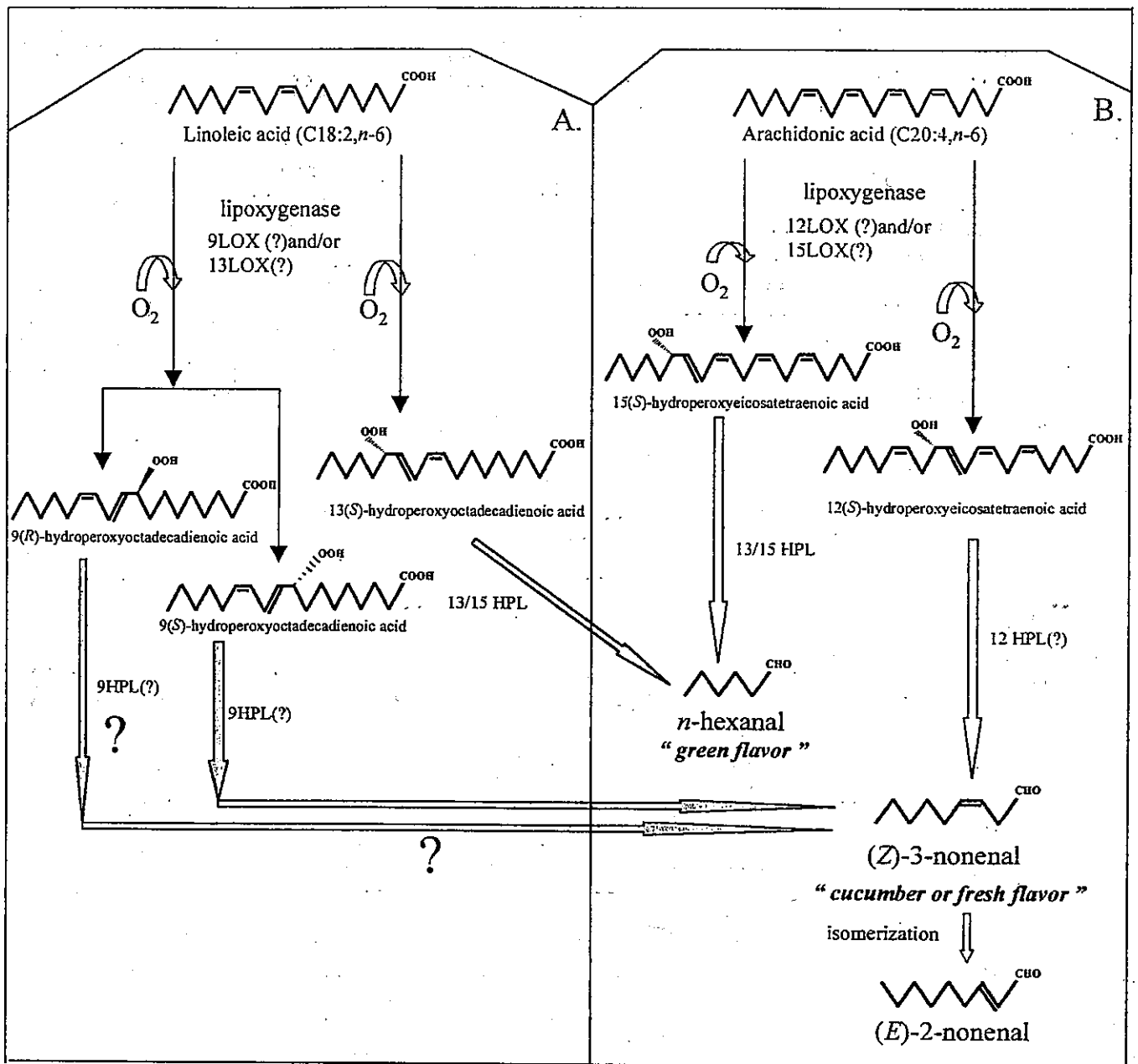




crude enzyme and linoleic acid, the increase of *n*-hexanal but not of nonenal could be observed. This indicated that 13 hydroperoxy linoleic acid was formed as an intermediate. In order to clarify this hypothesis, the couple reaction of glutathione peroxidase with the reaction of crude enzyme from homogenated fronds and linoleic acid was performed. In the couple reaction, Glutathione peroxidase would reduce hydroperoxides which were released from reaction of the algal enzyme to their corresponding hydroxides. After that, hydroxy isomers were purified and the structures and stereochemistries were elucidated as for 13(*S*)hydroperoxy linoleic acid ( $\geq 99\%$  *e.e.*) and 9(*R*)hydroperoxy linoleic acid ( $\geq 30\%$  *e.e.*). The ratio of 13 to 9 isomer of hydroperoxy linoleic acid was 88 to 12. It was proved that hydroperoxy linoleic acid isomer was formed as the intermediate. In addition, product specificity of algal lipoxygenase(s) to form 13 hydroperoxy isomer was shown to be higher than that for 9 hydroperoxy isomer. Partially purified enzyme was used to establish the substrate specificity of fatty acid hydroperoxide lyase (HPL) in the alga. Among hydroperoxides of linolenic acid, linoleic acid and arachidonic acid, 15(*S*) hydroperoxy arachidonic acid was shown to be the effective substrate for *n*-hexanal formation as well. When partially purified enzyme was incubated with 13 (*S*) hydroperoxy linoleic acid, the increase of *n*-hexanal formation was found. This suggested *n*-hexanal formation from linoleic acid was accomplished through formation of 13 (*S*) hydroperoxy linoleic acid. By surveying various species of marine algae including Phaeophyta, Rhodophyta and Chlorophyta it was shown that almost all the marine algae have 13 HPL activity. Thus, a wide distribution of the enzyme was expected.

