

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	豊竹 洋佑
論文題目	Studies of lysophosphatidic acid acyltransferases generating membrane lipid diversity in bacteria （細菌膜脂質の多様性を形成するリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素群に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
細菌細胞膜の主成分であるリン脂質には、鎖長や二重結合の数・位置、分枝の有無などが異なるさまざまなアシル鎖が結合しており、リン脂質に大きな構造多様性をもたらしている。細胞膜のリン脂質組成は、膜タンパク質の機能発現や安定性に影響するほか、細胞分裂など細胞膜の大きな構造変化を伴う過程で重要な役割を担うと考えられている。この多様性に富むリン脂質のそれぞれには構造特異的な生理機能があることが推定される。しかし、アシル鎖の構造特異的な機能に着目した研究例は少ない。また、多様なアシル鎖を含むリン脂質が作り分けられる機構についての知見もきわめて限定的である。 リン脂質の <i>de novo</i> 生合成においては、リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (LPAAT) が必須の役割を担う。本酵素は、リゾホスファチジン酸の <i>sn</i>-2 位へのアシル基転移反応を触媒し、さまざまなリン脂質の前駆体となるホスファチジン酸を生成する。単一細胞内で複数の LPAAT ホモログを有する細菌が多く見いだされているが、各ホモログの基質特異性や生理的意義についての知見は少ない。 本研究は、複数の LPAAT ホモログを有する細菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 と <i>Escherichia coli</i> を対象とし、それらの基質特異性を解析することで、膜リン脂質アシル鎖の多様性創出メカニズムの解明に取り組んだものである。また、アシル鎖構造の特徴に依存したリン脂質の生理機能を明らかにするため、各種 LPAAT ホモログ遺伝子の欠損株を作製し、それらのリン脂質アシル鎖構造の特徴と表現型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。			
1. 分枝鎖脂肪酸をリン脂質に導入する LPAAT の同定			
エイコサペンタエン酸 (EPA) 生産性細菌である <i>S. livingstonensis</i> Ac10 は 5 種の LPAAT ホモログ (PlsC1-5) を有する。先行研究において、それらのうち PlsC1 が EPA のリン脂質への導入を担うことが明らかにされた。他のホモログの遺伝子破壊株を相同組み換えによって作製し、リン脂質組成をエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析によって解析した結果、PlsC4 の欠損株で分枝鎖脂肪酸である 11-メチルラウリン酸 (i13:0) と 13-メチルミリスチン酸 (i15:0) を含むリン脂質が著しく減少していることが見いだされた。菌体から抽出した総リン脂質をホスホリパーゼ A2 によって加水分解し、遊離した脂肪酸をガスクロマトグラフィー／質量分析によって解析した結果、PlsC4 欠損株では、<i>sn</i>-2 位の i13:0 と i15:0 が減少していることが見いだされ、PlsC4 がこれらの脂肪酸をリン脂質に導入する役割を担っていることが示された。以上の結果から、本菌は、基質特異性の異なる複数の LPAAT ホモログを用いて、多様なアシル鎖組成の膜リン脂質を効率的に生合成していることが示唆された。			

2. 分枝鎖脂肪酸をリン脂質に導入する LPAAT の生理機能解析

先行研究において、PlsC1 が生産する EPA 含有リン脂質は、低温環境における *S. livingstonensis* Ac10 の正常な細胞分裂に重要な役割を担うことが明らかにされている。本研究では、PlsC4 が生産する分枝鎖脂肪酸含有リン脂質の生理機能を明らかにするため、*plsC4* 欠損株の表現型を解析した。本細菌が海洋性の低温菌であることを考慮し、海水と同等のミネラル成分をもつ Marine broth を用いて *plsC4* 欠損株を低温培養した。その結果、*plsC4* 欠損株の細胞形態は親株と比べて変化がなかったが、定常期以降の *plsC4* 欠損株の生菌数が親株と比べて有意に低下していた。さらに、*plsC4* 欠損株は親株と比べて著しい細胞凝集性を示した。このときの *plsC4* 欠損株の菌体表層を走査型電子顕微鏡で観察すると、菌体外多糖と考えられる網目状の構造物が菌体を包み込むように存在していた。このことから、*plsC4* 欠損株は液中でバイオフィーム様の凝集体を形成することが示唆された。一方、*plsC1* 欠損株はこのような凝集性を示さなかった。さらに、軟寒天培地上で細胞の運動性を評価すると、*plsC4* 欠損株の運動性が野生株に比べて著しく低かった。以上の結果から、分枝鎖脂肪酸含有リン脂質は、本細菌の生菌数の維持に関与し、運動性と凝集性の制御において特異的な機能を有していることが示唆された。

