾、タウマチン(*Thaumtococcus danielli*)⁹⁸⁾、コンカナバリンA(タチナタマメ)⁹⁹⁾、アグルチニン(コムギ)¹⁰⁰⁾などがある。タバコの β -エンドグルカナーゼ、トマトのペクチンエステラーゼやポリガラクトクロナーゼ¹⁰¹⁾はN末端にもエキストラペプチド(リーダーペプチド)を持ち、また細胞壁にも存在するタンパク質で、西洋ワサビペルオキシダーゼがこれらに似た構造であることは興味深い。Bulckeらは、傷害応答性の β -グルカナーゼは液胞に存在し、C末端のエキストラペプチドは既にプロセッシングされていることを報告しており、このエキストラペプチドが液胞への局在性に関与していることを示唆した¹⁰²⁾。また、動物細胞においてはペルオキシソームタンパク質¹⁰³⁾やluminal ERタンパク質¹⁰⁴⁾の局在性

を各々のタンパク質のC末端側のペプチドが決定することが示された。このような例から西洋ワサビペルオキシダーゼのC末端エキストラペプチドも細胞内部の局在性に関与していると考えられ、N末端エキストラペプチドとも併せてその働きが注目される。

クローニングによって得られた5種のアイソザイムのアミノ酸配列を比較した。西洋ワサビペルオキシダーゼは、ヘムタンパク質として酵素化学的によく研究されている。その中から明らかにされてきたヘムと関係のある His42、His170、ジスルフィド結合を形成する8つのシステイン残基、基質などとの関係のある Arg38、Arg183、Tyr185 などは5つのアイソザイムですべて保存されていた。しかし、糖鎖の付加し得るアスパラギン残基の数や位置には差があった。酸性アイソザイム（アイソザイムA）と中性アイソザイム（アイソザイムC）は、等電点が異なるだけでなく、基質特異性及びヘム鉄に関わる特徴が異った。これらの違いが一次構造の違いによることは明らかである。5種のアイソザイムの一次構造からこのような違いを推測できないが、例えば種々のアイソザイムを大腸菌で発現させることによる解析は有効な手段となるであろう。5種のアイソザイム間では、Leu26-Phe77、Ala90-Gln106、Ser161-Gly173、Lys241-Pro254、Ile297-Ser306の領域が比較的良好に保存されており、さきに挙げた機能的に重要なアミノ酸残基の多くが存在していた。次にクローン化された他の植物由来のペルオキシダーゼと比べた。西洋ワサビペルオキシダーゼC (C1a) を基準にして、遠位ヒスチジン (Arg31-Thr58) と近位ヒスチジン (Asp162-His171) 付近以外に、Val195-Ala105 及び Ala280-Arg298 領域が保存されていた。しかし、大きな欠失があるような類似性の低い領域が存在した。植物間での相同性は Table2-3 に示すような関係

Table 2-3. Homology among plant peroxidases.

TUP	TOP	POP	
49	50	36	HRP
	47	48	TUP
		37	TOP

TUP: turnip peroxidase, TOP: tobacco peroxidase
POP: potato peroxidase, HRP: horseradish peroxidase

にあった。分類的にはカブと西洋ワサビはアブラナ科 (Brassicaceae) に属し、タバコとジャガイモはナス科 (Solanaceae) に属する。アブラナ科とナス科は異なる類 (下綱, Infraclass) である。しかし、ナス科のタバコが同じ科のジャガイモよりも、異なる科のカブや西洋ワサビと類似していることは進化的にも興味深い。最近植物以外の大腸菌、B. stearothermophilus、酵母、カビ、動物より種々のペルオキシダーゼがクローン化されている。カビの Caldariomyces fumago のクロロペルオキシダーゼはヘムと配位している残基はシステインで¹⁰⁵⁾、また動物のグルタチオンペルオキシダーゼはセレノシステインであった¹⁰⁶⁾。酵母 (Saccharomyces cerevisiae) のチトクローム c ペルオキシダーゼ (CCP) はクローン化され⁸⁰⁾、その結晶構造解析より、2つのヒスチジン残基がヘムに関与していた³⁹⁻⁴¹⁾。また、カビ (Phanerochaete chrysosporium) 由来のリグニンペルオキシダーゼもヘムを持ち、その配位にはヒスチジンが関与することが示唆されている¹⁰⁷⁾。大腸菌⁷⁾ 及び B. stearothermophilus⁸⁾ 由来のペルオキシダーゼはヘムを補欠分子族として持つ。微生物由来のペルオキシダーゼとヘムに関与する2つのヒスチジン周辺配列について比較した。近位ヒスチジン (His170) 周辺の方が遠位ヒスチジン (His42) 周辺よりもよく保存されており、ヘムが直接タンパク質と接触のある第5酸配位子 (近位ヒスチジン) 周辺の構造がうまくヘムと配位させる役割を持っていることが推察できる。一方、遠位ヒスチジン周辺では、CCPの活性発現に Arg48、Trp51 が重要な役割を果たしている⁴¹⁾。Arg48 のグアニジウム基が H_2O_2 の O-O 結合の開裂に関与していることが示されており、このアルギニン残基が全てのペルオキシダーゼで保存されていた。また Trp51 は、compound I (ヘム鉄が過酸化水素で酸化数 5に酸化された型) で観察されるフリーラジカルの形成に必須ではなく、むしろ遊離したフリーラジカルの安定性に影響を与えていた¹⁰⁸⁾。CCPとHRPの酵素反応のメカニズムの違いが指摘され、その中でも反応過程で生じたフリーラジカルの所在が注目されてきた¹⁰⁹⁾。CCPの Trp51 を部位特異的変異操作により Phe に置換すると、compound I が野性型 (Trp51) に比べて安定性が低下し、その半減期がHRPレベルにまで低下した¹⁰⁸⁾。大腸菌及び B. stearothermophilus の酵素では同じ位置にトリプトファン残基を有していたが、カビ、植物由来の酵素ではフェニルアラニンであった。先のCCPの実験ではフェニルアラニンはフリーラジカルを安定化できなかつた¹⁰⁸⁾。大腸菌や B. stearothermophilus 由来の酵素は、ペルオキシダーゼ活性以外にもカタラーゼ活性を有し、分子量も約 8万と他のペルオキシダーゼ (約3万-4万) よりも大きい^{7, 8)}。そしてHRPとの相同性は極端に低く、またフリーラジカルの所在はCCP型であると推察できる。また、リグニンペルオキシダーゼは反応機構はよく理解されていないが、アミノ酸配列

の類似性よりHRP型であると想像できる。しかし、この酵素はリグニン分解酵素であり、植物ペルオキシダーゼはリグニン合成に関与しているといわれており^{22,25)}、この機能の異なる酵素の活性部位が類似していることは興味深い。

第5節 要約

西洋ワサビには多くのペルオキシダーゼアイソザイムが存在する。cDNA クロニングで得られたアイソザイム遺伝子は完全長ではなかった。そこでゲノム遺伝子を単離し、ペルオキシダーゼ遺伝子の構造を明らかにした。

本章では、西洋ワサビ培養細胞より染色体 DNA を調製し、*Sau3AI* で部分分解後、スクロース密度勾配遠心分離で 9-20kbp のサイズ断片を回収し、 λ EMBL4 をベクターとして約6万個のゲノム遺伝子ライブラリーを作成した。アイソザイムCをコードする cDNA をプローブに用いて、9個の陽性クローンを得た。各クローンの制限酵素地図を作成し、塩基配列を決定した。cDNA で得られた pSK1、pSK2 に相当するゲノム遺伝子 *prxC1a*、*prxC1b* をクローン化することができた。*prxC1b* と *prxC1a* はこの順でタンデムにコードされていた。さらに別のゲノム遺伝子 (*prxC2*、*prxC3*) を得ることができた。しかし、pSK3 に相当する *prxC1c* については全長を得ることができなかった。以上の結果より西洋ワサビには少なくとも5種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が明らかになった。ペルオキシダーゼ遺伝子はどのアイソザイムも3つのイントロンと4つのエキソンからなる構造をしていた。イントロンは、各々の長さは異なるが構造遺伝子に挿入されている位置はアイソザイム間で同じだった。どのペルオキシダーゼ遺伝子も 5'非翻訳領域にはプロモーター配列 TATA そして CAAT 配列が存在し、開始コドン ATG の 3bp上流には翻訳を促進するといわれている塩基Aが存在した。また 3'非翻訳領域にはいくつかのポリA付加シグナル AATAAA が存在し、既に得られている cDNA よりこれらの内の1つが実際機能を果たしたものと思われた。イントロンは AGで始まり、GT で終わるというコンセンサ構造をしていた。

アイソザイムC1a は Welinder のアイソザイムC と全く同じ構造をしていたが、N末側およびC末側にそれぞれ 30残基、15残基から成るエキストラペプチド (N-及びC-エキストラペプチド) が存在した。また C1b、C1c は塩基配列とアミノ酸配列ともに C1a と 90% 以上の相同性を示した。アイソザイムC2、C3 は、C1a と塩基配列、アミノ酸配列ともに、約 70% で、C2 と C3 間では約 60% とで相同性が低かった。5種のアイソザイムはいずれも前駆体タンパク質として生合成され、N-、C-エキストラペプチドがプロセシングで除かれ成熟型酵素となると推察された。N-エキストラペプチドは疎水性アミノ酸が多く、また塩基性アミノ

酸を含み、細胞内局在化に關与するシグナルペプチドの可能性があつた。5種のアイソザイム間では、ヘムに配位すると言われている遠位及び近位ヒスチジン (His42、His170) を含むその周辺が特によく保存され、酵素活性に關与する Arg38、Arg183、Tyr185 も存在し、ジスルフィド結合を形成する8つのシステイン残基も存在した。他の植物由来 (カブ、タバコ、ジャガイモ) ペルオキシダーゼとは、酵素活性上および構造上重要なアミノ酸残基が保存されており、遠位、近位ヒスチジン周辺は特に、そして他の領域にも保存された領域があつた。全体的なアミノ酸配列の相同性は 36-50% だつた。遠位、近位ヒスチジン周辺のアミノ酸配列を、バクテリア、酵母、カビ、植物由来のペルオキシダーゼで比較した。近位ヒスチジン付近はどのペルオキシダーゼにおいてもよく保存されていた。遠位ヒスチジンについては植物由来のものはよく類似していたが、微生物由来のものとはほとんど類似せず、Arg38、His42 のみが保存されていた。

第3章 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子の大腸菌での発現

第1節 緒言

西洋ワサビのペルオキシダーゼ (HRP) は、補欠分子族にヘムを持つ。ヘムタンパク質として、酵素学的及び物理化学的に、現在もなお研究されている。結晶を調製し^{34,35)}、その構造解析が試みられているが、糖タンパク質であるために進んでいないようである。もし、改変タンパク質を任意に作成できれば、そして、糖鎖のないタンパク質を調製できれば、ペルオキシダーゼの結晶構造を解析したり、また、構造と機能を理解するのに有用である。

本章では、cDNA 及びゲノムクローンよりペルオキシダーゼ遺伝子をインビトロで構築し、大腸菌での発現を試みた。さらに、N末端エキストラペプチドのコードする領域を除去したペルオキシダーゼ遺伝子を構築し、続いてC末端エキストラペプチドのコードする領域を除去した成熟型タンパク質をコードする遺伝子を作成して、大腸菌で発現させた。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用菌株

