

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	徳 永 智 久
論文題目	Synthesis and application of ω -ethynyl fatty acids to analyze the physiological functions of eicosapentaenoic acid (ω -エチニル型脂肪酸の合成とエイコサペンタエン酸の生理機能解析への応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>エイコサペンタエン酸 (EPA) は抗炎症作用や血管系疾患の予防など様々な効果をもつ機能性脂肪酸として注目を集めているが、その細胞における生理機能発現機構には不明な点が多い。本研究は、EPA の生理機能解析用プローブとして EPA の ω 末端メチル基をエチニル基 (-C\equivCH) で置換した ω-エチニル型 EPA (eEPA) を合成し、その機能評価を行うとともに、EPA 生産性細菌である <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 を用いて、EPA の細胞内局在性やタンパク質との相互作用の解析に利用したものであり、その内容は以下のように要約される。</p> <p>第 1 章では、eEPA の効率的な合成法を確立した。本法は、銅触媒を用いたカップリング反応によって 4 個の炭素-炭素三重結合をもつスキップポリイン化合物を合成した後、それらの三重結合を P-2 ニッケルを用い立体選択的に部分還元してシス型二重結合に変換し、さらに Wittig 反応で 1 個の二重結合と ω 末端エチニル基を導入するものである。この合成法により、eEPA を 12 段階、収率 5.2% で合成した。</p> <p>次に、eEPA の生理機能を、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 を用いて評価した。本菌の野生株 (WT 株) において、EPA はリン脂質のアシル鎖の約 8% を占めている。本菌の EPA 生合成遺伝子欠損株 (ΔEPA 株) を天然型 EPA または eEPA 含有培地にて培養し、リン脂質を抽出してアシル鎖組成を解析した結果、EPA と同様に eEPA も本菌のリン脂質に取り込まれていることが示された。ΔEPA 株は、4 $^{\circ}$C 付近において WT 株に比べ、著しい生育遅延、異常な細胞伸長といった表現型を示す。一方で、天然型 EPA 含有培地にて ΔEPA 株を培養すると、これらの異常が抑制される。eEPA の ΔEPA 株表現型異常に対する抑制効果を調べた結果、天然型 EPA 含有培地にて培養した場合と同様に、ΔEPA 株の生育遅延と異常な細胞伸長を抑制することが見いだされた。以上のことから、本菌において eEPA は天然型 EPA と同様にリン脂質に取り込まれ、EPA と同等の生理機能を発揮することが示された。</p> <p>第 2 章では、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 における EPA の細胞内での局在性の解明を目的とし、eEPA の蛍光標識による可視化を試みた。比較対象として、本菌の主要な脂肪酸の一つであるパルミトレイン酸 (PAL) の ω 末端にエチニル基をもつ ω-エチニル型 PAL (ePAL) を用いた。4 $^{\circ}$C において eEPA または ePAL 含有培地にて本菌の WT 株および ΔEPA 株を培養した後、固定化、膜透過処理を行った。次に、銅イオン存在下でアジド基をもつ蛍光色素 (Alexa FluorTM 488 azide) を加え、クリック反応により細胞内に取り込まれた eEPA と ePAL を蛍光標識した。488 nm の励起で、超</p>			

解像蛍光顕微鏡観察を行った。eEPA または ePAL 含有培地にて培養した場合、WT 株、 Δ EPA 株ともに細胞膜領域において比較的高いシグナルが観察された。これは、eEPA や ePAL を含むリン脂質が生体膜を構成することを反映したものと考えられる。一方、eEPA 存在下で培養した場合、強い蛍光強度をもつドット状のシグナルが多く観察され、ePAL に比べて不均一な分布をしていることが明らかとなった。この結果より、本菌における、EPA が特異的に濃縮された細胞膜領域の存在が示唆された。

