

氏 名	みず たに ゆ き こ 水 谷 由 記 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1186 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Activity Control of Plant Lipoygenases in Lipid Dispersions (脂質分散系における植物リポキシゲナーゼの活性制御に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 友 彦 教 授 松 野 隆 一 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

リポキシゲナーゼ (EC 1. 13. 11. 12) は、不飽和脂肪酸やそのエステルを過酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は、植物組織や動物組織中に広く分布しており、重要な生理的役割を果たしている。また、本酵素が食品の品質にも大きな影響を与えることは良く知られている。本酵素は、起源、組織によって活性、基質特異性、安定性などが様々に異なっている。動物起源の酵素については遊離型脂肪酸が基質となるのに対して、植物組織ではトリアシルグリセロールやリン脂質などエステル結合した脂肪酸に対して高い親和性を持つ酵素が多い。本論文では、脂質分散系における植物リポキシゲナーゼの活性発現の機序を解明することを目指して、ダイズリポキシゲナーゼ 3 (SLOX3) とキュウリ根リポキシゲナーゼ (CRLOX) について、それらの活性がどのような要因によって制御を受けているのか検討を行なった。

第 1 章では、食品加工への関わりからの観点から、エマルション中での働きが注目されている SLOX3 を対象として、中性のエステル型脂質をエマルション状態に分散したものを基質とした場合に、食品中に含まれる成分である乳化剤、塩及びリン脂質が SLOX3 の反応に対して与える影響について検討した。まず、SLOX3 の反応速度は基質である油滴の表面に吸着しているタンパク質や乳化剤の種類によって大きく変化することを明らかにした。次に、様々な中性塩の SLOX3 反応に対する影響を検討した結果、添加する塩の濃度が上昇するにつれてリポキシゲナーゼ反応が低下することが示された。これは、塩が直接酵素に作用して起こるものではなく、油滴表面のゼータ電位を変化させることによって、引き起こされるものであることが示唆された。また、リポキシゲナーゼ反応に対するリン脂質添加の影響を検討した結果、ホスファチジルコリンはリポキシゲナーゼ反応を強力に阻害した。これに対し、ホスファチジン酸を添加しても反応速度は高いレベルに保たれていた。その原因を検討した結果、ホスファチジルコリンは、油滴表面の界面張力とゼータ電位を共に低下させることによって、リポキシゲナーゼ活性を阻害していることが示された。

第 2 章では、CRLOX のリン脂質ベシクルに対する反応性がどのような要因によって影響を受けるのかについて詳しく検討した。CRLOX は、キュウリの病原生物に対する防御機構に関与していると考えられると共に、膜状のリン脂質に直接作用できるという性質から、本酵素による生化学的、薬理学的に重要な物質の合成という利用面での発展も期待されている。CRLOX 活性は、基質ベシクルの分散液の超音波処理時間に依存して変化した。活性測定と動的光散乱測定の結果から、比較的短時間の超音波処理によって形成される大きな一枚膜ベシクルが CRLOX の反応に最も適していることが示唆された。L- α -ジリノレノイルホスファチジルコリン (PCdiLNA) ベシクルへの遊離脂肪酸 (FFA) の添加によって、CRLOX 活性は促進されることが示された。これに対して、ホスファチジン酸 (PA) を添加した場合は、僅かながら活性が抑制された。酵素活性に影響を与える因子を明らかにするために、FFA や PA を添加した PCdiLNA ベシクルの動的光散乱、ゼータ電位及び ^{31}P -NMR 測定や電子顕微鏡観察を行った。その結果、ベシクルの粒径やゼータ電位が酵素反応に密接に関連していることが示された。また、FFA や PA の添加によって、ベシクルの膜構造に大きな変化が見られた。以上の結果から、CRLOX は、基質ベシクルの形状や表面電荷、膜中の脂質分子の配列などのリン脂質の分散状態を認識して反応しているこ

とが示唆された。

論文審査の結果の要旨

リポキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸やそのエステル類の過酸化反応を触媒する酵素であり、植物や動物の組織中において重要な役割を果たすと共に食品の品質にも大きく関与している。植物組織由来のリポキシゲナーゼが高い親和性を示すトリアシルグリセロールやリン脂質などのエステル型脂肪酸は、エマルションやベシクルといった形態で水中に分散することが知られているが、このような分散状態の基質に対する本酵素の反応を検証した例はほとんど報告されていない。本論文は、植物リポキシゲナーゼの活性発現の機序を解明することを目的として、二種類の起源の異なる酵素について、その脂質分散系における活性制御要因について詳しく解析したものである。評価される主な点は次の通りである。

1. ダイズリポキシゲナーゼ3の反応速度は、基質エマルションの油滴表面の乳化剤の種類によって大きく変化することを明らかにした。さらにその反応は、基質エマルションへの塩の添加によって阻害を受け、この効果はエマルション油滴表面のゼータ電位の変化によって引き起こされることを見出した。また、リン脂質を添加した場合には、エマルション油滴表面の界面張力とゼータ電位が共に低下することによって、リポキシゲナーゼ反応が阻害されることを示唆した。

2. キュウリ根リポキシゲナーゼの反応は、基質ベシクルの超音波処理に依存して変化し、比較的短時間の超音波処理によって形成される大きな一枚膜ベシクルが最もその反応に適していることを示唆した。さらにその反応は、基質ベシクルへの脂肪酸の添加によって促進されることを見出した。これに対して、ホスファチジン酸を添加した場合は、僅かながら反応が抑制されることを示した。脂肪酸やホスファチジン酸を添加したベシクルの存在状態を解析することによって、ベシクル表面のゼータ電位や膜構造が大きく変化し、このような基質の分散状態の変化が酵素活性に影響を与える要因であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、脂質分散系における植物リポキシゲナーゼの活性制御要因について明らかにすると共に、本酵素の生理的作用の解明と食品その他の分野での本酵素の利用につながる新たな知見を与えたもので、食品加工学並びに酵素利用学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。