本実験で用いた大腸菌は、*Escherichia coli* TG1 (K12 Δ (lac-pro) supE thi hsdD5 [F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^o lacZ Δ M15])¹¹⁰⁾, JM105 (Δ (lac-proAB) thi rpsL endA sbcB15 hsdR4 [F' proAB lacI^o lacZ Δ M15 traD36])⁵⁰⁾を用いた。

2. 使用したプラスミド及びファージ

部位特異的変異及び塩基配列決定にM13 ファージmp18, mp19 を用いた。

ペルオキシダーゼ遺伝子の組換えには pSKG1 (Fig. 3-1), pSK1 (Fig. 1-7), pUC9を用い、発現用に pKK223-3 を Pharmacia より購入して用いた。

3. タンパク質の電気泳動

Laemmli の方法¹¹²⁾に従い、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。8 から12.5% の範囲のポリアクリルアミドゲルを用いて、Bio-rad 社の標準タンパク質マーカー (phosphorylase [130,000], bovine serum albumin [75,000], ovalbumin [50,000], carbonic anhydrase [39,000], soybean trypsin inhibitor [27,000], lysozyme [17,000]) を基準にし

て、タンパク質の分子量を推定した。タンパク質の染色はコマシーブリリアントブルーで行なった。

4. ウェスタンブロッティングと免疫染色

ウェスタンブロッティングと抗原抗体反応は Towbin らの方法¹¹³⁾に従った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲルと同サイズのニトロセルロースメンブラン (Trans-Blot, Bio-rad) をトランスファー液 (25mM Tris, 192mM Glycine, pH8.3, 0.1% SDS, 15% methanol) 中で平衡化した。トランスファー液中で定電圧 30V (8% アクリルアミドゲル) か 40V (12.5% アクリルアミドゲル) で約 40分間通電して、メンブランにタンパク質を移した。2% BSA を含む TBS 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.9% NaCl) 中で、4°C、約1時間振とうさせてメンブランをブロックした。ウサギ由来抗ペルオキシダーゼ抗体 (Cappel) と 0.1% BSA を含む TBS 緩衝液中で、4°C で一晩反応させた。TBS 緩衝液によりメンブランを15分間、室温で数度洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識化ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel) と 0.1% BSA を含む TBS 緩衝液中で 2-3時間、4°C で反応させた。TBS 緩衝液で先ほどと同様に洗浄した。発色は和光純薬 (株) の HRP 発色キットを用いて行なった。

5. 部位特異的変異処理

部位特異的変異処理に用いるオリゴヌレオチド (5'-CATGGAGTTAAGAGTTGG-3') を、ABI 社 DNA 合成機 Model 381A を用いて合成した。

変異処理は、Amersham 社の Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system Ver. 2 を用い、この説明書に従った。この方法は、Eckstein らの方法¹¹⁴⁾に基づいている。変異処理した反応液 10 μ l を用いて、*E. coli* TG1 を形質転換した。得られたプラークより一本鎖 DNA を調製し、塩基配列を決定することにより確認した。

6. その他の実験方法及び材料

制限酵素処理は各々の使用書に従った。ゲルからの DNA 断片の回収、塩基配列の決定、形質転換などは第1章第2節に示した通りに行なった。

第3節 結果

1. 完全長ベルオキシダーゼ遺伝子の構築と発現

翻訳開始コドン(ATG)を欠くベルオキシダーゼアイソザイムCのcDNAと、ゲノム遺伝子を組み合わせて完全長のベルオキシダーゼ遺伝子を Fig. 3-1 のように構築した。 prxC1a と prxC1b をタンデムに有するファージクローンより、Bgl II -Sph I 断片(約2.2kbp)を pUC18 にサブクローニングした(pSKG1)。 prxC1a の第1エクソンの5'側と3'側に Dra I 部位が2ヶ所存在する。5'側の Dra I 部位は、翻訳開始コドン(ATG)の4bp上流にある。pSKG1を Dra I で分解し、第1エクソンを含む Dra I 断片(300bp)を回収し、さらに、第1エクソン内部にある Spl I で処理し、ATGを含む Dra I -Spl I 断片(144bp)を調製した。一方、cDNAの方には、Spl I 部位が2ヶ所あるため、まず、翻訳終止コドン(TGA)の6bp下流の Sal I で処理後、Spl I で部分分解し、Spl I -Sal I 断片を得た。pUC9は、pUCシリーズの中で、マルチクローニング部位の Eco RI 部位と Sma I 部位の間が最も短く、翻訳の際に問題となるATGとSD配列の間を短くすることができる。そこで、ベクターにはpUC9を Sma I, Sal I で分解して用いた。pUC9とゲノムからの Dra I -Spl I 断片、cDNAよりの Spl I -Sal I 断片の3つを連結して、完全なベルオキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドを構築した(pUC-PER1)。これを、大腸菌での発現ベクター pKK223-3 と連結した。まず、pUC-PER1のベルオキシダーゼ遺伝子の両端にあるベクター由来の Eco RI, Hind III で分解し、Eco RI 及び、Hind III で分解した pKK223-3 と連結した(pKK-PER1)(Fig. 3-2)。このプラスミドでは、ベルオキシダーゼ遺伝子が、tac プロモーター下流にあり、SD配列とATGの間は16bpで、IPTGで生産誘導ができ、さらに、余分な転写を防ぐ強力なリボゾームのターミネーター(rrnT)という構造になっている。pKK-PER1を *E. coli* JM105 に導入し、IPTGで生産誘導をかけた。しかし、ベルオキシダーゼ活性も検出できず、さらに、ウェスタンブロッティング後の抗原抗体反応を用いてもベルオキシダーゼタンパク質を検出できなかった。そこで、このベルオキシダーゼ遺伝子を pKK223-3 よりコピー数が約20倍多いだけで他の機能は同じの pKP1500(九州大井本教授より供与)に導入しても、また、RNase欠損株¹¹⁵⁾、或は、大腸菌ベルオキシダーゼI欠損株¹⁰¹⁾に導入しても西洋ワサビベルオキシダーゼ活性及びタンパク質を検出できなかった。

以上のように、N末端及びC末端にエキストラペプチドを持つ前駆体型ベルオキシダーゼを大腸菌を用いて生産することができなかった。

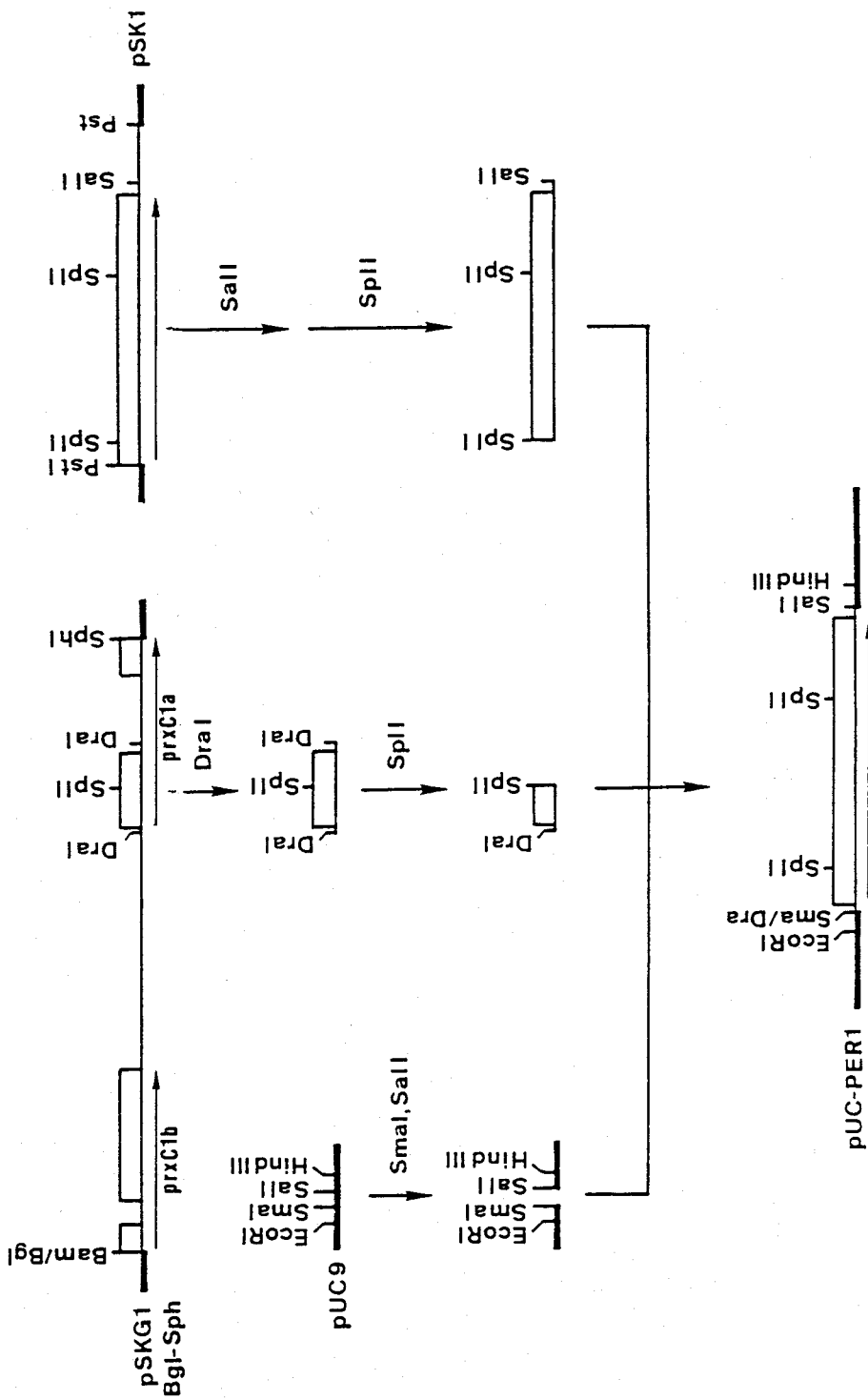
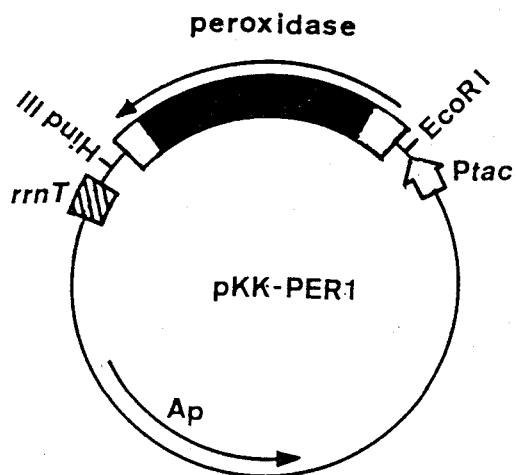


Fig.3-1. Construction scheme of complete peroxidase genes. pSKG1 contains BglII-SphI fragment from genomic phage clone. pSK1 contains cDNA insert for prxC1a as described earlier. Refer to text for description of the construction of complete peroxidase gene.



```

      -35                               -10
TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC
AGAAATCCCAAAAATG
      S.D.
      EcoRI

```

Fig.3-2. Structure of pKK-PER1, peroxidase *Cla* expression vector. pKK-PER1 contains the gene (*prxCla*) for peroxidase with N- and C- extrapeptides. *Ptac* and *rrn T* indicate *tac* promoter and ribosomal RNA terminator. 5' flanking region is also shown.