3. *E. coli* の新規 LPAAT の同定と機能解析

E. coli は PlsC1 のオーソログである PlsC を有しているが、PlsC 以外の LPAAT の存在は知られていなかった。PlsC4 と相同性をもつ *E. coli* タンパク質の探索を行った結果、PlsC4 と 39.1% の相同性をもつ機能未知タンパク質 YihG が見いだされた。YihG の LPAAT 活性を確認するため、PlsC 遺伝子の温度感受性変異株に YihG 高発現ベクターを導入し、非許容温度における本変異株の生育を調べた。その結果、YihG の高発現によって本株の生育不全が抑制されたことから、YihG が PlsC の機能を相補していることが推定された。次に、YihG 高発現株と PlsC 高発現株における膜リン脂質 *sn*-2 位のアシル鎖組成を解析した。その結果、YihG 高発現株ではミリスチン酸 (14:0) と *cis*-バクセン酸 (18:1 Δ 11) の相対量が PlsC 高発現株と比較して有意に高かった。このことから、YihG は 14:0 と 18:1 Δ 11 に対する活性が PlsC よりも高いことが示唆された。また、*yihG* 欠損株における膜リン脂質 *sn*-2 位のアシル鎖組成を解析した結果、18:1 Δ 11 の相対量が野生株と比較して有意に低下していたことから、生理的条件下において、YihG は 18:1 Δ 11 をリン脂質に導入するものと考えられた。さらに、軟寒天培地や顕微鏡を用いて細胞の運動能を解析したところ、運動性をもつ細胞の割合ならびに遊泳速度は、野生株と比べて *yihG* 欠損株の方が高かった。以上から、YihG によって調節される膜リン脂質組成が *E. coli* の運動機能に影響することが示唆された。

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)

細菌細胞膜の主成分であるリン脂質のグリセロール骨格には、鎖長や不飽和度などが異なるさまざまなアシル鎖が結合しており、リン脂質に大きな構造多様性をもたらしている。しかし多様なリン脂質が作り分けられる機構や、それぞれのリン脂質の構造特異的な生理機能については不明な点が多く残されている。本論文は、リン脂質の *sn*-2 位にアシル鎖を導入するリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (LPAAT) に着目して研究を行い、リン脂質アシル鎖多様性の創出機構と生理的意義を解析したものであり、評価すべき点として以下の 3 点が挙げられる。

1. EPA 生産菌 *S. livingstonensis* Ac10 の LPAAT である PlsC4 が分枝鎖脂肪酸含有リン脂質の生合成を担うことを明らかにした。本菌は、EPA 含有リン脂質の生合成を担う PlsC1 も有しており、基質特異性が異なる複数の LPAAT ホモログの働きによって、多様なアシル鎖組成の膜リン脂質が生合成されていることを示した。
2. PlsC4 遺伝子の欠損によって *sn*-2 位に分枝鎖脂肪酸をもつリン脂質が特異的に減少した変異株を作製し、その表現型解析を行った。PlsC4 欠損株では運動性の低下と細胞凝集性の上昇が認められ、分枝鎖脂肪酸含有リン脂質がこれらの制御に関与することが示唆された。
3. *E. coli* の新規 LPAAT として *cis*-バクセン酸のリン脂質への導入を担う YihG を発見した。さらに本酵素欠損株の表現型解析から、本酵素によって調節される膜リン脂質組成が本菌の運動性に影響することを見いだした。

以上のように、本論文は、細菌膜リン脂質のアシル鎖多様性創出を担う新規酵素の発見と生理的役割の解明を行ったものであり、分子微生物科学、脂質生化学、酵素科学の発展に寄与するところが多い。

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31年2月8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）