第 3 章では、eEPA を用いて、*S. livingstonensis* Ac10 における EPA 修飾タンパク質の探索および同定を試みた。脂質修飾はタンパク質の機能を制御する重要な翻訳後修飾であり、様々な生理機能に関わっているが、EPA によって修飾されるタンパク質の存在は報告されていない。本研究では、eEPA 含有培地にて培養した Δ EPA 株から調製した不溶性タンパク質画分をアジドクマリンとのクリック反応により化学修飾し、SDS-PAGE に供した。その後、クマリン標識されたタンパク質を検出した結果、eEPA を介して蛍光標識されたと推定されるタンパク質が検出された。この結果は、eEPA がタンパク質に共有結合していることを示唆するものである。また、eEPA と同時に天然型 EPA を添加して培養した菌体について同様の蛍光標識を行った結果、天然型 EPA の添加量の増加に応じて蛍光標識されるタンパク質バンドの蛍光強度が減少したことから、eEPA によるタンパク質修飾は天然型 EPA により競合的に減少することが明らかとなり、本菌における EPA 修飾タンパク質の存在が強く示唆された。eEPA によって修飾されるタンパク質を同定するために、上記と同様に調製した不溶性タンパク質画分をアジドビオチンで化学標識し、ストレプトアビジンビーズを用いたアフィニティー精製に供した。精製されたタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法で解析した結果、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ (Dcp)、メタロエンドペプチダーゼ (PepO)、アクリフラビン耐性タンパク質 (AcrA)、外膜ポーリンタンパク質 (Omp74)、ペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (FkpA) の 5 種類のタンパク質が同定された。これらのうち 3 種類 (Dcp、PepO、AcrA) には、細菌のリポタンパク質に高度に保存されているリポボックス配列が見いだされた。リポボックス配列をもつタンパク質の N 末端は N-アシル-S-ジアシルグリセリルシステインとなることが知られている。本菌の Dcp、PepO、AcrA では、この部分に EPA が導入されることが推定される。他の 2 種の同定タンパク質については既知のリポボックス配列は保存されておらず、未知の脂質修飾様式により EPA が付加している可能性が示唆された。EPA 修飾タンパク質の存在は、EPA が翻訳後修飾によってタンパク質の機能を制御する可能性を示唆するものである。

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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

EPA はヒトの健康保持などに有用な脂質として知られるが、その生理機能の発現機構には不明な点が多く残されている。本論文は、EPA の生理機能解析に有用なプローブとして ω 末端にエチニル基をもつ EPA アナログ (eEPA) を合成し、EPA 生産性細菌 *S. livingstonensis* Ac10 における機能評価とともに、eEPA を EPA の細胞内局在性の解析や EPA 修飾タンパク質探索に応用したものであり、評価すべき点として以下の 4 点が挙げられる。

1. EPA の生理機能解析に有用と期待される eEPA の効率的な合成法を確立した。
2. *S. livingstonensis* Ac10 の EPA 欠損変異株への添加実験により、eEPA が本変異株において天然型 EPA と同等の生理機能を発揮しうることを示した。
3. ω 末端にエチニル基をもつパルミトレイン酸アナログ ePAL と eEPA の *S. livingstonensis* Ac10 における細胞内局在性を解析し、eEPA が ePAL に比べて不均一な細胞内分布をもつことを見いだした。これは局所的に EPA が濃縮された細胞内領域の存在を示唆するものであり、EPA の生理機能の発現機構を理解する上で意義深い知見と考えられる。
4. eEPA で修飾される 5 種類のタンパク質を *S. livingstonensis* Ac10 に見いだした。EPA は生体膜リン脂質のアシル鎖として存在することが知られていたが、タンパク質に結合した存在様式は知られていなかった。本研究成果は、EPA によるタンパク質の翻訳後修飾の存在を示すものであり、EPA の生理機能の発現における生化学的基盤を示した成果として高く評価される。

以上のように、本論文は、EPA の生理機能の解析に有用な ω -エチニル型 EPA アナログの効率的な合成法を確立するとともに、これを用いて EPA 生産性細菌における EPA の細胞内分布やタンパク質翻訳後修飾に関する新しい知見を得たものであり、分子微生物科学、脂質生化学、ケミカルバイオロジーの発展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30年2月13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）