

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	SUWANAWAT Nittikarn
論文題目	Biochemical characteristics and physiological functions of lysophosphatidic acid acyltransferases from <i>Escherichia coli</i> and <i>Thermus thermophilus</i> (<i>Escherichia coli</i> と <i>Thermus thermophilus</i> のリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の生化学的特性と生理機能)		
(論文内容の要旨) 生体膜を構成するグリセロリン脂質のアシル鎖組成は、生体膜の物理化学的性質や膜タンパク質の機能に大きな影響を及ぼす。グリセロリン脂質の生合成では、グリセロール 3-リン酸の <i>sn</i>-1 位がアシル化されてリゾホスファチジン酸が生成し、続いて <i>sn</i>-2 位がアシル化されてホスファチジン酸が生成する。リゾホスファチジン酸アシル基転移酵（LPAAT）は、この第二段階のアシル化を触媒する酵素であり、その特性を明らかにすることは、生体膜の形成や機能制御の仕組みを理解する上で重要である。しかし、膜内在性タンパク質である LPAAT は活性を保った状態での可溶化や精製が困難であり、精製酵素を用いた特性解析はほとんど行われてこなかった。本論文では、<i>Escherichia coli</i> および <i>Thermus thermophilus</i> 由来の LPAAT を精製し、それらの生化学的特性を明らかにするとともに、<i>E. coli</i> 由来 LPAAT の基質認識機構や生理機能の解析が行われており、その内容は以下のように要約される。 1. <i>T. thermophilus</i> HB8 由来 LPAAT の特性解析 好熱性細菌 <i>T. thermophilus</i> HB8 の細胞膜は分岐アシル鎖含有リン脂質を主成分とし、多くの生物種で見られる直鎖アシル鎖含有リン脂質をほとんど含まない。そのため、本菌のグリセロリン脂質合成に関わる酵素はユニークな特性を持つ可能性が考えられる。本研究では、LPAAT（TtPlsC）に着目して検討を行なった。C 末端にヒスチジンタグを付与した TtPlsC を <i>E. coli</i> C43(DE3) を宿主として発現させた後、界面活性剤として 6-シクロヘキシルヘキシル-β-D-マルトシド（CYMAL-6）または <i>n</i>-ドデシル-β-D-マルトシド（DDM）を用いて可溶化し、熱処理、およびアフィニティークロマトグラフィーによって電気泳動的に均一になるまで精製した。得られた精製酵素は LPAAT 活性を保持していた。本酵素は pH 9.0 および 80 °C で最大活性を示し、耐熱性を有することが示された。基質特異性を解析した結果、アシル基、不飽和アシル基、分岐鎖アシル基を有する多様なアシル CoA をアシル基供与体として利用できることが示され、広い基質特異性を示すことが明らかとなった。AlphaFold2 を用いて立体構造を予測した結果、TtPlsC は典型的な LPAAT のアシル基供与体の認識に関わると考えられる N 末端ヘリックスの一部を欠失していることが見出された。この構造的特徴が TtPlsC の広い基質特異性に寄与しているものと考えられた。 2. <i>E. coli</i> 由来の二種の LPAAT の特性解析 <i>E. coli</i> は、LPAAT として、生存に必須な EcPlsC と、補助的な役割を持つ EcYihG を有する。本論文では、両酵素の精製と生化学的特性の比較解析を行うとともに、それぞれの基質認識機構が調べられた。C 末端にヒスチジンタグを付与した EcPlsC につ			

