

博士論文(要約)

論文題目 アラキドン酸を生産する多価不飽和脂肪酸合成酵素に関する研究

氏名 氏原 哲朗

本博士論文の内容については共著になっており、インターネット公表に関して全共著者の了承が得られていないため、要約の公開とする。

以下要約を記す。

博士論文要約

ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、アラキドン酸 (ARA) を初めとする極長鎖多価不飽和脂肪酸は、極長鎖の脂肪酸に複数の二重結合が導入された構造を持ち、生体内で様々な役割を担っていることが知られている。しかしながら、人間はこれらの極長鎖多価不飽和脂肪酸を十分量体内で合成することができないため、必要量を食物の摂取によってまかなっている。DHA と EPA は多くの魚に含まれ、ARA は肉や卵などに含まれるが、含量は十分でなく、効率的な極長鎖多価不飽和脂肪酸の生産方法が求められている。そこで、私は極長鎖多価不飽和脂肪酸を微生物により効率的に生産する方法を検討することにした。

極長鎖多価不飽和脂肪酸の生合成経路として古くから知られているのは、脂肪酸合成酵素によって合成されたパルミチン酸などの飽和脂肪酸が、鎖伸長酵素による複数の伸長反応と不飽和化酵素による不飽和化反応によって極長鎖多価不飽和脂肪酸に変換される経路である。一方、極長鎖多価不飽和脂肪酸の中には、脂肪酸合成酵素やポリケチド合成酵素に類似した構造を持つマルチサブユニット型複合酵素である多価不飽和脂肪酸合成酵素により、アセチル CoA とマロニル CoA から直接合成されるものもある。多価不飽和脂肪酸合成酵素を用いた経路の特徴として、中間体を遊離することなく不飽和脂肪酸が合成されること、不飽和化反応に酸素や還元力を必要としないことなどが挙げられる。そのため不飽和脂肪酸の合成経路としては多価不飽和脂肪酸合成酵素を用いた経路は不飽和化酵素を用いた経路と比較して、エネルギー的に有利な系であると考えられる。

これまでの知見として、多価不飽和脂肪酸合成酵素としては EPA を合成するものと DHA を合成するものが知られているが、重要な極長鎖多価不飽和脂肪酸の一つである ARA を生

産するものは知られていなかった。そのため、多価不飽和脂肪酸合成酵素を用いた ARA の生産には ARA を生産する新規の酵素を新たに探索する必要があった。

私はまず、既知の種々の生物の脂肪酸組成を調査し、炭素鎖 18 の中間体を蓄積することなく ARA を生産する生物として海洋性細菌 *Aureispira marina* に着目した。本細菌のゲノム配列は未知であったため、ドラフトゲノム配列を新たに決定し、得られた配列の中で、既知の多価不飽和脂肪酸合成酵素と相同性を有する配列を探索した。その結果、1つの多価不飽和脂肪酸合成酵素様配列をコードする遺伝子クラスターを見出した。本クラスターは5つの遺伝子からなり、酵素の活性化に必要なホスホパンテテイン転移酵素(PPTase)をコードすると考えられる遺伝子も存在した。これらの遺伝子を既知の多価不飽和脂肪酸合成酵素に倣い、*pfaABCDE* と命名した。*A. marina* 由来の多価不飽和脂肪酸合成酵素様配列のドメイン構造を既知の多価不飽和脂肪酸合成酵素と比較すると、多価不飽和脂肪酸の合成に必要なドメインが全て保存されていることが確認された。一方で多価不飽和脂肪酸合成酵素の1番目のサブユニット遺伝子である *pfaA* にコードされるドメインとして、ケトレダクターゼドメイン (KR) が存在せず、2番目のサブユニット遺伝子である *pfaB* にコードされる点や、アシルトランスフェラーゼドメインが3番目のサブユニット遺伝子である *pfaC* にコードされるなどの違いが存在した。見出された配列が実際に多価不飽和脂肪酸合成活性を示すかを調べるため、これらの多価不飽和脂肪酸合成酵素を構成する遺伝子が大腸菌で発現させたところ、実際に ARA の生産を確認することができた。以上の結果から、本研究で見出された多価不飽和脂肪酸合成酵素様の配列は実際に ARA を生産する多価不飽和脂肪酸合成酵素であることが確認された。

見出された ARA 生産多価不飽和脂肪酸合成酵素の ARA 生産メカニズムを解析するため、EPA を生産する *Shewanella oneidensis* 由来の多価不飽和脂肪酸合成酵素とのハイブリッドを作製して解析したところ、二重結合の形成に重要な役割を果たしていると考えられる ER ドメインは不飽和度の決定に関与していないことが示された。また、PPTase も産物の決

定に寄与していないことが示された。以上の結果から、本多価不飽和脂肪酸合成酵素の産物決定は ER ドメインと PPTase 以外のいずれかのドメインが関与していることが示された。

本研究により有用脂肪酸の一つである ARA を生産する多価不飽和脂肪酸合成酵素が初めて同定され、本遺伝子を利用することにより、ARA を微生物により効率的に生産する可能性が拓けたといえる。また、ARA は DHA や EPA とは異なり、 $\omega 6$ 型の多価不飽和脂肪酸であるため、今後、既知の多価不飽和脂肪酸合成酵素と比較することにより、多価不飽和脂肪酸合成酵素の不飽和度決定メカニズムの解析に用いることが出来ると考えられる。