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_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　林　祥平

審査担当者	主査	教授	松本 謙一郎
	副査	教授	髙木 睦
	副査	准教授	南 篤志
	副査	教授	大利 徹

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で供給された飽和脂肪酸 (C18) 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が、その詳細な生合成機構は未解明であった。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を行った。

最初に、PUFA 合成酵素の生産性制御機構の解明を行った。一般的に FAS 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 ドメインが存在する。そこで、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結果、ACP ドメインの数に依存して PUFA 生産性が増加し、その数が PUFA 生産性を制御することを明らかにした。

次に、生産物の cis 二重結合導入位置 (ω 3 または ω 6) の制御機構の解明を行った。生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) ドメインである、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、基質特異性を in vitro 解析した結果、EPA と ARA の生合成経路上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た。

さらに、DHA と EPA 合成酵素を用いて生産物の炭素鎖長 (C22 または C20) 制御機構の解明を行った。遺伝子及び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。

最後に、PUFA 合成酵素が生産物を ACP から切り離す機構の解明を行った。一般的に 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) 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することで 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。そこで種々検討した結果、acyltransferase（AT） ドメインが生産物を ACP から切り離すことを明らかとした。

これを要するに、著者は多価不飽和脂肪酸合成酵素の生産性決定因子、二重結合導入位置 (ω 3 または ω 6) 決定機構、生産物の炭素鎖長 (C22 または C20) 制御機構の完全解明に成功し、さらに得られた成果を基に DHA 合成酵素を EPA 合成酵素に改変することにも成功しており、応用微生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は，北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。