

アサガオのアレンオキシドシンターゼのクローニングおよび機能解析

バイオマス転換学講座 化学生物学分野
西垣 清志

【背景と目的】

植物の花芽形成物質の一種として 9,10-ketol-octadienoic acid (KODA) が知られている。アサガオ (*Pharbitis nil*) は典型的な短日植物であり、近年の研究から、アサガオにおいても花芽形成に KODA が関与していることが示唆された。一方、糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* の 2 次代謝産物セオブロキシドは、アサガオにおいてジャスモン酸誘導活性および花芽形成誘導活性を有している。KODA およびジャスモン酸は、いずれもリノレン酸カスケードの代謝産物である。そこで本研究では、リノレン酸カスケードに関わっている酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ遺伝子 (*PnAOS*) をアサガオからクローニングし、*PnAOS* の大腸菌での発現および、その生化学的諸性質の解析を目的とした。

【方法】

AOS 遺伝子は、すでに数種の植物からクローニングされ、そのアミノ酸配列も明らかにされている。既知の *AOS* 遺伝子の塩基配列からプライマーを設計し、RT-PCR 並びに 3' および 5' RACE-PCR 法により全長 cDNA クローンを得た。続いて、*PnAOS* の大腸菌における発現を試みた。*PnAOS* の葉緑体移行シグナルペプチドに相当する DNA 配列を除いた遺伝子配列を発現用ベクターに挿入し、大腸菌において発現させた。発現タンパク質はニッケルカラムで精製し、透析および限外濾過による濃縮を行った。その後、精製されたタンパクを用いて、*PnAOS* の活性測定を行った。

【結果】

PnAOS には、既知の *AOS* タンパク質のアミノ酸配列より、活性の発現に重要なヘム結合部位と、N 末端から 139 番目のフェニルアラニンが存在した。13-HPOT を基質とし、*PnAOS* の酵素反応生成物を GC-MS により分析したところ、12-OPDA および α -ketol の生成が確認でき、*PnAOS* は *AOS* 活性を有することが示された。また、その K_m 値は $36.5\mu\text{M}$ であり、 V_{\max} は $6.9\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。一方で、9-HPOT を基質とした時の K_m 値は $53.6\mu\text{M}$ であり、 V_{\max} は $0.3\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。これらの結果から、*PnAOS* は 9-HPOT に比べ 13-HPOT に対する基質特異性が高い 13-AOS であることが明らかになった。アサガオのリノレン酸カスケードにおいて *PnAOS* は 13-AOS としてジャスモン酸生合成に関与していることが示唆された。また、アサガオの花芽形成に関与するとされている KODA は 9-AOS により生成する。従って本研究で得られた *PnAOS* は、KODA の生合成には大きく関与していないと考えられる。