HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the Biosynthetic Machinery in Polyunsaturated Fatty-Acid Synthases [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	林, 祥平
Citation	北海道大学. 博士(工学) 甲第14020号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78307
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Shohei_HAYASHI_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　　博士（工学）　　氏名　林　祥平

学 位 論 文 題 名

Studies on the Biosynthetic Machinery in Polyunsaturated Fatty-Acid Synthases
（多価不飽和脂肪酸合成酵素における生合成機構に関する研究）

ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) やアラキドン酸 (ARA) などに代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は生体膜の構成成分であり、また、プロスタグランジン類などのシグナル分子の前駆体でもあり必須脂肪酸である。これらは一般的に酸素依存型不飽和化酵素と炭素鎖伸長酵素によって脂肪酸合成酵素経路から供給された飽和脂肪酸 (C_{18}) から段階的に生合成される。しかし、ある種の海洋性微生物はポリケチド合成酵素 (PKS) 様の巨大酵素複合体「多価不飽和脂肪酸合成酵素 (PUFA 合成酵素)」で PUFA を生合成することが 2001 年に報告された。PUFA 合成酵素は 3 から 4 つのサブユニットから構成され、iterative type I PKS や脂肪酸合成酵素 (FAS) のようにアセチル単位からマロニル-acyl carrier protein (ACP) を伸長基質として 2 炭素の縮合、還元、脱水等の反応サイクルを連続的に進行させ、逐次 *cis* 二重結合を形成しながら PUFA を合成すると予想されていた。しかし、これまでに生産物の炭素鎖長 (C_{22} または C_{20}) や不飽和位 (ω3 または ω6) の異なる DHA、EPA、ARA をそれぞれ特異的に合成する PUFA 合成酵素遺伝子が報告されてきたが、その詳細な生合成機構は明らかとなっていない。そこで本学位論文では DHA、EPA 及び ARA 合成酵素の生合成機構の解明に取り組んだ。以下にその概要を述べる。

Chapter 2 では、PUFA 合成酵素の生産性制御機構の解明に取り組んだ。一般的に FAS や PKS は 1 つの ACP ドメインを基質のキャリアタンパク質として利用するが、PUFA 合成酵素には連続した複数の ACP ドメインがある。先行研究より、不活性型 ACP ドメインの数に依存して PUFA の生産性が減少することが報告されたため、本論文では人工的に活性型 ACP ドメイン数を増加させ、PUFA 生産性への影響を検証した。その結果、ACP ドメインの数に依存して PUFA 生産性が増加することが認められ、その数が PUFA 生産性の制御に関与することが示された。さらに、不活性型 ACP ドメインを用いた実験も行い、連続した ACP ドメインの立体構造も生産性に重要であることを示した。

Chapter 3 では、EPA と ARA 合成酵素を用いて生産物の *cis* 二重結合導入位置 (ω3 または ω6) の制御機構の解明に取り組んだ。合成酵素を構成する遺伝子及びドメインの交換実験から、2 種の dehydratase (DH) ドメイン、polyketide-synthase type DH (DH_{PKS}) と FabA-type DH (DH_{FabA}) が *cis* 二重結合導入位置の制御に関与することが示唆された。そこで、各々のドメインを持つ組換え酵素と炭素鎖長の異なるアシル-ACP 基質を用いて、2 つの DH ドメインの基質特異性を *in vitro* 解析した。その結果、EPA と ARA の生合成経路の分岐点と予想された炭素鎖長 6 の基質に対して、EPA 合成酵素では DH_{FabA} ドメインが、ARA 合成酵素では DH_{PKS} ドメインが活性を示した。さらに、DH_{FabA} ドメインが脱水反応に加えて *trans-cis* 二重結合の異性化活性を示すことも明らかとし、PUFA 合成酵素は 2 種類の DH ドメインを基質の炭素鎖長によって使い分け、DH ドメインの基質特異性の差により二重結合導入位置を制御していることを明らかとした。

Chapter 4 では、DHA と EPA 合成酵素を用いて生産物の炭素鎖長 (C_{22} または C_{20}) 制御機構の解明に取り組んだ。Chapter 3 と同様に遺伝子とドメインの交換実験から、β-ketoacyl synthase (KS_C)/chain length factor (CLF) ドメインが DHA と EPA の制御に関与することが示唆された。そこで、KS_C/CLF ドメインおよび PUFA 合成酵素に存在するもう 1 つの KS ドメイン KS_A と炭素鎖長の異なるアシル-ACP 基質を用いて、両ドメインの基質特異性を *in vitro* 解析した。その結果、PUFA 合成酵素は 2 つの KS ドメインを基質の炭素鎖長によって使い分け、KS_C/CLF ドメインの基質特異性の違いが DHA と EPA の炭素鎖長を制御していることを明らかとした。