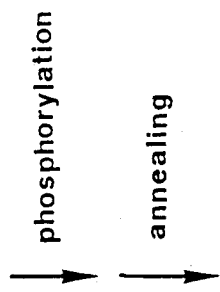
2. N末端エキストラペプチドを欠くペルオキシダーゼ遺伝子の構築と発現

植物体より精製されて用いられているアイソザイムCは、成熟型タンパク質である。そこで、N末端およびC末端に存在するエキストラペプチドに相当する部分を遺伝子組換え操作により除去することにした。その第1段階として、N末端エキストラペプチドを除去した。Welinderの報告した成熟型アイソザイムCのN末端はピログルタミン酸で、塩基配列よりグルタミンがそれに相当する。このグルタミンの前には、翻訳のための開始コドン(ATG)が必要である。しかし、この近くには適当な制限酵素部位がないため、グルタミンより18、19番目のバリン、アルギニンに相当する塩基配列上に存在する *Spl*I 部位 (Fig. 3-3) を用い、グルタミンからバリンの間のアミノ酸配列を壊さぬように、オリゴヌクレオチドを合成した。合成したオリゴヌクレオチドは、Fig. 3-4 に示すように 59 ヌクレオチドから成り、自身内や他の周辺配列との間で、mRNA が2次構造をとらないように設計した。さらに、コドンの選択は、大腸菌のコドン使用頻度¹¹⁷⁾に従った。また、ベクター pKK223-3 の *Eco*R I 部位と連結できるように、開始コドン ATG のすぐ前に *Eco*R I の粘着末端部分を用意した。2本のオリゴヌクレオチドを T4 キナーゼでリン酸化し、アニーリング後、59mer から成る *Eco*R I -*Spl*I 断片を得た。この断片と pKK-PER1 (Fig. 3-2 参照) から残りのペルオキシダーゼ遺伝子を調製した *Spl*I -*Hind*III 断片を、pUC18 上で一度連結し、その後、ベクター pKK223-3 の *tac* プロモーター下流に置いた (pKK-PER4) (Fig. 3-5)。この pKK-PER4 を *E. coli* JM105 に導入し、IPTG で生産を誘導した。大腸菌抽出液中には、ペルオキシダーゼ活性を認めることができなかった。しかし、IPTG で生産誘導した菌体を SDS を含む泳動用緩衝液で可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、タンパク質染色を行うと、アミノ酸配列より推定される分子量 (35,766) とほぼ同じ位置にペルオキシダーゼと思われるタンパク質を、IPTG で生産誘導したペルオキシダーゼ遺伝子保持菌にのみ検出できた (Fig. 3-6)。さらに、このタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、ウェスタンブロッティングを行い、免疫的に調べると、推定される分子量を持ち、しかも抗原性のあるタンパク質を、IPTG で誘導したペルオキシダーゼ遺伝子保持菌にのみ検出できた (Fig. 3-6)。以上のことより、N末端エキストラペプチドを欠くペルオキシダーゼは、大腸菌内で生産することができたと判断した。一般的に真核生物の遺伝子を大腸菌内で発現させると、inclusion body を作り、生物学的活性を示さないことが多い。HRP の場合もそうではないかと考え、ペルオキシダーゼ遺伝子保持菌と非保持菌を IPTG で生産誘導後、位相差顕微鏡で観察した。遺伝子保持菌のみに、細胞内に顆粒状の物質を認めた (Fig. 3-7)。また、長い棒状の細胞も認められた (データ未掲載)。

M	H	F	S	S	S	S	T	L	F	T	C	I	T	L	I	P	L	V	C	L	I	L	H	A	S	L	S	D	A	30
Q	L	T	P	T	F	Y	D	N	S	C	P	N	V	S	N	I	V	R	D	T	I	V	N	E	L	R	S	D	P	60
R	I	A	A	S	I	L	R	L	H	F	H	D	C	F	V	N	G	C	D	A	S	I	L	L	D	N	T	T	S	90
F	R	T	E	K	D	A	F	G	N	A	N	S	A	R	G	F	P	V	I	D	R	M	K	A	A	V	E	S	A	120
C	P	R	T	V	S	C	A	D	L	L	T	I	A	A	Q	Q	S	V	T	L	A	G	G	P	S	W	R	V	P	150
L	G	R	R	D	S	L	Q	A	F	L	D	L	A	N	A	N	L	P	A	P	F	F	T	L	P	Q	L	K	D	180
S	F	R	N	V	G	L	N	R	S	S	D	L	V	A	L	S	G	G	H	T	F	G	K	N	Q	C	R	F	I	210
M	D	R	L	Y	N	F	S	N	T	G	L	P	D	P	T	L	N	T	T	Y	L	Q	T	L	R	G	L	C	P	240
L	N	G	N	L	S	A	L	V	D	F	D	L	R	T	P	T	I	F	D	N	K	Y	Y	V	N	L	E	E	Q	270
K	G	L	I	Q	S	D	Q	E	L	F	S	S	P	N	A	T	D	T	I	P	L	V	R	S	F	A	N	S	T	300
Q	T	F	F	N	A	F	V	E	A	M	D	R	M	G	N	I	T	P	L	T	G	T	Q	G	Q	I	R	L	N	330
C	R	V	V	N	S	N	S	L	L	H	D	M	V	E	V	V	D	F	F	V	S	S	M	353						

Fig.3-3. Amino acid sequence of peroxidase Cla on pKK-PER1. Mature type of peroxidase (27) is boxed. SplI site is located on the nucleotide sequence corresponding to V48-R49.

AATTCATGCAACTGACCCCGACCTTCTACGAAAACCTCTTGTCGGAACGTTTCTAACATC
GTACGATGTTAGAAACGTTCCGGACAAGAGTTTTCGTAGAAGTCCGGGGTCAGTTGCATG



MetGlnLeuThrProThrPheTyrAspAsnSerCysProAsnValSerAsnIle
AATTCATGCAACTGACCCCGACCTTCTACGAAAACCTCTTGTCGGAACGTTTCTAACATC
GTACGTTGACTGGGGCTGGAAGATGCTTTGAGAACAGGCTTGCAAGATTGTAGCATG
EcoRI SplI

Fig.3-4. Synthetic oligonucleotides cloned into pKK-PER4. Two oligonucleotides (59mer) were designed and synthesized with a few consideration (see text). Substituted bases are underlined. Each oligonucleotide was phosphorylated and annealed to obtain EcoRI-SplI fragment of 2 oligonucleotides.

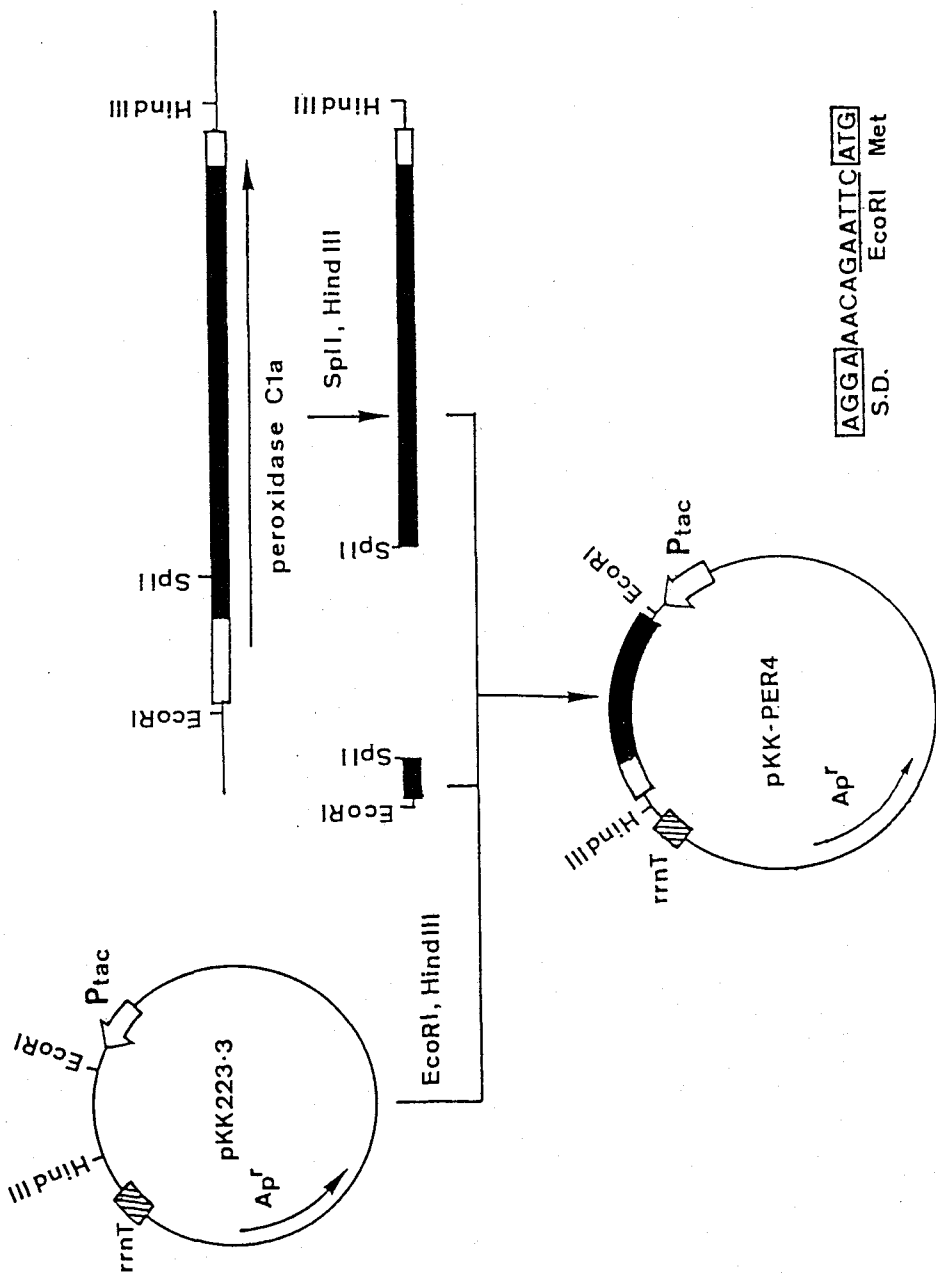


Fig.3-5. Construction scheme of pKK-PER4, peroxidase expression vector. pKK-PER1 is as described in Fig.3-3. pKK223-3 vector is used to express peroxidase gene with C- extrapeptide. The structure between the Shine- Dalgarno (S.D.) sequence and translational iniation site (ATG) is also shown. See text further detail.