From chapter 2, it was expected that arachidonic acid can be converted into, both C6 and C9 aldehydes, thus, in chapter 4 the author assumed that C6 and C9 aldehydes were formed from arachidonic acid *via* formation of 12- and 15-hydroperoxy arachidonic acids by lipoxygenase/fatty acid hydroperoxide lyase. By adding glutathione peroxidase to the reaction mixture of crude enzyme with arachidonic acid, the decrease of C6 and C9 formation and the concomitant increase of the hydroperoxides were found. This suggested that the hydroperoxy arachidonic acids were the intermediates of the pathway. Their chemical structures were analyzed by a reversed phase HPLC and by GC/GC-MS. Stereochemistries of hydroperoxy arachidonic acids were identified to be 12 (*S*) hydroperoxyeicosatetraenoic acid and 15(*S*)hydroperoxyeicosatetraenoic acid with  $\geq 99\%$  *e.e.*

In conclusion, the metabolic pathways to form *n*-hexanal and (*E*)-2- and (*Z*)-3-nonenal in “Kombu” were revealed to start from linoleic acid and arachidonic acid, respectively, like higher plants and animals through lipoxygenase/fatty acid hydroperoxide lyase system with specific positional and enantiomeric selectivity. This has been proposed in a figure as follows.



The proposed pathway for the metabolism of linoleic acid and arachidonic acid mediated C6, (*n*-hexanal) and C9, [(*Z*)-3-nonenal and (*E*)-2-nonenal] branch of oxylipin pathway in brown alga, "*Kombu*" *L. angustata*

- LOX : Lipoygenase
- HPL : Fatty acid hydroperoxide lyase
- ⇒ Minor pathway
- ⇒ Major pathway
- ? ⇒ Minor pathway with unclarifying because there is no evidences for substrate specificity of HPL occurs in any organisms for the reference

## 論文審査の結果の要旨

近年、食生活の高級化、健康食品への関心の高まりに伴って、海藻食の効用が見直されつつある。なかでも、食用としてのコンブの歴史は 2000 年にも及び、海産褐藻コンブ (*Laminaria*) はその特徴的なフレーバーや食感のため、日本や一部のアジア諸国で食材として広く使われてきた。しかし、そのフレーバーに最も寄与している C6-及び C9-アルデヒドなどの短鎖アルデヒド生成経路の詳細はまだ不明であった。本論文では、コンブにおけるこれら短鎖アルデヒド生成系代謝経路を明らかにするとともに、高等植物に於けるそれらの生合成経路との相違点をはじめて明らかにしたものである。