Chapter 5 では、PUFA 合成酵素が生産物を ACP から切り離す機構の解明に取り組んだ。一般的に PKS や FAS の生合成機構では ACP とチオエステル結合した生成物は thioesterase (TE) や acyltransferase (AT) ドメインによって加水分解、環化やアシル基転移反応が進行し、ACP から切り離されるが、PUFA 合成酵素には TE ドメインと相同性を示すドメインがなく、本機構は未解明であったが、先行研究とこれまで得られた知見から、AT ドメインが生産物の切り離しに関与すると推測された。そこで、AT ドメイン組換え酵素とアシル-ACP 基質を用いた *in vitro* 解析を行い、AT ドメインがアシル-ACP の加水分解を触媒し、生産物を ACP から切り離すことを明らかとした。

以上の研究成果を基に、DHA、EPA 及び ARA 合成酵素の生合成機構を図 1 のように提唱し、合成酵素遺伝子の発見以降、未解明であったその生合成機構を明らかとした。

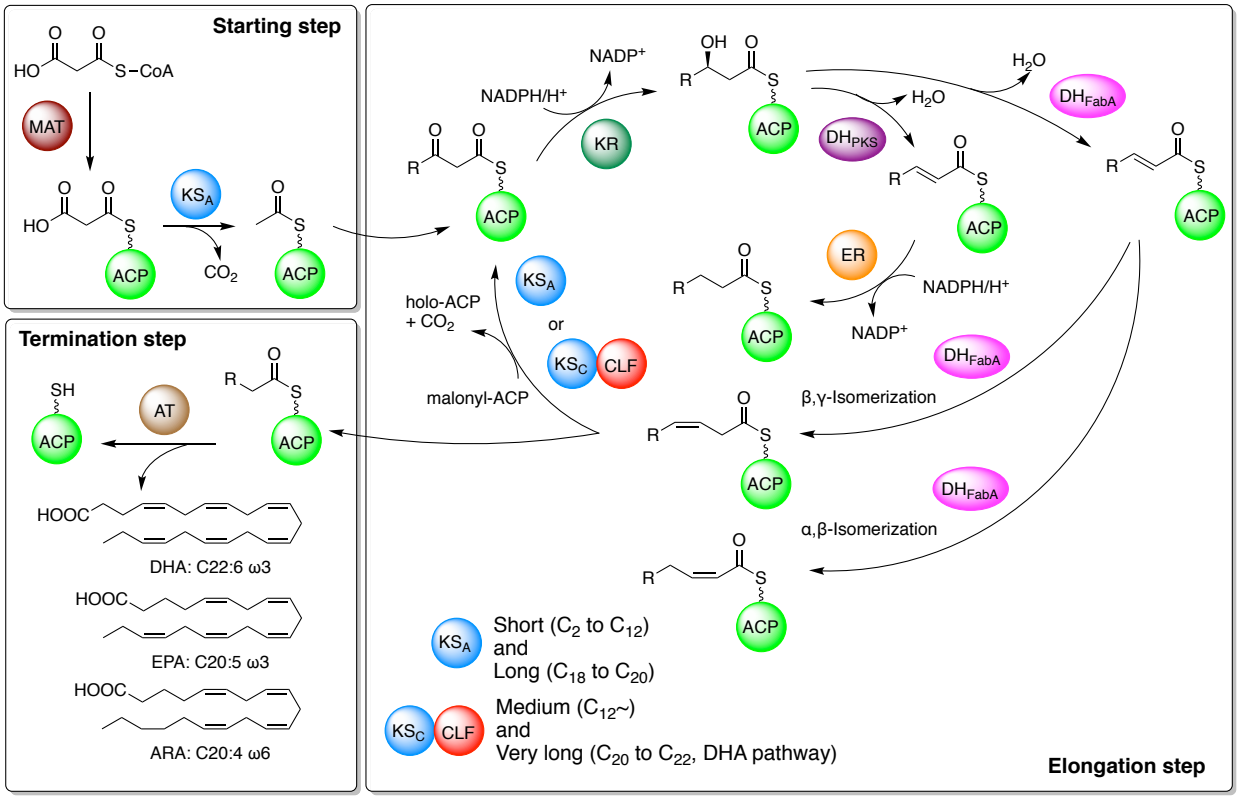

図 1. 本研究により提唱した DHA、EPA 及び ARA 合成酵素の生合成機構