いては、CYMAL-6 を用いた可溶化、またはスチレン-マレイン酸共重合体 (SMA) ナノディスクを用いた抽出に続いて、アフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、活性を保持した状態で電気泳動的に均一になるまで精製することに成功した。本酵素は pH 8.0 および 37 °C で最大活性を示した。アシル基供与体に対する基質特異性を調べた結果、炭素鎖長 16 および 18 のモノ不飽和アシル基を持つアシル CoA (パルミトレオイル CoA など) に対する活性が高く、炭素鎖長 12 および 14 の飽和アシル基を持つアシル CoA (ラウロイル CoA およびミリストイル CoA) に対する活性はきわめて低いことが見出された。一方、C 末端にヒスチジンタグを付与した EcYihG は、SMA ナノディスクを用いた抽出とアフィニティークロマトグラフィーによって、活性を保持した状態で電気泳動的に均一に精製された。本酵素は pH 7.5 および 30 °C で最大活性を示した。本酵素は、炭素鎖長 14 の飽和アシル基を持つミリストイル CoA に対する活性が高く、炭素鎖長 18 以上のアシル CoA にはほとんど作用しなかった。以上の結果から、EcPlsC と EcYihG は明確に異なる触媒特性を有することが明らかとなった。AlphaFold2 を用いて予測した両酵素の立体構造モデルでは、EcPlsC の Thr92、および本残基に対応する EcYihG の Tyr125 が、基質のアシル基を収容すると推定される疎水性キャビティの入口付近に見出された。EcPlsC の Thr92 を嵩高いアミノ酸残基である Tyr、Phe、Trp に置換した変異型酵素では、鎖長が短い基質に対する活性が上昇した。一方、EcYihG の Tyr125 を嵩の低い Thr、Ser、Ala に置換した変異型酵素ではミリストイル CoA に対する活性が低下し、野生型 EcPlsC が良好な基質とするパルミトレオイル CoA に対する活性が上昇した。以上の結果から、EcPlsC の Thr92 と EcYihG の Tyr125 は、それぞれの酵素の基質特異性に顕著な影響を及ぼす残基であることが示された。

3. EcYihGの生理機能解析

EcPlsC は *E. coli* の生存に必須の主要な LPAAT であることが示されているが、EcYihG の生理機能については、その欠損が細胞運動性の向上をもたらすことが示されているものの、ほとんど解析が行われてこなかった。そこで、本論文では EcYihG 遺伝子の欠失株を用いて、EcYihG の生理機能が調べられた。野生株と EcYihG 欠損株のマルチオミクス解析を行った結果、EcYihG 欠損株では、べん毛形成に関連するタンパク質や mRNA が増加していることが見出された。一方、グルタミン酸依存性の酸耐性に関わる遺伝子群の発現が低下していることも見出された。実際に 1 mM グルタミン酸存在下で pH 2.5 での酸ストレス試験を行った結果、EcYihG 欠失株の酸感受性が野生型株よりも高いことが示された。これらの結果から、EcYihG 依存的に生成する膜リン脂質が、べん毛形成や酸耐性に関わる遺伝子群の発現に影響を及ぼすと考えられた。

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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生体膜の主要な構成成分であるグリセロリン脂質の生合成では、前駆体であるグリセロール 3-リン酸の *sn*-1 位と *sn*-2 位がアシル化される。LPAAT は *sn*-2 位のアシル化を触媒する酵素であり、その特性を明らかにすることは、生体膜の形成機構や機能制御機構を理解する上で重要である。しかし、膜内在性タンパク質である LPAAT を、活性を保った状態で可溶化して精製することは難しく、従来、精製標品を用いた生化学的特性解析はほとんど行われてこなかった。本論文は、可溶化条件の検討などによって得られた種々の精製 LPAAT の生化学的特性を明らかにしたほか、基質特異性などが異なる種々の LPAAT について、それらの構造-機能相関と新たな生理機能を示したものであり、評価すべき点として以下の 3 点が挙げられる。

1. 好熱性細菌 *T. thermophilus* HB8 由来の LPAAT を精製して触媒特性を解析し、本酵素が飽和アシル基、不飽和アシル基、分岐鎖アシル基を有する多様なアシル CoA を基質とすることを見出した。また、立体構造予測により、広い基質特異性を有するための構造的基盤に関する知見を得た。ユニークな特性を持つ新奇 LPAAT を見出した研究成果として注目される。
2. *E. coli* 由来の二種の LPAAT (EcPlsC と EcYihG) を精製して機能解析を行い、それらが著しく異なる基質特異性を有することを見出した。また、立体構造予測と部位特異的変異実験により、それらの基質特異性に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。LPAAT の構造-機能相関の一端を明らかにした成果として高く評価される。
3. 生理機能に関する知見が乏しかった EcYihG について、本酵素の欠損株と野生株のマルチオミクス解析や生育特性の比較解析を行い、本酵素が *E. coli* の酸耐性に重要であることなどを見出した。LPAAT の新しい生理機能を見出した成果として意義深い。

以上のように、本論文は、細菌由来の種々の LPAAT について、高度に精製した標品を用いて生化学的特性の詳細を明らかにするとともに、構造-機能相関や新たな生理機能を見出したものであり、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、令和 6 年 11 月 21 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）