そこで、ベルオキシダーゼ遺伝子保持菌及び非保持菌を IPTG で誘導し、培養した菌体を超音波処理により破碎し、超遠心分離 (10,000rpm, 10分間, 0℃) により沈澱画分と上澄液画分に分別した。各画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画後、タンパク質染色及び免疫反応で検出したところ、いずれもベルオキシダーゼ遺伝子保持菌の沈澱画分にのみ、ベルオキシダーゼタンパク質を検出できた (Fig. 3-8)。

以上のことより、N末端エキストラペプチドを欠くベルオキシダーゼは、大腸菌内で発現したが、酵素活性はなく、inclusion body として不溶性画分に存在していることが明らかになった。

3. 成熟型ベルオキシダーゼの構築と発現

N末端エキストラペプチドを持たないが、C末端エキストラペプチドを持つベルオキシダーゼ (pKK-PER4) を大腸菌内で生産することができた。成熟型ベルオキシダーゼを得るために、C末端エキストラペプチドを Fig. 3-9 に示すように、部位特異的変異操作により除いた。pKK-PER1 より Sph I-Sal I 断片を調製し、M13 mp18 の Sph I, Sal I 部位と連結した。この組換えファージより一本鎖 DNA を調製し、pKK-PER1 の Sph I-Sal I 断片がクローニングされていることを確認した。309 番目のロイシンのコドン CTA を終止コドン TAA に変換する 18mer のオリゴヌクレオチド (5'-CATGGAGTTAAGAGTTGG-3') を用いて、部位特異的変異操作を行なった。塩基配列を調べて変異を確認後、二本鎖ファージ DNA を調製し、Sph I 及び Sal I で分解して、Sph I-Sal I 断片を回収した。一方、N末端エキストラペプチドを除去したベルオキシダーゼ遺伝子 (pKK-PER4) より、N末端部分の EcoR I-Sph I 断片を調製した。この2つの断片を発現ベクター pKK223-3 と連結し、成熟型ベルオキシダーゼ遺伝子を持つ pKK-PER5 (Fig. 3-9) を得た。

pKK-PER5 を *E. coli* JM105 株に導入し、IPTG で生産を誘導した。pKK-PER4 の場合と同様に、大腸菌抽出液中には、ベルオキシダーゼ活性は認められなかった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、タンパク質染色したものでは、アミノ酸配列から推定される分子量 (34,063) 付近で、他の内生タンパク質と重なるために、明瞭に確認できなかったが、ウェスタンブロッティング、免疫反応で検出したところ、推定分子量を持つ抗原性のあるタンパク質を検出した (Fig. 3-10)。そして、このタンパク質はC末端エキストラペプチドを持つベルオキシダーゼ (pKK-PER4) よりも、エキストラペプチド15 残基分推定される分子量 (約1,700) だけ小さかった。また、大腸菌で生産された成熟型ベルオキシダーゼも、不溶性画分に存在した (Fig. 3-11)。

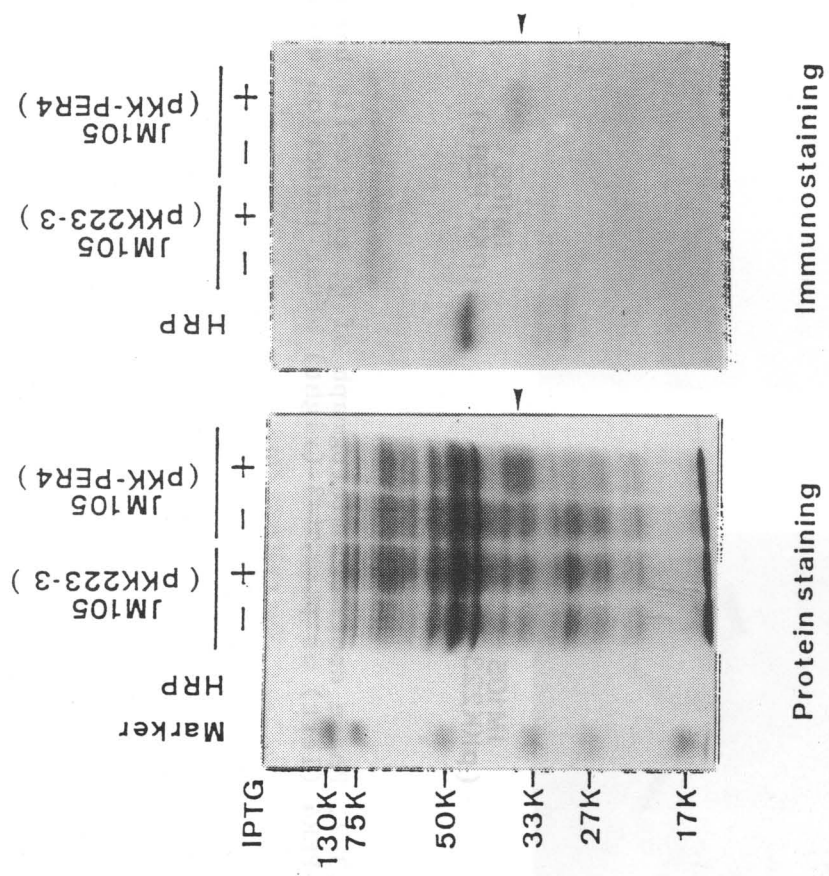
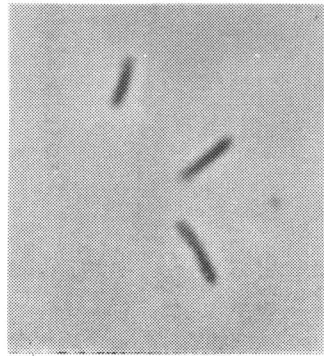


Fig.3-6. Expression of peroxidase gene without N-extrapeptide in *E. coli*.
 Left: protein staining; Right: immunostaining; +: gene is subjected to induction with IPTG; -: without induction. *E. coli* JM105 harboring pKK223-3 was used as control. HRP indicates horseradish peroxidase purified from the plant. Immunostained band of peroxidase (HRP) was shown with a higher molecular weight due to glycosylation of the protein.



JM105
(pKK223-3)



JM105
(pKK-PER4)

Fig. 3-7. Phase contrast micrograph of *E. coli* cells harboring pKK-PER4 (left) or pKK223-3 (right) after induction with IPTG.

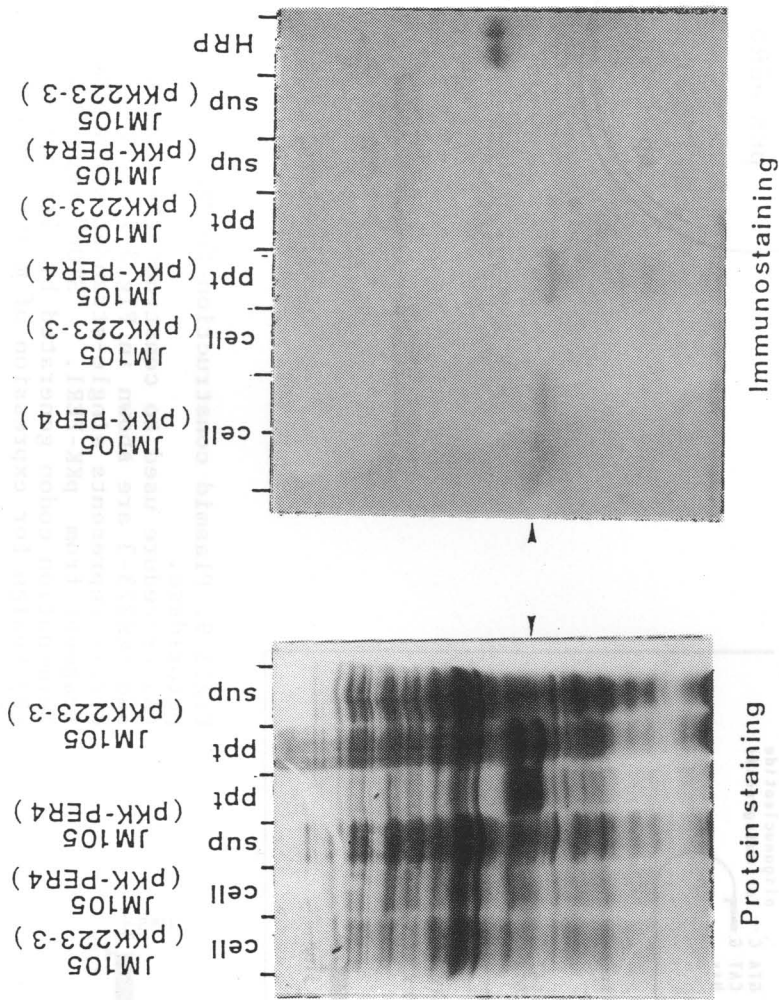


Fig.3-8. Intracellular localization of peroxidase with N-extra-peptide produced in E. coli. Left: protein staining. Right: Immunostaining.
E. coli JM105 harboring pKK223-3 is used as control. E. coli cells is induced to express the gene , harvested and subjected to SDS-PAGE (marked "cell"). The cells are then suspended in buffer and disrupted by ultrasonication. After centrifugation, the product is divided into supernatant "sup" and precipitant "ppt". HRP indicates horseradish peroxidase purified from the plant. Arrow shows the position for peroxidase gene product.

