

氏名	こえづか たかお 肥 塚 崇 男
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第377号
学位授与年月日	平成17年 3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on Oxylipin Aldehyde Forming Enzymes in Cereals (穀類におけるオキシリピンアルデヒド生成酵素に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 梶原忠彦 (副査) 木村靖夫 北本 豊 松井健二 横田一成

## 学位論文の内容の要旨

オキシリピンアルデヒドは苔類や海藻を含め植物界に広く分布していることが知られている。しかしながら、オキシリピンアルデヒドの生理的役割は未だ判然としておらず、特にイネやムギなど、世界的重要穀類におけるオキシリピンアルデヒドに関する報告はほとんどない。そこで、本研究では穀類オキシリピンアルデヒドの反応機構及び生理機能解明の一端として、オオムギ脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ (HPL)のクローニングとイネ脂肪酸 $\alpha$ 酸素添加酵素 ( $\alpha$ -DOX)の発現機構並びに活性化シグナル経路の解析を行った。

第1章では、オキシリピンアルデヒドの一つである短鎖アルデヒド生成酵素、HPL をオオムギからクローニングした。著者はオオムギ EST ライブラリーよりシロイヌナズナ HPL と相同性の高いクローンを見つけ出し、このものをプローブとして、ソルビトール処理したオオムギ実生由来の cDNA ライブラリーに対するプラークハイブリライゼーションによりオオムギの全長 HPL cDNA をクローニングした。大腸菌で発現させた組換えオオムギ HPL はリノール酸、リノレン酸 13-ヒドロペルオキシドと特異的に反応し、それらの 9-ヒドロペルオキシドを基質としなかった。このオオムギ HPL は反応溶液中の塩もしくは可溶化剤の存在により酵素活性が著しく増加した。さらに、 $V_{max}$  値を含めた反応速度や自己失活速度が高まった。この結果から塩や可溶化剤が HPL の立体構造変化を引き起こし、基質結合能と酵素活性が改変されたと考えられた。この結果はオオムギ HPL だけでなく、ピーマン HPL においても同様に観察され、HPL において普遍的現象であると推測された。

第2章では、もう1つのオキシリピンアルデヒドである長鎖アルデヒドの生成に関与する酵素、 $\alpha$ -DOX の発現プロファイル並びに活性化シグナル経路をイネ幼葉において精査した。

長鎖アルデヒドを生成する  $\alpha$ -DOX は植物界に広く分布し、これら植物体においては昆虫による食害や病原菌の曝露、酸化ストレスなどにより誘導されることが知られている。しかしながら、その詳細な活性化シグナル経路は判然としない。そこで、イネ幼葉を用い、 $\alpha$ -DOX 発現を精査した結果、イネ  $\alpha$ -DOX は他の植物種で報告されている  $\alpha$ -DOX と同様に病原菌によって誘導されるが、病原菌の親和性、非親和性による誘導パターンに違いはなく、圃場抵抗性に関与していることが示唆された。また、酸化ストレスや重金属ストレスによってもイネ  $\alpha$ -DOX 遺伝子は蓄積し、その発現はジャスモン酸によって正に制御され、エチレンによって負に制御される傾向が見られた。そこで、ストレス処理下でのイネ植物体の内在性ジャスモン酸量を測定したところ、イネ  $\alpha$ -DOX は内在性ジャスモン酸量に依存して発現しており、このことからイネ  $\alpha$ -DOX の誘導にはジャスモン酸が強く関与していることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

近年、脂肪酸から酸化的に代謝されて生成する低分子量の多彩なオキシリピナルデヒド類が、苔類や海藻を含め植物界に広く分布していることが明らかになり、これら揮発成分の生合成メカニズムや生理的役割についての研究が盛んになっている。特に、前者の生合成研究は、大きく進展している。それに比して、後者のオキシリピナルデヒド類の生理的役割については、魅力ある課題でありながら、まだ情報量も乏しく、殆ど明らかにされていなかった。特にイネやムギなどは、食糧として世界的に重要な穀類であるにもかかわらず、それらの揮発性オキシリピナルデヒド類の生理活性や生理的役割に関する研究報告は殆ど見られなかった。

