

305

キュウリ果皮細胞の液体培養によるアスコルビン酸酸化酵素の分泌生産

(大工 醗 酵) ○ 趙 鉉 濟, 会 見 忠 則, 室 岡 義 勝

1. 目的 キュウリの果皮に高い活性を有しているアスコルビン酸酸化酵素 (E.C.1.10.3.3. 以下 A O D と略す) は、アスコルビン酸に特異的な酵素であるため、アスコルビン酸の定量などの食品分析や臨床用試薬として広く用いられている。本研究では、A O D を効率的に生産する目的でキュウリ果皮細胞の培養を行なって、A O D の生成と分泌について、種々な培地条件の検討をした。

2. 方法 キュウリ果皮組織を、MURASHIGE-SKOOG 培地を基本培地としてカルス培養化しカルスの増殖速度、および A O D 活性を測定した。植物ホルモンは、オーキシンとして 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid、サイトカイニンとして 6-Benzylaminopurine を用いた。

3. 結果 これまでの研究で、キュウリ果皮細胞をカルス化すると、A O D 活性は、脱分化カルス誘導の過程で低下し、その約 1 / 10 以下となったが、培地中の C u イオン濃度を変えると A O D 活性はこれに対応して変化し、C u イオン濃度を 10 μ M に上げた条件で、新鮮キュウリ果皮組織の A O D 活性の約 1 / 2 まで回復することができた。また、カルスの移植中に増殖のよい変異カルス C H - 2 株が分離でき、さらに、液体培養での A O D 活性に与える種々な培地条件について検討したところ、A O D が分泌性酵素であることが分かった。培地に 30 m M の C a C l₂ を添加すると、培地中の A O D 活性が著しく増加し、無添加の培地より約 8 倍の A O D 活性が得られた。エアリフト型の培養槽を用いたところ、増殖速度及び A O D 分泌生産性がさらに向上した。

Secretory production of ascorbate oxidase from cucumber tissue culture
 ○ Hyeon-je Cho, Tadanori Aimi and Yoshikatsu Murooka
 Dept. of Ferment. Technol., Faculty of Engineering, Hiroshima University

306

キュウリ アスコルビン酸オキシダーゼの遺伝子構造と組織特異的発現

(阪 大 工 醗 酵) ○ 大 川 淳、Wimolsiri Porntaveewat、大屋智資
 岡田尚輔、新名惇彦、高野光男

目的) アスコルビン酸オキシダーゼ (A S O) は、植物、特にウリ科植物の果皮に多く存在する。我々は、既にキュウリ (*Cucumis sativus*) 果実の精製 A S O より決定した N 末端部アミノ酸配列をもとに作成した合成ヌクレオチドをプローブに用い、キュウリ果実 c D N A ライブラリーから A S O c D N A を単離した¹⁾。本研究では、この c D N A を用いてキュウリ植物体 (果実部、根部、茎部、葉部) での A S O の発現を調べる事を目的とした。

方法) 供試植物体 (果実に関しては、開花後 3 週間程度) よりグアニジウムチオシアネート / C s C l 密度勾配遠心法を用いて、各組織別に R N A を抽出し、A S O c D N A (2.2 k b p) をプローブとした Northern-blot 法により A S O の発現を調べた。

結果) 果実部からの R N A には強くハイブリダイズするバンドが一本見出されたが、他の組織のものでは弱かった。これらのバンドは全て同一の大きさで、約 2.3 k b であった。一方、キュウリ果実より抽出したゲノム D N A を *EcoRI* で完全分解したものに対して、同じ c D N A をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、やはり一本のバンドのみが認められた。これらのことは A S O は遺伝子的には一種類のみであることを示唆している。現在、この事を確かめるために A S O のゲノム D N A のクローニングを行っている。

1) 大川ら：日本農芸化学会昭和 63 年度大会講演要旨集 P182

Structure and tissue specific expression of cucumber ascorbate oxidase

○ Jun Ohkawa, Wimolsiri Porntaveewat, Tomoshi Ohya, Naoske Okada, Atsuhiko Shinmyo Mitsuo Takano (Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565)