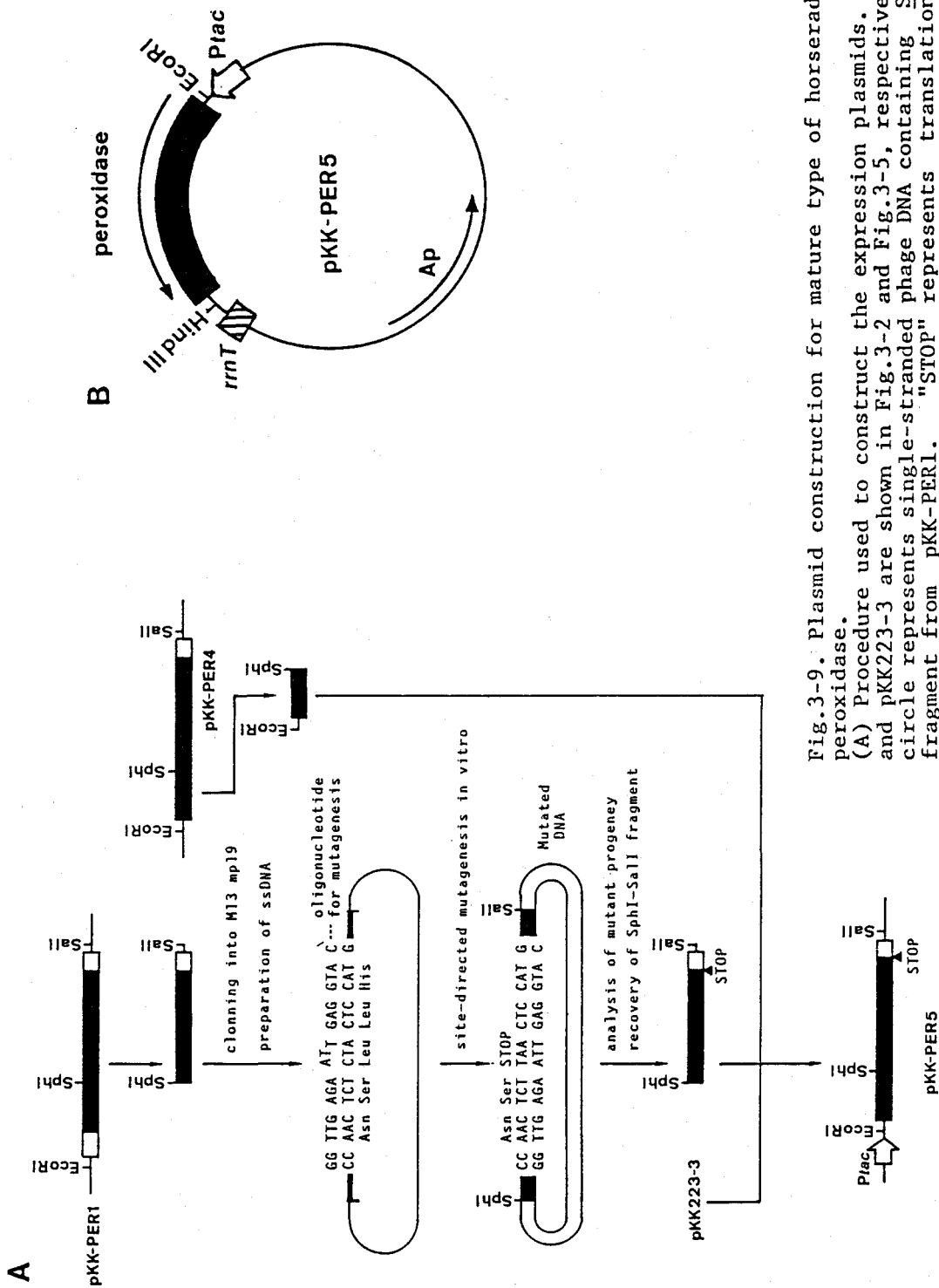


Fig.3-9. Plasmid construction for mature type of horseradish peroxidase.
 (A) Procedure used to construct the expression plasmids. pKK-PER1 and pKK223-3 are shown in Fig.3-2 and Fig.3-5, respectively. The circle represents single-stranded phage DNA containing SphI-SalI fragment from pKK-PER1. "STOP" represents translational termination codon generated by site-directed mutagenesis.
 (B) Design for expression of mature type of horseradish peroxidase.

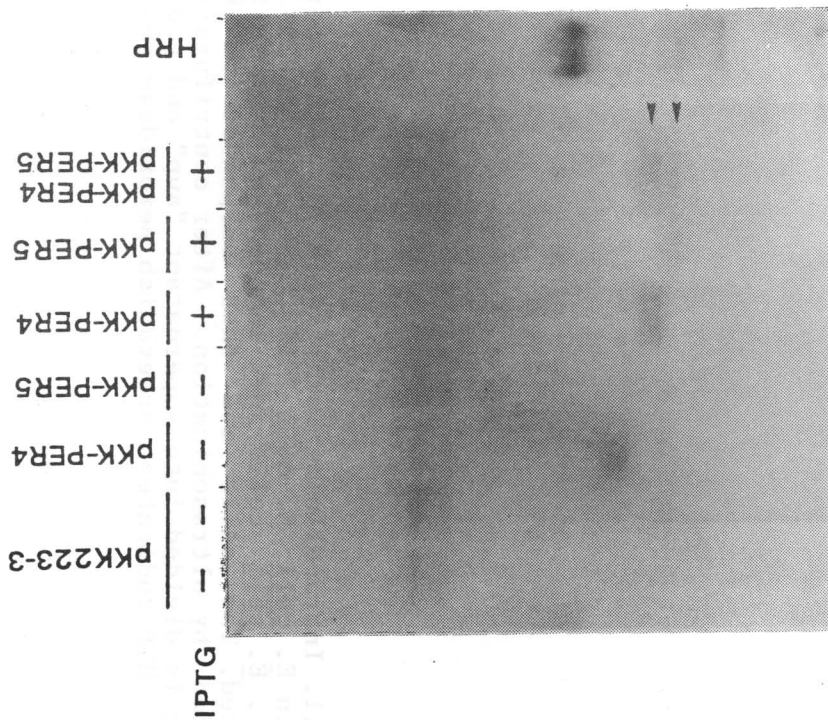


Fig.3-10. Expression of mature type of peroxidase in *E. coli*.
 +: gene is subjected to induction with IPTG; -:without induction. *E. coli* JM105 harboring PKK-PER4 and PKK223-3 are used as control.
 HRP indicates horseradish peroxidase purified from the plant. Upper arrow shows the position of peroxidase with N-extrapeptide and lower arrow that of mature peroxidase.

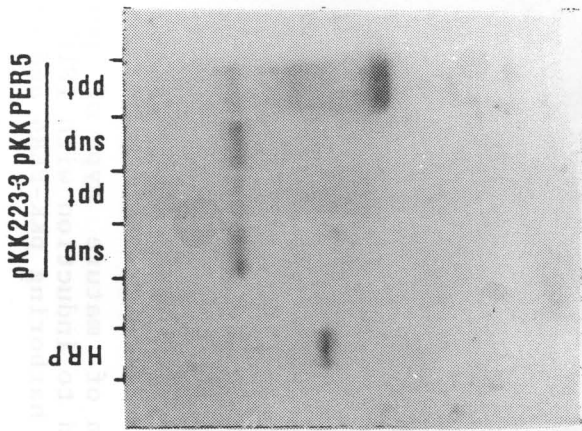


Fig.3-11. Intracellular localization of mature peroxidase produced in *E. coli*. *E. coli* JM105 harboring pKK223-3 is used as control. *E. coli* cells are induced to express the gene and harvested. The cells are then suspended in buffer and disrupted by ultrasonication. After centrifugation, the product is divided into supernatant "sup" and precipitation "ppt". HRP indicates horseradish peroxidase purified from the plant.

第4節 考察

ペルオキシダーゼ遺伝子を完全に含む cDNA をクローニングできなかつたので、ゲノム遺伝子と組み合わせることにより、イントロンを持たない完全なペルオキシダーゼ遺伝子を作成した。これを用いて、大腸菌で前駆体型ペルオキシダーゼの生産を試みた。しかし、細胞抽出液には酵素活性は認められず、また、免疫反応によっても酵素タンパク質を検出できなかった。作成したペルオキシダーゼ遺伝子に構築上のミスが考えられたが、ペルオキシダーゼ遺伝子をプロテインA遺伝子のC末端側に融合させ¹¹⁸⁾、*E. coli*で発現させて、IgG カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製すると、両者の分子量の合計から推定される分子量を持つ融合タンパク質を認めることができた(データ未掲載)。このことより、ペルオキシダーゼ遺伝子に問題はなく、また、融合タンパク質にすると発現できることがわかった。一般的に大腸菌で異種タンパク質を効率よく発現させる場合に、重要な因子がいくつかある。それらを大きく分ければ、発現ベクター(コピー数、ベクターの安定性)、効率よい転写(プロモーター、ターミネーターなど)、安定な mRNA、効率のよい翻訳(mRNA の2次構造、SD 配列、コドン使用頻度)、そして翻訳産物の安定性(プロテアーゼの分解、inclusion body の形成など)が挙げられる。しかし今回の場合、前駆体型ペルオキシダーゼをコードする遺伝子より、N末端側のエキストラペプチド(N-エキストラペプチド)を除去した場合には、大腸菌で生産させることができた。この際に、約20アミノ酸残基に相当する塩基配列のうちの8塩基を大腸菌のコドン使用頻度を考え置換した。しかし、309残基のうちの8残基を大腸菌がよく用いるコドンに換えただけで、これだけ顕著に発現量に変化すると考えにくい。事実、コドン使用頻度は大腸菌のものとは異なるにもかかわらず、コムギの α -アミラーゼ¹²⁶⁾、ダイズのグリシニン¹¹⁹⁾、いくつかの植物のリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ(Rubisco)の小サブユニット¹²⁰⁾などのタンパク質が生産されている。ダイズのグリシニンの場合、シグナルペプチドが付加した前駆体タンパク質は大腸菌で生産できなかったが、成熟型のグリシニンは生産された。ペルオキシダーゼの場合でも、N-エキストラペプチドが存在すれば、大腸菌での生産効率を低下させるのかもしれない。これには2つの可能性、そして転写された mRNA レベル、そして翻訳されたタンパク質レベルが考えられる。翻訳されたタンパク質については、N-エキストラペプチド部分が存在することで、翻訳された遺伝子産物の大腸菌内での安定性を低下させる、或は、生産した大腸菌を致死に至らせるという可能性がある。生産誘導をかけても増殖は続けていたので、後者ではなさそうである。遺伝子産物の安定化は、大腸菌のプロテアーゼ欠損株、例えば *lon⁻* 株を用いることで解決した

場合もある¹²¹⁾。ペルオキシダーゼは、ヘムを補欠分子族として含むが、大腸菌で生産された場合には、ヘムがうまく取り込まれずに不安定化したのかもしれない。チトクロムcペルオキシダーゼ(CCP)³⁹⁾、チトクロムP-450¹²²⁾などが大腸菌で生産されている。大腸菌で生産されたCCPは、約10%がヘムを持つのみで、残りの90%はヘムを保持していないにもかかわらず、安定に存在している。本来HRPは糖タンパク質であるので、大腸菌で生産された場合に糖鎖が付かず安定性を失ったのかもしれない。転写されたmRNAについては、N-エキストラペプチドをコードする付近のmRNAが不安定で分解されやすい、或は、2次構造をとり翻訳を阻害することが考えられる。後者の可能性を考えてみた。Fig. 3-12に示すように、N-エキストラペプチド除去する前は、 $\Delta G = -21.7$ kcal/molを持つ2次構造をとり、除去した場合には、 $\Delta G = -3.3$ kcal/molの構造のものが予想できた。mRNAの2次構造により翻訳が大きく影響されるという例が多くあり、例えば、 γ -インターフェロンを大腸菌で発現させた場合には、 ΔG が+1.2 kcal/molから-6.6 kcal/molへと8.8 kcal/mol変化することにより、発現量が3倍上昇した¹²³⁾。*lac* オペロンの場合には5'末端よりmRNAが分解されていくと報告されている¹²⁴⁾、mRNAの安定性については今回調べなかった。しかし、前駆体型ペルオキシダーゼ遺伝子を持ち、生産誘導をかけた大腸菌よりmRNAを調製し、ノーザンハイブリダイゼーションで転写レベルを調べたところ、一部は分解されていたが、ほとんどのものは正常な大きさのmRNAが存在していた(データ未掲載)。

いずれの場合でも、成熟型ペルオキシダーゼ遺伝子自身に大きな問題があったのではないと言える。なぜなら、N-エキストラペプチドを除いたペルオキシダーゼが、大腸菌で発現したからである。

N-エキストラペプチドを除いたペルオキシダーゼや成熟型ペルオキシダーゼを大腸菌で生産させることに成功した。しかし、いずれの場合でも、不溶性画分として存在した。一般的に真核生物の遺伝子を原核細胞で発現させると、inclusion bodyなどの不溶性画分として産出されることが多い¹²⁵⁾。しかし、植物遺伝子を大腸菌で発現させても、酵素活性が認められたものもいくつかある。コムギの α -アミラーゼ¹²⁶⁾、トウモロコシのグルタチオントランスフェラーゼ¹²⁷⁾などである。また、大腸菌自身の遺伝子を大腸菌で過剰生産させても、inclusion bodyを形成する¹²⁸⁾ことから、遺伝子の起源よりも、むしろ翻訳産物自身の化学的性質によるものであろう。HRPの場合、8個のシステイン残基があり、4つのジスルフィド結合を形成している。Shoemakerらは、inclusion bodyの形成は分子間ジスルフィド結合が原因であると報告している¹²⁹⁾が、システイン残基を持たない変異プロキモシンでも形成される¹³⁰⁾ことから、必ずしもシステイン残

