

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Darika Kongrit
審査委員	主査 横田 一成 (印)
	副査 地阪 光生 (印)
	副査 松井 健二 (印)
	副査 長屋 敦 (印)
	副査 山野 好章 (印)
題目	Characterization of allene oxide synthases of potato and soybean (ジャガイモおよび大豆のアレンオキシド合成酵素の解析)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>アレンオキシド合成酵素 (AOS) は、脂肪酸ヒドロペルオキシドをエポキシ体であるアレンオキシドに変換する酵素である。本酵素は、多価不飽和脂肪酸に由来する一連の生理活性物質 (オキシリピン) の生合成系における主要な酵素である。植物におけるこの生合成系の初発反応は、リポキシゲナーゼ (LOX) による、リノール酸 (LA) または <math>\alpha</math>-リノレン酸 (LNA) の 9S 位または 13S 位へのヒドロペルオキシ基の付加反応である。この 9S 位または 13S 位への反応は、通常、各々に特異的な LOX、すなわち 9-LOX および 13-LOX により触媒される。ここで生成する各脂肪酸ヒドロペルオキシドが、各種オキシリピン生合成系への分岐点となる。主要なオキシリピンであるジャスモン酸 (JA) の生合成系は、LNA の 13S-ヒドロペルオキシドに AOS が作用することで他の 13-LOX 反応系でから分岐する。JA は植物に普遍的に存在すると考えられているため、13-LOX 系もまたすべての植物に普遍的に存在すると考えられている。一方、9-LOX 系では、JA に相当するような、植物にとり普遍的な重要性を持つオキシリピンの存在は未だ不明であり、事実、すべての植物で明確に検出されているわけではない。しかしながら、ジャガイモ、トマト、および米等、9-LOX を顕著に発現している植物が存在し、これらの植物における 9-LOX 系の生理的意義の解明は、植物生理学上の重要な課題である。本学位論文では、重要な作物であり、また、主要な実験用植物でありながら、各々に特徴的な AOS の詳細が不明であったジャガイモおよび大豆の AOS をクローニングし、その性質を詳細に解析を行っている。</p> <p>ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) の芽の cDNA より新規 AOS をクローニングし、本酵素が 491 アミノ酸から構成され、分子量は 55,532 であること、また、CYP74C サブファミリーに属することを明らかにした。さらに、本酵素の酵母での高発現と活性の確認に成功し、本酵素が、LA の 9S-ヒドロペルオキシド (9-HPOD) 選択的であることを解明した。また、蕾、花、茎および芽で mRNA が発現していることを解明した。これらの成果は、ジャガイモの生理におけるオキシリピンの機能を解析するうえで、重要な基礎情報である。とりわけ興味深いのは、本酵素と 9-HPOD との反応で生成する <math>\alpha</math>-ケトールの立体配置の分析である。脂肪酸の S 型ヒドロペルオキシドと AOS との反応で生成するアレンオキシドは速やかに加水分解を受け、<math>\alpha</math>-ケトール、<math>\gamma</math>-ケトールおよびオキソフトジエン酸の混合物を与える。<math>\alpha</math>-ケトールが主生成物で、その立体異性体組成は、概ね R 体 : S 体 = 7 : 3 である。しかしながら、本酵素と 9-HPOD との反応で生じる <math>\alpha</math>-ケトールは R 体が 90% を占めることが示された。<math>\alpha</math>-ケトールの一般的な生理的意義は不明だが、ウキクサにおいては LNA の 9S-ヒドロペルオキシドに由来する R-<math>\alpha</math>-ケトールが花芽誘導因子として働く。本酵素が 9-HPOD からの R 型 <math>\alpha</math>-ケトールの生成に</p>	

有利に働くことは、ジャガイモの生理を考えるうえで、非常に興味深い知見である。

現在、少なくとも8種類の LOX が大豆 (*Glycine max*) で検出されているが、LOX 反応の下流で働く他のオキシリピン生合成系関連酵素の情報はほとんどなく、大豆の生理を解析するための基礎情報が不足している。本論文では、大豆の AOS に着目し、葉の cDNA より新規 AOS 2 種 (GmAOS1 および GmAOS2) をクローニングし、さらに、大腸菌内での高発現化に成功した。構造遺伝子配列から、GmAOS1 は 524 アミノ酸から構成され、分子量は 58,875 であること、一方、GmAOS2 は 519 アミノ酸から構成され、分子量は 58,318 であること、また、ともに CYP74A サブファミリーに分類されることを示した。また、GmAOS2 遺伝子は既知の AOS 遺伝子と同様に 1 エキソンからなるが、GmAOS1 遺伝子はイントロンを 1 つ含むことを解明した。これは、イントロンを持つ AOS 遺伝子の初めての例である。GmAOS1 および GmAOS2 はいずれも 13-ヒドロペルオキシドに選択的であること、さらに、13-HPOT に対する両者のミカエリス定数が大きく異なること (GmAOS1,  $K_m 1.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ; GmAOS2,  $K_m 10 \pm 2.8 \mu\text{M}$ ) を突き止め、両者の機能する生理的環境が異なりうることを示唆した。また、GmAOS1 および GmAOS2 の mRNA が、葉、茎および根と広い範囲で発現していることを示した。

このように、本学位論文は、ジャガイモおよび大豆のアレンオキシド合成酵素の構造と機能に関する重要な基礎的知見を多く含んでおり、これら主要かつ重要な植物の生理の解明を進めるうえで大きく貢献することは間違いなく、学位論文に十分値するものと判定した。