そこに着目し、本研究では、穀類オキシリピナルデヒドの生理機能解明のために欠くことのできない一連の研究として、オオムギの短鎖オキシリピナルデヒド生成に必須の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ(HPL)のクローニング及び、イネの長鎖オキシリピナルデヒド生成酵素である脂肪酸  $\alpha$  酸素添加酵素( $\alpha$ -DOX)のストレス条件下での発現機構並びに活性化シグナル経路の解析を行い、オキシリピナルデヒドの生理機能解明上、極めて重要な新知見が得られている。

①：申請者は、まずオオムギ EST ライブラリーよりシロイヌナズナ HPL と相同性の高いクローンを見出し、このものをプローブとしてソルビトール処理したオオムギ実生由来 cDNA ライブラリーに対するプラークハイブリライゼーションによりオオムギの全長 HPL cDNA をクローニングした。次いで、大腸菌で発現させた組換えオオムギ短鎖アルデヒド生成酵素、HPL を用いて、基質特異性を詳細に検討し、リノール酸、リノレン酸 13-ヒドロペルオキシドと特異的に反応し、それらの 9-ヒドロペルオキシド異性体は基質としないなど本酵

素の基質特異性は狭いことを明らかにした。他方、本 HPL は反応溶液中の塩あるいは、可溶化剤の存在により酵素活性が著しく増加することを見出した。さらに、この原因は、自己失活速度や  $V_{max}$  値を含めた反応速度が高まることなどから、塩や可溶化剤によって HPL の立体構造が変化し、基質結合能と酵素活性が改変されたことによると推定した。また、この現象はオオムギ HPL のみならず、ピーマン HPL においても観察されることなどから、HPL において普遍的に起こり、ここで得られた知見は普遍的であると推測している。

②：海産緑藻の主要揮発成分として、申請者が所属している研究室で発見された長鎖オキシリピナルデヒド（長鎖アルデヒド）が、後に広く植物界に分布し、昆虫などによる食害や酸化ストレスなどにより、その生成に関与する鍵酵素、 $\alpha$ -DOX（ジオキシゲナーゼ）が誘導されることが報告された。この論文では、さらに興味ある新知見がそれらに加えられた。先ずイネ幼葉を用いて、長鎖オキシリピナルデヒド（長鎖アルデヒド）生成酵素、 $\alpha$ -DOX の発現プロファイル並びに活性化シグナル経路を検討したが、その詳細な活性化シグナル経路の解明に至らなかった。しかし、イネ幼葉での  $\alpha$ -DOX の発現を精査することによって、イネ  $\alpha$ -DOX は、他の植物種で報告されている  $\alpha$ -DOX と同様に病原菌曝露によって誘導される。しかし、曝露した病原菌の親和性、非親和性による誘導パターンには相違は見られず、圃場抵抗性に関与していることを明らかにした。更に、酸化ストレスや重金属ストレスによってもイネ  $\alpha$ -DOX 発現は蓄積し、その発現はジャスモン酸によって正に制御され、エチレンによって負に制御されていることを見出した。さらに、ストレス処理下でのイネ植物体の内在性ジャスモン酸量を測定することによって、イネ  $\alpha$ -DOX は内在性ジャスモン酸量に比例して発現し、イネ  $\alpha$ -DOX の誘導にはジャスモン酸が強く関与していることを解明することに成功している。

このように、本研究は、この関連分野の研究を展開する上で欠くことのできないものであり、学問的に高く評価される。また、ここに得られた新知見は、穀類を原料とする食品加工・製造などの応用面からも重要であり、学位論文として十分価値あるものと判定した。