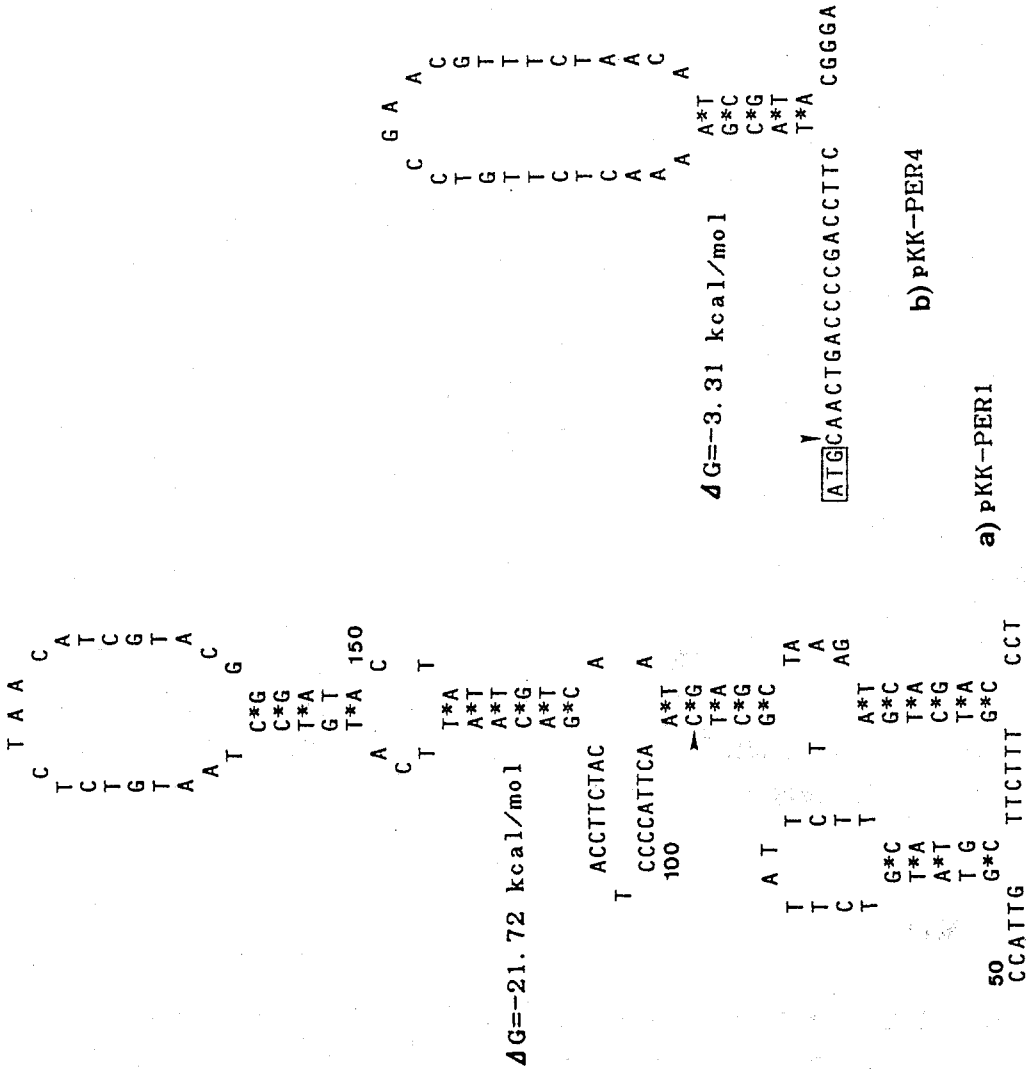


Fig.3-12. Possible secondary structure and corresponding thermodynamic stabilities of mRNA for peroxidase with N- and C- extrapeptides (a) and peroxidase with C-extrapeptide (b), respectively.

基の多さによるものではない。inclusion body 自身の研究は遅れているが、Taylor らは、inclusion body には2つの形状があり、プロキモシンの場合はランダムな会合体、 α -インターフェロンの場合はやや規則性を有する会合体であることを示している¹³¹⁾。さらに最近では、inclusion body は完全にフォールディングできなかつたタンパク質からではなく、部分的にフォールディングした特別な中間体が会合して生じるものであると考えられている¹³²⁾。inclusion body となったタンパク質を可溶化し再構成させると、多くの場合酵素活性などを回復させることができる。IL-2 など広く一般的に用いられている塩酸グアニジンで可溶化し、酸化型-還元型グルタチオン系で再構成する方法¹³³⁾で、ペルオキシダーゼにおいても試みた。しかし、うまく再構成が進まず、そのために、インビトロでのアポタンパク質へのヘムの移入も成功しなかつた(データ未掲載)。ヘモグロビンの場合、この方法でヘムを持つタンパク質を再構成できた。今後、再構成方法の検討とともに、別の手段として inclusion body を形成せずに発現させる方法を考慮していかなければならない。後者の方法では、大腸菌で inclusion body としてしか生産されなかつたタンパク質が、酵母では活性型で生産できることもある¹³⁵⁾。また、大腸菌での生産温度を低下させることにより、活性型のタンパク質を多く得ることができたとの報告もある¹³⁶⁾。これらは、大腸菌で活性型のタンパク質を生産するための有効な手掛りとなるものと思われる。そして、大腸菌において活性型のペルオキシダーゼの生産に成功すれば、他のアイソザイムの混入のない、単一種で、かつ糖鎖のないタンパク質が得られることになり、結晶構造の解析、或は酵素化学的な研究を進めていけるものと信じている。さらに、ペルオキシダーゼアイソザイム A と C では、等電点が異なるだけでなく、酵素反応速度論的にも基質特異性の上からも違いがみられる⁴³⁾ので、大腸菌や酵母で生産させた遺伝子産物がこれらの機構の解明に強力な武器となるであろう。

第5節 要約

クローン化したペルオキシダーゼ遺伝子が大腸菌で発現させることができれば、糖鎖がなく、しかも、アイソザイムのない単一種のペルオキシダーゼタンパク質を得ることができる。そして、酵素化学的にも、結晶構造解析的にも利用することが期待できる。

この章では、まず cDNA 遺伝子及びゲノム遺伝子より完全なペルオキシダーゼ遺伝子を構築した。この遺伝子は、N 末及び C 末にエキストラペプチドを持つ前駆体型ペルオキシダーゼをコードする。大腸菌での発現ベクター pKK223-3 の

tac プロモーターの下流に連結した (pKK-PER1)。これを *E. coli* JM105 に導入し、発現を誘導したが、ペルオキシダーゼの活性もタンパク質も検出できなかった。オリゴヌクレオチドを用いてリンカーを作成し、N-エキストラペプチドを除去した。また、成熟型ペルオキシダーゼのN末端グルタミン残基の前に、翻訳開始コドン ATG を付加した。これを、発現ベクター pKK223-3 に導入し (pKK-PER4)、生産を誘導した。N-エキストラペプチドを持たないペルオキシダーゼタンパク質が生産されたことを、SDS-ポリアクリルアミドゲル上でのタンパク質染色により、また、ウェスタンブロットリング後の免疫染色により確認した。しかし、活性は検出できなかった。さらに、生産誘導した大腸菌では、顕微鏡で確認すると inclusion body と呼ばれるような顆粒状のものを観察でき、大腸菌破砕液中には不溶性画分として存在した。

最終的に、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異操作により、成熟型ペルオキシダーゼをコードする遺伝子のC末側に停止コドンを導入し、C-エキストラペプチドを除去して、成熟型ペルオキシダーゼをコードする遺伝子を構築した。これを、発現ベクター pKK223-3 に連結し (pKK-PER5)、*E. coli* JM105 に導入し生産誘導をした。酵素活性は認められなかったが、SDS-ポリアクリルアミドゲル上でタンパク質染色により、そして、ウェスタンブロットリング後の免疫染色によりタンパク質が生産されていることを確認した。成熟型タンパク質も大腸菌内では、pKK-PER4 と同様に不溶性画分として存在していた。

総 括

西洋ワサビペルオキシダーゼは古くより補欠分子族としてヘム分子を持つヘムタンパク質として酵素化学的によく研究されている。また、西洋ワサビペルオキシダーゼは臨床検査試薬などに使用されている。一方生理学的に植物細胞内でのペルオキシダーゼの役割が注視されていた。植物ペルオキシダーゼは多様なアイソザイムを構成し、ザイモグラムにより遺伝子座の推測がなされ、分化や発達に伴うアイソザイムの挙動が議論されてきた。1970年代前半より始まった遺伝子組換え技術が、最近植物の分野に利用されてきている。そして、この技術は種々のタンパク質の構造或は発現調節機構の解明の重要な研究手段として用いられている。遺伝子組換えを用いた異種有用タンパク質の生産が成功を取めている。

本研究では、西洋ワサビペルオキシダーゼの構造を理解し、微生物での発現を試みタンパク質工学的研究を進めて行くために cDNA クローニング及びゲノム遺伝子のクローニングを行なった。その結果、西洋ワサビ培養細胞より3種のペルオキシダーゼ cDNA クローンを得た。この cDNA クローンに相当するゲノム遺伝子以外にさらに別の2つのゲノム遺伝子を含む合計5つのアイソザイム遺伝子を単離し、その構造の解析を行なった。そして、アイソザイムのうちの1つを大腸菌で発現させることができた。ここで得られた結果は次のように総括・結論される。

第1章では、西洋ワサビ培養細胞よりペルオキシダーゼアイソザイムCのcDNAのクローニングを行なった。西洋ワサビ培養細胞より調製したポリ(A)⁺RNAを用いて約5万個からなるcDNAライブラリーを作成した。ヘムに配位するヒスチジン残基周辺の保存された領域をもとにしてオリゴヌクレオチドをプローブとし、スクリーニングを行い8個の陽性クローンを得た。制限酵素地図を作成して、3つのグループに分け、塩基配列を決定した。その結果、pSK1、pSK2、pSK3の3種のペルオキシダーゼcDNAクローンを得た。pSK1のcDNA塩基配列より推定されるアミノ酸配列は、WelinderのアイソザイムCと全く同じであったが、N未及びC末端側にエキストラペプチドが存在することが判明した。アイソザイムCは前駆体タンパク質として合成され、両エキストラペプチドがプロセッシングを受けて成熟型となるステップが示唆された。pSK2、pSK3より推定されるアミノ酸配列は、アイソザイムCとは異なるが非常に類似した配列を有しており、別のアイソザイム遺伝子と判断した。いずれのクローンも翻訳開始コドンに欠くcDNAクローンであった。3'非翻訳領域にはポリA付加シグナルAATAAAが存在していた。

