

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	趙 賢 南
論文題目	Studies on 1-acyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphate acyltransferase of <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 (<i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 の 1-アシル- <i>sn</i> -グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのω3系高度不飽和脂肪酸はリン脂質のアシル鎖として生体膜に存在し、生体膜の曲率、膜厚、透過性、流動性などの物理化学的性質に独特の影響を及ぼす。また、膜タンパク質と相互作用してそれらの構造形成や機能発現を介助するものと考えられている。EPA 生産性海洋性細菌の <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 では、EPA が低温環境における細胞分裂に重要な役割を果たすことが示されている。また、蛍光標識リン脂質プローブを用いた研究から、EPA 含有リン脂質が細胞分裂部位に局在することが示唆されている。一方、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 における EPA 含有リン脂質の生合成を触媒する酵素は同定されておらず、その酵素化学的特徴や細胞内での動態は不明であった。本研究は、本菌において EPA 含有リン脂質生合成を担う酵素を同定し、その触媒特性や細胞内局在性を解析したものであり、その内容は以下のように要約される。</p>			
<p>1. 1-アシル-<i>sn</i>-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (PlsC) は、1-アシル-<i>sn</i>-グリセロール-3-リン酸の <i>sn</i>-2 位にアシル-CoA のアシル基を転移する酵素である。<i>S. livingstonensis</i> Ac10 において、EPA はグリセロリン脂質の <i>sn</i>-2 位に存在することから、PlsC が EPA 含有リン脂質の生合成に関与することが考えられた。本菌の全ゲノム配列を調べた結果、<i>Escherichia coli</i> の <i>plsC</i> と同源性のある 5 個の遺伝子 (<i>plsC1</i>~<i>plsC5</i>) が見いだされた。これらのうち、<i>plsC1</i> の破壊によって EPA 含有リン脂質がほぼ完全に消失した。また、<i>E. coli</i> の <i>plsC</i> 温度感受性変異株に <i>plsC1</i> を導入し、触媒特性を解析した結果、PlsC1 が EPA-CoA を基質とした EPA 含有リン脂質合成反応を触媒することが示された。以上の結果から、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 の EPA 含有リン脂質生合成において、PlsC1 が主要な役割を果たしていることが判明した。</p>			
<p>2. <i>S. livingstonensis</i> Ac10 の <i>plsC1</i> 欠損株では、EPA 生合成遺伝子破壊株と同様、4℃での細胞分裂不全が見られた。この株に <i>plsC1</i> を発現するプラスミドを導入したところ、EPA 含有リン脂質が生合成され、細胞分裂は正常に進むようになった。一方、<i>E. coli</i> の <i>plsC</i> を導入した場合、EPA 含有リン脂質は生合成されたが、細胞分裂不全は解消しなかった。PlsC1 あるいは <i>E. coli</i> 由来 PlsC を発現する <i>S. livingstonensis</i> Ac10 の免疫蛍光顕微鏡観察により、PlsC1 が細胞分裂部位に局在するのに対し、<i>E. coli</i> 由来 PlsC は細胞全体にほぼ均一に存在することが示された。PlsC1 に蛍光タンパク質である eGFP を融合させたタンパク質が細胞分裂部位に局在することも免疫蛍光顕微鏡観察によって確認された。以上の結果から、PlsC1 が EPA 含有リン脂質生合成を介して細胞分裂において発現する生理機能には、細胞分裂部位へ</p>			

の局在が重要であることが示唆された。上述のように、本菌においては蛍光標識 EPA 含有リン脂質プローブが細胞分裂部位に濃縮された。従って、PlsC1 によって細胞中央部で合成された EPA 含有リン脂質が細胞分裂において重要な役割を果たすことが考えられた。PlsC1 の細胞分裂部位への局在は、EPA 生合成酵素である Orf5 の欠損株では見られなかったことから、Orf5 との相互作用が、PlsC1 の細胞分裂部位への局在化に寄与しているものと考えられた。

3. EPA 含有リン脂質など、EPA を含む生体分子の細胞内動態解析に用いることを目的として、EPA を認識する抗体の作製を試みた。牛血清アルブミンに結合させた EPA をラットに接種したのち、リンパ節から分離した B 細胞をマウスミエローム細胞と融合することでハイブリドーマを作製した。ELISA によるスクリーニングを行い、抗 EPA モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選抜した。得られた抗体を用いて野生株と EPA 生合成遺伝子破壊株の免疫蛍光顕微鏡観察を行った結果、野生株でのみ局所的に強い蛍光シグナルが見られ、EPA を特異的に検出できたものと考えられた。野生株で見られた強い蛍光シグナルは細胞分裂部位と極部分に存在した。plsC1 欠損株では細胞全体でほぼ均一な蛍光が見られたことから、野生株の細胞分裂部位と極部分で見られた蛍光シグナルは EPA 含有リン脂質によるものと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ω3系高度不飽和脂肪酸である EPA や DHA は、ヒトの健康に貢献する機能性脂質として注目されている。これらの脂肪酸は一部の細菌にも存在し、細胞分裂や膜タンパク質の生合成において重要な役割を担っている。EPA や DHA は、リン脂質のアシル鎖として生体膜で機能する。本論文は、細菌の EPA 含有リン脂質生合成酵素を同定し、その触媒特性や局在性を解析したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. EPA 生産性細菌である *S. livingstonensis* Ac10 において、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ PlsC1 が EPA 含有リン脂質の生合成を担っていることを明らかにした。

2. *E. coli* の PlsC は、*in vitro* では *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 と類似した基質特異性を示し、*S. livingstonensis* Ac10 内で発現させた場合には EPA 含有リン脂質の生合成を触媒するが、本菌の細胞分裂における PlsC1 の機能は代替できないことを見いだした。*E. coli* 由来 PlsC が細胞全体にほぼ均一に存在するのに対し、PlsC1 は細胞分裂部位に局在していることを明らかにし、本酵素の機能発現において、細胞分裂部位への局在化が重要であることを示唆する結果を得た。

3. EPA を認識するモノクローナル抗体を作製した。これを利用することで、EPA 含有リン脂質が細胞分裂部位と極部分に存在することを示した。本抗体は、さまざまな生物における EPA 含有生体分子の動態解析用プローブとしても有用と考えられる。

以上のように本論文は、生体膜において重要な機能を有する EPA 含有リン脂質の生合成酵素を EPA 生産性細菌において同定するとともに、その触媒特性や細胞内局在性を明らかにしたものである。また、本酵素の機能解析や EPA 含有リン脂質の動態解析に利用できる抗 EPA モノクローナル抗体を作製したものであり、分子微生物科学、酵素化学、脂質生化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 26 年 2 月 10 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。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)