①SDE 法及び SPME 法により、磨砕した藻体で生成された揮発性化合物組成を解析した。その結果、(*E*)-2-nonenal などの C9-アルデヒドが主要な揮発成分として、少量の C6-アルデヒドとともに生成することが分かった。そこで、この磨砕液に種々の脂肪酸を添加することによって、C9-アルデヒドはアラキドン酸からのみ生成し、それとは対照的に C6-アルデヒドはアラキドン酸、リノール酸からほぼ同程度に生成することが明らかにされた。

②リノール酸を添加した時、*n*-hexanal の生成のみが見られ、nonenal 類の生成は確認されなかった。また、生合成中間体と予想される、脂肪酸ヒドロペルオキシドを還元するためグルタチオン・グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH/GSHpx) を反応液に添加すると、リノール酸からの *n*-hexanal 生成が抑制され、同時に 2 種の脂肪酸ヒドロキシドの蓄積が確認された。また、それらは、リノール酸 13-(*S*)-ヒドロキシド (光学純度 99%) とリノール酸 9-(*S*)-ヒドロキシド (光学純度 30%) であり、その生成比は 88:12 であることから、リノール酸 13-(*S*)-ヒドロペルオキシドがリノール酸からの *n*-hexanal 生成 の中間体であることが示唆された。一方、コンブ粗酵素からヒドロペルオキシド開裂酵素 (HPL) を部分精製し、その基質特異性を精査した。その結果から、リノール酸 13-ヒドロペルオキシドが最も良い基質で、次いでアラキドン酸 15-ヒドロペルオキシドが良い基質となることが明らかにされた。他方、本酵素活性の分布を、日本沿岸、及びタイで採取された海藻について調べたところ、全ての海藻に活性が検出され、海産藻類に広く分布していることも明らかになった。

③アラキドン酸を GSH/GSHpx とともにコンブ粗酵素液を含む反応液に添加すると、両アルデヒド生成が抑制され、同時にアラキドン酸ヒドロキシドの蓄積が確認された。また、蓄積されたヒドロキシドはアラキドン酸 12-(*S*)-ヒドロキシド (光学純度 99%以上) とアラキドン酸 15-(*S*)-ヒドロキシド (光学純度 99%以上) であったことから、コンブにはアラキドン酸 15-、及び 12-リポキシゲナーゼ (LOX) が存在し、生成したアラキドン酸 15-ヒドロペルオキシドは HPL により開裂されて *n*-hexanal へ、アラキドン酸 12-ヒドロペルオキシドは(*E*)-2-nonenal へ各々に変換されることが明らかとなった。

このように、海産褐藻コンブには高等植物に見られるようなリポキシゲナーゼ (LOX)、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ (HPL) 経路が存在し、この経路によって揮発性アルデヒドが生成していることが明らかとなった。また、高等植物のアルデヒド生成経路はリノール酸などの C18-脂肪酸に特異的であり、C9-アルデヒドは脂肪酸 C9-ヒドロペルオキシドから生成されるが、コンブのアルデヒド生成系ではアラキドン酸が最も良い基質となり、C9-アルデヒドは C18-脂肪酸 9-ヒドロペルオキシドではなく、アラキドン酸 12-ヒドロペルオキシドから生成されているという極めて特徴的な高等植物におけるそれとの相違点を見出すことができた。

このように、本研究は、生物界における短鎖アルデヒド生成経路の進化に重要な示唆を与えるなど、植物化学、天然物化学、生物有機化学、生化学など学問的観点から評価されるのみならず、我が国における重要な食材であるコンブなどの海藻のフレーバー特性向上や、フレーバー生産及び海藻食品加工のための基礎的な知見を与えるもので、応用面からも高く評価される。また、ここで得られた知見

は、この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、学位論文として十分価値あるものと判定した。