

氏 名	あ べ たか ひろ 阿 部 孝 宏
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1524 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Characterization and Transcriptional Analysis of Fatty Acid Desaturase Genes in Desaturation-defective Mutants from Oleaginous Fungus <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 (油糧性真菌 <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 に由来する不飽和化反応欠損変異株における脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の諸性質解明と転写解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 江 崎 信 芳 教 授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、産業的に有用な油脂蓄積性糸状菌の脂肪酸生合成における不飽和化反応系を遺伝子レベルで解明することを目的とした研究をまとめたもので、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 生合成に関わる一連の脂肪酸不飽和化酵素 (desaturase) の遺伝子の構造の解明および不飽和化活性低下に関わる desaturase タンパク質のアミノ酸残基の特定について述べたものである。

1) n-6 経路の出発脂肪酸であるリノール酸の $\Delta 15$ 位を不飽和化し n-3 経路の出発脂肪酸である α -リノレン酸に変換する desaturase をコードする cDNA をクローニングした。本酵素遺伝子を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に形質転換した。得られた形質転換体を n-6 経路の各 PUFA とともに培養し、菌体脂肪酸組成を測定したところ、それぞれの添加した n-6 系 PUFA に対応する n-3 系 PUFA の生成が認められた。よって、本 desaturase は各 PUFA の $\omega 3$ 位を幅広く不飽和化するユニークな $\omega 3$ desaturase であることが判明した。

2) パルミチン酸をパルミトレイン酸へ、ステアリン酸をオレイン酸へ不飽和化する $\Delta 9$ desaturase ($\Delta 9I$) のホモログ遺伝子 ($\Delta 9II$) をコードする cDNA をクローニングした。 $\Delta 9II$ は $\Delta 9I$ とアミノ酸配列で 86% の相同性を示した。麹菌 (*Aspergillus oryzae*) での発現解析において、 $\Delta 9I$ 形質転換体ではパルミチン酸とステアリン酸の $\Delta 9$ 位への二重結合の導入が起これ、パルミトレイン酸とオレイン酸の同時蓄積が認められた。一方、 $\Delta 9II$ 形質転換体ではオレイン酸は蓄積するが、パルミトレイン酸の蓄積は認められなかった。よって、 $\Delta 9I$ と $\Delta 9II$ は互いに基質特異性が異なると推測された。また、長鎖飽和脂肪酸の $\omega 9$ 位の不飽和化に関与する $\omega 9$ desaturase 遺伝子をコードする cDNA もクローニングした。本酵素は炭素鎖長 24 あるいは 26 の飽和脂肪酸の $\omega 9$ 位に二重結合導入する長鎖飽和脂肪酸に特異的な desaturase であることが判明した。さらに、 $\Delta 9$ desaturase 活性低下変異株の $\Delta 9$ desaturase 遺伝子変異部位を同定し、 $\Delta 9I$ 遺伝子上にのみ変異部位を見いだした。 $\Delta 9I$ と $\Delta 9II$ 遺伝子の転写レベルを野生株と比較したところ、野生株においては $\Delta 9I$ が主に機能しており、 $\Delta 9II$ はほとんど転写されていないことが判明した。一方、変異株の $\Delta 9II$ 遺伝子は野生株の $\Delta 9I$ 遺伝子と同程度転写されていた。このことより、 $\Delta 9$ desaturase 活性低下変異株では、 $\Delta 9I$ に代わって $\Delta 9II$ が $\Delta 9$ 位不飽和化の中心的な役割を担っていると推定した。

3) $\Delta 6$ desaturase 活性低下変異株において、 $\Delta 6$ desaturase ($\Delta 6I$ と $\Delta 6II$) のうち、野生株において主に機能している $\Delta 6I$ 遺伝子にのみ変異部位が存在することが判明した。このことより、変異株における顕著な脂肪酸組成の変化の原因が、遺伝子変異による $\Delta 6I$ の活性低下であると推定した。

4) これまでに取得された $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 12$, $\omega 3$ desaturase 活性低下変異株に注目し各 desaturase 遺伝子の変異部位を同定した。各変異株において、終止コドンの形成、アミノ酸残基の置換、イントロン内の塩基置換による誤ったスプライシングの形成などそれぞれの変異株で様々な変異が起こっていることを認めた。特に、アミノ酸置換の結果から不飽和化酵素の

活性と高次構造に大きく影響するアミノ酸残基が存在することを示した。

論文審査の結果の要旨

近年、微生物によって作られる油脂を医薬品や機能性食品の原料として利用する試みが展開しており、有用油脂生産に関わる代謝経路や生合成機構の解明は、この分野の重要課題のひとつとなっている。著者は、高度不飽和脂肪酸（PUFA）含有油脂の工業生産糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の有する脂肪酸不飽和化酵素（desaturase）遺伝子の諸特性を分子生物学的手法を駆使して解明し、PUFA 含有油脂を高生産するための基盤的要因のいくつかを明らかにした。成果として評価すべき点は次の通りである。

1) ω 3 desaturase をコードする cDNA をクローン化し、塩基配列を決定した。本 ω 3 desaturase は他起源の酵素とは異なり広い基質特異性を示し、各種 n-3 系 PUFA の生産に利用できることを示した。

2) Δ 9 desaturase (Δ 9I) のホモログ (Δ 9II) 遺伝子を単離し、機能解析を行った。その結果、 Δ 9II は Δ 9I と異なり、炭素数16の飽和脂肪酸に作用せず高い基質特異性を示す酵素であることを認めた。また Δ 9 desaturase 活性低下変異株の遺伝子解析より、 Δ 9II は Δ 9I の欠失時に発現し機能することを証明した。

3) 上記 Δ 9 desaturase とは別に、 ω 9 位を不飽和化する desaturase をコードする遺伝子を単離し、機能解析の結果より本酵素が炭素鎖長24あるいは26の長鎖飽和脂肪酸に作用するユニークなものであることを明確にした。

4) Δ 6 desaturase 活性低下変異株では、活性低下の原因が2種存在する Δ 6 desaturase (Δ 6I と Δ 6II) のうち野生株で主に機能している Δ 6I 遺伝子の変異に基づくことを示した。

5) Δ 5, Δ 6, Δ 12, ω 3 desaturase 活性低下変異株に注目し、活性が低下した酵素をコードする遺伝子の変異部位を同定した結果、各変異株の desaturase において、desaturase の活性と高次構造に大きく影響するアミノ酸残基が存在することを示した。

以上のように本論文は、PUFA 生産性糸状菌における desaturase の構造と機能についての新しい知見を得、その結果を利用することで各種 PUFA を含有する有用油脂の生産が可能なことを示唆したもので、油糧微生物の育種に関連する応用微生物学、分子生物学に貢献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17年6月16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。