第2章では、cDNAで得られた部分を含めてペルオキシダーゼ遺伝子構造を理

解すること及び別のアイソザイムが存在する可能性もあるため、ゲノム遺伝子のクローニングを行なった。西洋ワサビ培養細胞より染色体 DNA を調製した。ゲノムDNA を *EcoRI* で分解して、pSK1 の cDNA 挿入断片とハイブリダイズする約 4kbp 周辺の断片を回収し、プラスミド pUC18 をベクターに用いてライブラリーを作成し、pSK3 の cDNA に相当するゲノム遺伝子 *prxC1c* を得た。部分的な塩基配列の結果、第 1 エキソンは含まず第 1 イントロンより下流しか単離できなかった。*Sau3AI* で部分分解し、 λ EMBL4 をベクターに用いてゲノム遺伝子ライブラリーを作成した。pSK1 の cDNA 挿入断片をプローブとしてスクリーニングした結果、9 個の陽性クローンを得た。制限酵素地図を作成し、塩基配列を決定した。その結果、pSK1 と pSK2 に相当するゲノム遺伝子は、*prxC1b*、*prxC1a* の順序でタンデムに並んでいた。さらに、*prxC1a*、*C1b*、*C1c* とは異なる別の 2 つのアイソザイム遺伝子 *prxC2*、*prxC3* を単離することができた。5 種の遺伝子はいずれも 3 つのイントロンと 4 つのエキソンより成る構造をしていた。各イントロンは、どのアイソザイム構造遺伝子においても同じ位置に挿入されていた。4 つのゲノム遺伝子の 5' 非翻訳領域にはプロモーター配列 TATA、他に保存された配列 CAAT、翻訳開始コドン ATG より 3 塩基上流に翻訳を促進するといわれている塩基 A が存在した。3' 非翻訳領域には、ポリ A 付加シグナル AATAAA が存在した。イントロンは GT で始まり AG で終わるコンセンサスな構造をしていた。*prxC1a* よりアイソザイム C は、353 アミノ酸残基の前駆体タンパク質として合成され、30 残基の N 末エキストラペプチド、15 残基の C 末エキストラペプチドがプロセッシングにより除去されて成熟型ペルオキシダーゼとなると考えられた。*prxC1b* と *prxC1c* についても同様にプロセッシングを受けるものと推測された。アイソザイム間の塩基配列及びアミノ酸配列における相同性は、*prxC1a*、*C1b*、*C1c* 間では 90% 以上であった。*prxC1a* と *prxC2*、*C3* 間では、塩基配列が 71%、66%、アミノ酸配列では、75%、71% と相同性が低く、*C2* と *C3* では 63%、64% だった。他の植物ペルオキシダーゼとは約 30-50% の相同性しかなかった。遠位、近位ヒスチジン周辺以外にもよく保存された領域が存在した。また、遠位ヒスチジン (His42)、近位ヒスチジン (His170) 周辺の配列を微生物、植物由来のペルオキシダーゼ間で比較した。近位ヒスチジン付近は全体的に保存されていた。しかし、遠位ヒスチジン付近は植物間では保存されていたが、微生物のものは異なった。

第 3 章では、ペルオキシダーゼ遺伝子を大腸菌で発現させた。アイソザイム C をコードする cDNA (pSK1) とゲノム遺伝子を用いて、完全な前駆体型ペルオキシダーゼをコードする遺伝子を構築した。これを発現ベクター pKK223-3 に連結し (pKK-PER1)、大腸菌で発現を試みたが、酵素活性もタンパク質も検出できな

かった。オリゴヌレオチドを用いてリンカーを作成し、N末端エキストラペプチドを除いたペルオキシダーゼ遺伝子を構築した。発現ベクター pKK223-3 に連結し (pKK-PER4)、大腸菌で発現させた。酵素活性は認められなかったが、生合成されたタンパク質を、電気泳動的にも、抗ペルオキシダーゼ抗体を用いた免疫的にも検出することができた。顕微鏡観察では inclusion body 様の形態がみられ、大腸菌抽出液には不溶性画分に存在した。オリゴヌレオチドを用いた部位特異的変異操作により成熟型酵素のC末端の直後のコドン Leu を停止コドンに置換し、C末端エキストラペプチドを除去した。これを発現ベクター pKK223-3 に連結し (pKK-PER5)、大腸菌で発現させた。酵素活性は認められなかったが、免疫的にタンパク質が生合成されていることを確認した。しかし、inclusion body のような不溶性画分として存在した。

引用文献

- 1) Bergmeyer, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., Vol.3, 286 (1983)
- 2) Morita, Y., Iwamoto, H., Aibara, S., Kobayashi, T. and Hasegawa, E.: J. Biochem., 99, 761 (1986)
- 3) 細谷 東一郎 : 生化学, 47, 151 (1975)
- 4) Nakamura, M., Yamamoto, I., Ohtaki, S. and Nakamura, S.: J. Biol. Chem., 261, 13923 (1986)
- 5) Flohe, L., Gunzler, W. A. and Schok, H. H.: FEBS Lett., 32, 132, (1973)
- 6) Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A. and Loewen, P. C.: J. Bacteriol., 170, 4415 (1988)
- 7) Claiborne, A., Malinowski, D. P. and Fridovich, I.: J. Biol. Chem., 254, 11664 (1979)
- 8) Loprasert, S., Negoro, S. and Okada, H.: J. Gen. Microbiol., 134, 1975 (1988)
- 9) Poole, L. B. and Claiborne, A.: J. Biol. Chem., 261, 14525 (1966)
- 10) Yonetani, T. and Schleyer, H.: J. Biol. Chem., 241, 3240 (1966)
- 11) Libby, R. D., Thomas, J. A., Kaiser, L. W. and Hager, L. P.: J. Biol. Chem., 257, 5030 (1982)
- 12) Tien, M. and Kirk, T. K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 2280 (1984)
- 13) Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold, M. H.: Biochemistry, 27, 5365 (1988)
- 14) Rick, C. M., Zobel, R. W. and Fobes, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 835 (1974)
- 15) Mader, M.: Z. Pflanzenphysiol., 96, 283 (1980)
- 16) Shannon, L. M., Kay, E. and Lew, J. Y.: J. Biol. Chem., 241, 2166 (1966)
- 17) Mazza, G. and Welinder, K. G.: Eur. J. Biochem., 108, 481 (1980)
- 18) Endo, T.: Jpn. J. Genet., 56, 175 (1981)
- 19) Ainsworth, C. C., Johnson, H. M., Jackson, E. A., Miller, T. E. and Gale, M. D.: Theor. Appl. Genet., 69, 205 (1984)
- 20) Grison, R. and Pilet, P.-E.: Phytochemistry, 24, 2519 (1985)

- 21) Carlson, P. E., Smith, H. H. and Dearing, R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2292 (1972)
- 22) van Huystee, R. B.: Ann. Rev. Plant Physiol., 38, 205 (1987)
- 23) van Huystee, R. B. and Cairns, W. L.: Phytochemistry, 21, 1843(1982)
- 24) Kay, L. E. and Basile, D. V.: Plant Physiol., 84, 99 (1987)
- 25) van Huystee, R. B. and Cairns, W. L.: Bot. Rev., 46, 429 (1980)
- 26) Welinder, K. G. and Mazza, G.: Eur. J. Biochem., 73, 353 (1975)
- 27) van den Berg, B. M., Bianchi, F. and Wijsman, H. J. W.: Theor. Appl. Genet., 65, 1 (1983)
- 28) Welinder, K. G.: Eur. J. Biochem., 96, 483 (1979)
- 29) Tyson, H., Fieldes, M. A., Cheung, C. and Starobin, J.: Biochem. Genet., 23, 641 (1985)
- 30) Srivastava, O. P. and van Huystee, R. B.: Bot. Gaz., 138, 457 (1977)
- 31) Hoyle, M. C.: Plant Physiol., 60, 787 (1977)
- 32) Shih, J. H. C., Shannon, L. M., Kay, E. and Lew, J. Y.: J. Biol. Chem., 246, 4546 (1971)
- 33) Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M. and Morita, Y.: J. Biochem., 92, 531 (1982)
- 34) Aibara, S., Kobayashi, T. and Morita, Y.: J. Biochem., 90, 489(1981)
- 35) Braithwaite, A.: J. Mol. Biol., 106, 229 (1976)
- 36) Nakajima, R. and Yamazaki, I.: J. Biol. Chem., 262, 2576 (1987)
- 37) Mauk, M. R. and Griotti, A. W.: Biochemistry, 13, 1757 (1974)
- 38) Poulos, T. L. and Kraut, J.: J. Biol. Chem., 255, 8199 (1980)
- 39) Finzel, B. C., Poulos, T. L. and Kraut, J.: J. Biol. Chem., 259, 13027 (1984)
- 40) Edwards, S. L., Poulos, T. L. and Kraut, J.: J. Biol. Chem., 259, 12984 (1984)
- 41) Edwarda, S. L., Xuong, N.-H., Hamlin, R. C. and Karut, J.: Biochemistry, 26, 1503 (1987)
- 42) Welinder, K. G.: Eur. J. Biochem., 151, 497 (1985)
- 43) Marklund, S., Ohlsson, P.-I., Opara, A. and Paul, K.-G.: Biochi. Biophys. Acta., 350, 304 (1974)
- 44) Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K., Hayashi, U., Yajima, Y. and Inoue, H.: J. Chem. Technol. Biotechnol., 38, 31 (1987)

- 45) Sugita, M. and Gruissem, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7104 (1987)
- 46) Kuhlenmeier, C., Fluhr, R., Green, P. J. and Chua, N. H.: Genes Develop., 1, 247 (1987)
- 47) Green, P. J., Kay, S. A. and Chua, N. H.: EMBO J., 6, 2543 (1987)
- 48) Maniatis, T., Fritsh, E. F. and Sambrook, J.: Molecular Cloning, A laboratory manual
- 49) Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Gene, 33, 103 (1985)
- 50) Messing, J.: Methods in Enzymol., 101, 20 (1983)
- 51) Ohtuka, E., Taniyama, Y., Marumoto, R., Sato, H., Hirosaki, H. and Ikehara, M.: Nucleic Acids Res., 10, 2597 (1982)
- 52) Maxam, A. and Gilbert, W.: Methods in Enzymol., 65, 499 (1980)
- 53) Rigby, P. W. J., Diekmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: J. Mol. Biol., 113, 237 (1977)
- 54) Thomas, P. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 5201 (1980)
- 55) Gubler, U. and Hoffman, B. J.: Gene, 25, 263 (1983)
- 56) Hanahan, D.: J. Mol. Biol., 166, 557 (1983)
- 57) Southern, E. M.: J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)
- 58) Jeffreys, A. J. and Flavell, R. A.: Cell, 12, 429 (1977)
- 59) Birnboim, H. C. and Doly, J.: Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)
- 60) Bazaral, M. and Helinski, D. R.: J. Mol. Biol., 36, 185 (1968)
- 61) Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972)
- 62) Welinder, K. G. and Smillie, L. B.: Can. J. Biochem., 50, 63 (1972)
- 63) Clarke, J. and Shannon, L. M.: Biochi. Biophys. Acta., 427, 428 (1976)
- 64) Bethesda Research Laboratories Inc.
- 65) Frischauf, A. M., Lehrach, H., Puostka, A. and Murray, N.: J. Mol. Biol., 170, 827 (1983)
- 66) Blin, N. and Stafford, D. W.: Nucleic Acids Res., 3, 2303 (1976)
- 67) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: Anal. Biochem., 137, 266 (1984)
- 68) Membrane transfer and detection methods, Amersham.
- 69) Joshi, C. P.: Nucleic Acids Res., 15, 6643 (1987)
- 70) Kozak, M.: Cell, 44, 283 (1986)
- 71) Lutcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F., and Scheele, G. A.: EMBO J., 6, 43 (1987)

