

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	佐藤 翔
論文題目	Chemical studies on physiological roles of eicosapentaenoic acid in bacterial membrane (細菌細胞膜におけるエイコサペンタエン酸の生理機能に関する化学的研究)		
(論文内容の要旨)			
エイコサペンタエン酸 (EPA、20:5 <i>n</i>-3) は種々の生物に存在する長鎖多価不飽和脂肪酸 (LPUFA) である。ヒトにおいては、LPUFA に制ガン作用、高血圧抑制作用などの生理機能のあることが知られている。近年、LPUFA を <i>sn</i>-2 位に含むリン脂質が脂質二重層の疎水部において膜タンパク質と相互作用し、特定のタンパク質の活性調節を担うことなどが報告されているが、<i>in vivo</i> での詳細な機能は不明である。生体膜における脂質の局在性や脂質-タンパク質間相互作用を解析するためには分子プローブが有用であるが、疎水部の構造に依存した脂質の局在性や脂質-タンパク質間の疎水性相互作用を検出するプローブの開発は進んでいない。本研究は、さまざまなプローブを化学合成し、それらを用いて EPA の機能を解析したものである。具体的には、EPA をリン脂質の <i>sn</i>-2 位に有し、EPA 欠損によって顕著に表現型が変化する低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 を LPUFA 解析におけるモデル生物として位置づけ、各種脂質誘導体の本菌への添加効果を調べることで EPA 含有リン脂質の生理機能解析を行った。それらの成果は以下のように要約される。 1. LPUFA 含有リン脂質の構造機能相関解析 <i>S. livingstonensis</i> Ac10 の EPA 欠損株 (ΔEPA 株) は、4℃付近で著しい生育遅延、膜形成異常、多核構造形成などの低温感受性を示す。EPA、ドコサヘキサエン酸 (DHA、22:6 <i>n</i>-3)、および、二重結合の数や位置、鎖長の異なる種々の脂肪酸を <i>sn</i>-2 位に付与したリン脂質を合成し、これらを ΔEPA 株に添加して、表現型の回復効果を指標として LPUFA 含有リン脂質の構造機能相関を解析した。野生株と同じ表現型に回復したのは、EPA 含有リン脂質、または DHA 含有リン脂質を添加した場合のみであり、本菌におけるこれらのリン脂質の重要性が示された。 2. 蛍光標識エーテル型リン脂質を用いた EPA 含有リン脂質の局在性解析 EPA 含有リン脂質の可視化プローブを作製し、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 における局在性を解析した。アシル鎖として EPA を含み、極性頭部に蛍光発色団を含むリン脂質プローブを菌体に添加した場合、菌体由来の酵素による加水分解を受けて EPA がプローブ分子から遊離し、局在性を解析できなかった。そこで、グリセロール骨格と炭化水素鎖のエステル結合をエーテル結合に置換した蛍光標識エーテル型リン脂質プローブを合成した。<i>Sn</i>-2 位に eicosapentaenyl 基または oleyl 基をもつプローブを合成した。これらを ΔEPA 株に添加し、6℃で培養した際の蛍光分布、およびリン脂質組成の経時変化を解析した。その結果、eicosapentaenyl 基を含むプローブを用いた場合にのみ、菌体中央部に蛍光の局在が観察された。Oleyl 基を含む誘導体ではこのような局在が見られなかったことから eicosapentaenyl 基に依存してマイクロドメインが			

形成されたことが明らかとなった。また、DNA 染色試薬との共染色によって局在部位が核様体閉鎖領域（細胞分裂部位）であることが示された。

3. EPA と相互作用するタンパク質の探索

3-1. 架橋性リン脂質プローブを用いた探索

EPA 含有リン脂質の極性頭部にヨードアセチル基とアジド基をもつリン脂質プローブを合成した。これらの官能基は、それぞれタンパク質のシステイン残基との架橋、およびクリックケミストリーの手法を用いた架橋産物の検出・精製が可能である。このプローブを *S. livingstonensis* Ac10 に対して用いることにより、EPA 含有リン脂質と特異的に相互作用するタンパク質として dipeptidyl carboxypeptidase (Dcp) ホモログを同定することに成功した。

3-2. ω -アルキニル EPA 誘導体を用いた探索

EPA で修飾されるタンパク質を同定するツールとして ω -アルキニル EPA 誘導体 (cEPA) を合成した。cEPA はクリックケミストリーにより検出が可能である。cEPA は Δ EPA 株の 4℃での生育速度を野生株と同等にまで回復させたことから天然型 EPA と同様の生理機能をもつと考えられた。cEPA を添加した菌体からタンパク質を調製し、アジドクマリンで蛍光標識後、電気泳動に供し、蛍光標識されたタンパク質を検出した。その結果、7 つの EPA 修飾タンパク質が見いだされた。さらに、アジドビオチンを用いてビオチン標識タンパク質を調製し、ストレプトアビジンによるアフィニティー精製と同定を行った。同定されたタンパク質の一つは架橋性リン脂質プローブを用いて同定された Dcp ホモログと同一のタンパク質であった。EPA 修飾によって、Dcp ホモログの膜親和性が上昇するとともに、特定の膜領域への局在化が促されることで、膜タンパク質の分解に関与していることが示唆された。EPA 含有リン脂質との相互作用が見いだされた Dcp ホモログが EPA による修飾反応を受けていたという結果は、Dcp ホモログの EPA による修飾反応で、EPA 含有リン脂質が EPA の供与体になってい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 や DHA などの LPUFA は機能性脂質として注目されているが、その分子レベルでの作用機序には不明な点が多い。本論文は、EPA のアナログを含有するリン脂質、蛍光標識した EPA 含有リン脂質、架橋性官能基をもつ EPA 含有リン脂質、架橋性官能基をもつ EPA 誘導体といった種々の脂質プローブを有機化学的手法で合成し、それらを用いて EPA の分子レベルでの生理機能発現機構を解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 二重結合の数や位置、鎖長の異なる種々の EPA アナログを含有するリン脂質が *S. livingstonensis* Ac10 の EPA 欠損株の低温感受性を抑制する効果を解析し、EPA 含有リン脂質、または DHA 含有リン脂質を添加した場合のみ、野生株と同じ表現型に回復することを見いだした。LPUFA の構造機能相関の一端を明らかにした意義深い研究成果といえる。
2. 蛍光標識エーテル型リン脂質を合成し、これを用いて eicosapentaenyl を含むリン脂質が *S. livingstonensis* Ac10 の細胞膜の細胞分裂部位に集積することを見いだした。EPA が本菌の細胞分裂に関与することが示されているが、この結果は、その仕組みを明らかにする上で重要な手がかりを与える意義深い知見といえる。細菌の細胞膜に炭化水素鎖の構造依存的にマイクロドメインが形成されることを初めて示した研究成果であり、合成されたリン脂質プローブは他生物細胞における EPA 含有リン脂質の局在性解析にも応用できるため、普遍的な生物現象発見への手がかりを示した点で高く評価される。
3. 架橋性リン脂質プローブ、および ω -アルキニル脂肪酸プローブを用いることにより、EPA と特異的に相互作用する新しいリポタンパク質を見いだした。これは、細菌において LPUFA 修飾タンパク質が存在することを初めて示した研究成果であり、特筆に値する。

以上のように本論文は、さまざまな生物における LPUFA 研究に利用可能な脂質プローブを開発するとともに、細菌細胞膜における EPA の機能発現機構の一端を明らかにしたものであり、分子微生物科学、脂質生物学、化学生物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24年2月9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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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