- 72) Murray, E. E., Lotzer, J. and Eberle, M.: *Nucleic Acids Res.*, 17, 477 (1989)
- 73) Rodriguez, R. L.: 私信
- 74) Hanley, B. A. and Schuler, M. A.: *Nucleic Acids Res.*, 16, 7159 (1988)
- 75) Jacob, M. and Gallinaro, H.: *Nucleic Acids Res.*, 17, 2159 (1989)
- 76) van Santen, V. L. and Spritz, R. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 9094 (1987)
- 77) Sakurada, J., Takahashi, S. and Hosoya, T.: *J. Biol. Chem.*, 261, 9657 (1986)
- 78) Lagrimini, L. M., Burkhard, W., Moyer, M. and Rothstein, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 7542 (1987)
- 79) Roberts, E., Kutchan, T., and Kolattukudy, P. E.: *Plant Mol. Biol.*, 11, 15 (1988)
- 80) Kaput, J., Goltz, S. and Blobel, G.: *J. Biol. Chem.*, 257, 15054 (1982)
- 81) Tien, M. and Tu, C.-P. D.: *Nature*, 326, 520 (1987)
- 82) de Boer, H. A., Zang, Y. Z., Collins, C. and Reddy, C. A.: *Gene*, 60, 93 (1987)
- 83) Loprasert, S., Negoro, S. and Okada, H.: *J. Bacteriol.*, in press (1989)
- 84) Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. and Orcutt, B. C.: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, ed. Dayhoff, M. O., Vol.5, Suppl.3, 345 (1978)
- 85) Slightom, J. L., Drong, R. F., Klassy, R. C. and Hoffman, L. M.: *Nucleic Acids Res.*, 13, 6483 (1985)
- 86) Go, M.: *Nature*, 291, 90 (1981)
- 87) Roberts, E. and Kolattukudy, P. E.: *Mol. Gen. Genet.*, 217, 223 (1989)
- 88) Dennis, E. S., Sachs, M. M., Gerlach, W. L., Finnegan, E. J. and Peacock, W. J.: *Nucleic Acids Res.*, 13, 727 (1985)
- 89) Khursheed, B. and Rogers, J. C.: *J. Biol. Chem.*, 263, 18953 (1988)
- 90) Gilbert, W.: *Nature*, 271, 501 (1978)
- 91) Wolter, F. P., Fritz, C. C., Willmitzer, L., Schell, J. and Schreier, P. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 846 (1988)
- 92) Karlin-Neumann, G. A. and Tobin, E. M.: *EMBO J.*, 5, 9 (1986)

- 93) Wasmann, C. C., Reiss, B. and Bohnert, H. J.: J. Biol. Chem., 263, 617 (1988)
- 94) Zhang, B. R., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano, M.: Ann. Rep. of ICBiotech., 10, 151 (1987)
- 95) Schloss, P., Walter, P. and Mader, M.: Planta, 170, 225 (1987)
- 96) Shinshi, H., Wenzler, H., Neuhaus, J.-M., Felix, G., Hofsteenge, J. and Meins, F., Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5541 (1988)
- 97) Ray, J., Knapp, J., Grierson, D., Bird, C. and Schuch, W.: Eur. J. Biochem., 174, 119 (1988)
- 98) Edens, L., Heslinga, L. Klok, R., Ledebor, A. M., Maat, J., Toonen, M. Y., Visser, C. and Verrips, C. T.: Gene, 18, 1 (1982)
- 99) Bowles, D. J., Marcus, S. E., Pappin, D. J. C., Findlay, J. B. C., Eliopoulos, E., Maycox, P. R. and Burgess, J.: J. Cell Biol., 102, 1284 (1986)
- 100) Raikhel, N. V. and Wilkins, T. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 6745 (1987)
- 101) Sheehy, R. E., Pearson, J., Brady, C. J. and Hiatt, W. R.: Mol. Gen. Genet., 208, 30 (1987)
- 102) van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., van Montagu, M. and Vandekerckhove, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2673 (1989)
- 103) Gould, S. J., Keller, G.-A. and Subramani, S.: J. Cell Biol., 107, 897 (1988)
- 104) Munro, S. and Pelham, H. R. B.: Cell, 48, 899 (1987)
- 105) Blanke, S. R. and Hager, L. P.: J. Biol. Chem., 263, 18739 (1988)
- 106) Mullenbach, G. T., Tabrizi, A., Irvine, B. D., Bell, G. I., Tainer, J. A. and Hallenwell, R.: Protein Engineering, 2, 239 (1988)
- 107) Kulia, D., Tien, M., Free, J. A. and Ondrias, M. R.: Biochemistry, 24, 3394 (1985)
- 108) Fishel, L. A., Villafranca, J. E., Mauro, J. M. and Kraut, J.: Biochemistry, 26, 351 (1987)
- 109) Goodin, D. B., Mauk, A. G. and Smith, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 1295 (1986)
- 110) Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system, Amersham.
- 111) Amann, E., Brosius, J. and Ptashne, M.: Gene, 25, 167 (1983)
- 112) Laemmli, U. K.: Nature, 227, 680 (1970)

- 113) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 4350 (1979)
- 114) Taylor, J. W., Ott, J. and Eckstein, F.: Nucleic Acids Res., 13, 8764 (1985)
- 115) Muraki, M., Jigami, Y., Tanaka, H., Harada, N., Kishimoto, F., Agui, H., Ogino, S. and Nakasato, S.: Agric. Biol. Chem., 50, 713 (1986)
- 116) Trigss-Raine, B. L. and Loewen, P. C.: Gene, 52, 121 (1987)
- 117) Ikemura, T. and Ozeki, H.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 1087 (1983)
- 118) Nilsson, B., Abrahmsen, L. and Uhlen, M.: EMBO J., 4, 1075 (1985)
- 119) Utsumi, S., Kim, C.-S., Sato, T. and Kato, M.: Gene, 71, 349 (1988)
- 120) Gatenby, A. A., van der Vies, S. M. and Rothstein, S. J.: Eur. J. Biochem., 168, 227 (1987)
- 121) Chung, C. H. and Goldberg, A. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 4931 (1985)
- 122) Unger, B. P., Gunsalus, I. C. and Sligar, S. C.: J. Biol. Chem., 261, 1158 (1986)
- 123) Tessier, L.-H., Sondermeyer, P., Faure, T., Dreyer, D., Benavente, A., Villeval, D., Courtney, M. and Lecocq, J.-P.: Nucleic Acids Res., 12, 7663 (1984)
- 124) Cannistraro, V. J., Subbarao, M. N. and Kennell, D.: J. Mol. Biol., 192, 257 (1986)
- 125) Williams, D. C., van Frank, R. M., Muth, W. L. and Burnett, J. P.: Science, 215, 687 (1982)
- 126) Gatenby, A. A., Boccara, M., Baulcombe, D. C. and Rothstein, S. J.: Gene, 45, 11 (1986)
- 127) Moore, R. E., Davies, M. S. D., O'Connell, K. M., Harding, E. I. H., Wiegand, R. C. and Tiemeier, D. C.: Nucleic Acids Res., 14, 7227 (1986)
- 128) Laemmli, U. K., Beguin, F. and Gujer-Kellenberger, G.: J. Mol. Biol., 47, 69 (1970)
- 129) Schoemaker, J. M., Brasnett, A. H. and Marston, F. A. O.: EMBO J., 4, 775 (1985)
- 130) 横尾 義春 : BIO INDUSTRY, 3, 48 (1986)

- 131) Taylor, G., Hoare, M., Gray, D. R. and Marston, F. A. O.: Bio Technology, 4, 553 (1986)
- 132) Mitraki, A. and King, J.: Bio Technology, 7, 690 (1989)
- 133) Winkler, M. E., Blaber, M., Bennett, G. L., Holmes, W. and Vehar, G. A.: Bio Technology, 3, 990 (1985)
- 134) Dodson, G., Hubbard, R. E., Oldfield, T. J., Smerdon, S. J. and Wilkinson, A.: Protein Engineering, 2, 233 (1988)
- 135) Goff, C. G., Moir, D. T., Kohno, T., Gravis, T. C., Smith, R. A., Yamasaki, E. and Taunton-Rigby, A.: Gene, 27, 35 (1984)
- 136) Schein, C. H. and Noteborn, M. H. M.: Bio Technology, 6, 291 (1988)

本論文に関係のある報告

1. Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes.

Kazuhito Fujiyama, Hiroshi Takemura, Shiro Shibayama,
Kazuo Kobayashi, Jong-Kyu Choi, Atuhiko Shinmyo,
Mituo Takano, Yasuyuki Yamada and Hirosuke Okada

Eur. J. Biochem., 173, 681-687 (1988)

2. Structure of genomic DNA of hoseradish peroxidase gene family

Kazuhito Fujiyama, Hiroshi Takemura, Atuhiko Shinmyo,
Hirosuke Okada and Mituo Takano

in submitted to the Gene

3. Expression of horseradish peroxidase gene in Escherichia coli

Kazuhito Fujiyama, Atuhiko Shinmyo and Hirosuke Okada

in preparation

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始御指導を賜りました岡田弘輔教授に心より御礼申し上げます。本論分の作製にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました大嶋泰治教授、山田靖宙教授、高野光男教授、菅健一教授、二井將光教授、吉田敏臣教授、今中忠行教授に感謝の意を表します。

本研究に対し、直接懇切なる御指導を賜りました新名惇彦助教授、有益な御助言と激励の言葉を頂きました卜部格助教授、木下晋一助教授、根来誠司博士、岡田尚輔博士、島康文氏に深く感謝致します。また、御援助賜りました、関達治助教授、岸本通雅博士、沢住文子様、藤田綾子様に謹んで御礼申し上げます。さらに、西洋ワサビ培養細胞を御分与して頂くなど本研究の便宜を図って頂きました京都大学農学部山田康之教授に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として御協力頂きました柴山史朗氏（現、小野薬品株式会社）、小林和男氏（現、キリンビール株式会社）、竹村浩史氏（現、株式会社中埜酢店）、中原宏氏（大阪大学大学院）、催宗圭氏（現、味元食品株式会社）に心より感謝の意を表します。本研究の便宜を図って頂きました東洋紡績株式会社の皆様に感謝致します。また岡田研究室に於て有益な助言を頂きました森山英明博士（現、熊本工業大学）、牧野泰孝博士（現、小野薬品株式会社）ほか、岡田研究室及び生物工学国際交流センターの皆様に感謝致します。さらに、公私にわたり有益な助言と激励を頂きました福島康裕氏（現、日東電気工業株式会社）、神崎直之氏（現、武田薬品株式会社）に感謝します。

最後に本研究の遂行に際して、激励していただいた方並びに援助していただいた両親に感謝します。