

氏 名	かじ かわ まさ たか 梶 川 昌 孝
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 31 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Characterization of the genes involved in the long-chain- polyunsaturated-fatty-acid biosynthesis in <i>Marchantia</i> <i>polymorpha</i> and <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (ゼニゴケおよびクラミドモナスの鎖長高度不飽和脂肪酸生合成酵素遺伝子 の同定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 内 孝 之 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 小 堤 保 則

論 文 内 容 の 要 旨

アラキドン酸 (AA), エイコサペンタエン酸 (EPA), ピノレン酸 (PA) などの有用鎖長高度不飽和脂肪酸 (LCPUFA) は、健康を維持する栄養成分として需要が高い。これら有用 LCPUFA の供給は、魚類やマツなど特定の生物種に依存しており、海洋・森林資源の枯渇等の問題から安定かつ安価に生産する方法が望まれている。そこで申請者は、苔類のゼニゴケが AA・EPA を、緑藻クラミドモナスが PA を含有することに注目し、これらの植物から LCPUFA 生合成酵素遺伝子を単離し、遺伝子導入による草本植物での LCPUFA 生合成を試みた。

ゼニゴケにおいて、AA および EPA はそれぞれリノール酸 (LA) および α -リノレン酸 (ALA) より、 $\Delta 6$ 不飽和化、鎖長延長および $\Delta 5$ 不飽和化の連続した 3 反応により生合成されると考えられるので、縮退 PCR 法を用いてそれぞれの酵素の候補遺伝子を単離した。脂肪酸鎖長延長酵素については、植物固有の β -ketoacyl CoA synthase (KCS) と動物や菌類において見出された鎖長延長酵素 (ELO) の二種類を候補とし、双方の相同遺伝子 (KCS 型; *MpFAE2* および *MpFAE3*, ELO 型; *MpELO1*) を単離した。ゼニゴケにおける過剰発現および発現抑制解析により、*MpFAE2* および *MpFAE3* は炭素鎖長 16-22 までの飽和脂肪酸の鎖長延長に関わるものの、LCPUFA の鎖長延長には関与しないことが示された。一方、*MpELO1* は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたヘテロ発現解析の結果、AA・EPA 生合成経路上の鎖長延長反応を担うことがわかった。次に、*MpDES6* および *MpDES5* 遺伝子を単離し、これらがそれぞれ $\Delta 6$ -および $\Delta 5$ -不飽和化酵素をコードすることを示した。さらに、*MpDES6*, *MpELO1* および *MpDES5* 遺伝子を *P. pastoris* において共発現させ、AA・EPA の生合成に成功した。*MpDES6* 遺伝子を発現させた *P. pastoris* の脂質の解析から、*MpDES6* 遺伝子産物がグリセロ脂質型および CoA 結合型アシル鎖のいずれをも基質にする可能性を示唆した。この結果と鎖長延長酵素の基質が CoA 結合型アシル鎖であることを考慮し、*MpDES6* 遺伝子産物がより効率よく鎖長延長酵素へアシル鎖を供給できると予測した。そこで、タバコにおいて *MpDES6*, *MpELO1* および *MpDES5* 遺伝子を発現させた結果、 $\Delta 6$ 不飽和化産物が高効率で鎖長延長され、全脂肪酸の約 17% に相当する量の AA・EPA を蓄積させることに成功した。

クラミドモナス EST より、既知の $\Delta 5$ 不飽和化酵素と相同性を示す遺伝子 *CrDES* を単離した。既知の $\Delta 5$ 不飽和化酵素は LA に対する不飽和化活性をほとんど示さないのに対し、*P. pastoris* において、*CrDES* 遺伝子産物が LA および ALA に対する $\Delta 5$ 不飽和化活性を有することを示した。さらに、異なる脂肪酸基質を用いた解析より、*CrDES* 遺伝子産物が二重結合をアシル鎖に導入する際に、カルボキシ末端からではなくメチル末端からの相対位置 ($\omega 13$ 位) を認識することから $\omega 13$ 不飽和化酵素であることを提唱した。

以上、ゼニゴケおよびクラミドモナスから LCPUFA 生合成を担う酵素遺伝子を単離・同定した。特にゼニゴケ由来の酵素遺伝子は、組換え作物で LCPUFA 生産を行う上で有用な遺伝子資源になりうることを示した。

論文審査の結果の要旨

本研究はアラキドン酸 (AA), エイコサペンタエン酸 (EPA), ピノレン酸 (PA) といった有用鎖高度不飽和脂肪酸 (LCPUFA) を農作物である植物種において生産する方法の開発への基礎的な研究を行っている。申請者は, AA・EPA を含む苔類ゼニゴケおよび PA を含む緑藻クラミドモナスより LCPUFA 生合成酵素遺伝子を単離し, 元来有用 LCPUFA 生合成能を備えていない高等植物での AA・EPA の生合成に成功した。

LCPUFA を生合成するゼニゴケなどの下等植物には, 植物固有の酵素 β -ketoacyl CoA synthase (KCS) および動物や菌類にも存在する鎖長延長酵素 (ELO) が共存する。申請者は, KCS 型相同遺伝子 *MpFAE2* および *MpFAE3*, ELO 型相同遺伝子 *MpELO1* を単離し, *MpFAE2* および *MpFAE3* が飽和脂肪酸の鎖長延長を, *MpELO1* が LCPUFA の鎖長延長を担うことを示した。これは KCS 型および ELO 型鎖長延長酵素が基質脂肪酸の種類に応じて使い分けられていることを示した初めての例であり, 下等植物における脂質生合成系の理解に貢献したと認められる。

申請者は, *MpDES6* 遺伝子産物がグリセロ脂質型アシル鎖および CoA 結合型アシル鎖の両方を基質にする可能性を示した。これは植物および菌類由来の $\Delta 6$ -不飽和化酵素としては初めての例であり, $\Delta 6$ -不飽和化酵素に関する理解を深め, 下等植物の LCPUFA 生合成経路におけるアシル鎖の動態の解明につながる知見として意義深い。さらに申請者は, *MpDES6* 遺伝子産物および *MpELO1* 遺伝子産物の両方が CoA 結合型アシル鎖を基質にできることが, 高等植物における AA および EPA 生合成効率の向上に寄与すると仮定した。タバコ葉で *MpDES6*, *MpELO1* および *MpDES5* 遺伝子を共発現させたところ, *MpELO1* の鎖長延長効率は80%を超え, AA・EPA 蓄積量は全脂肪酸量の約17%に達していた。これは, グリセロ脂質型アシル鎖のみを基質とする $\Delta 6$ -不飽和化酵素遺伝子を導入した高等植物での報告値をはるかに凌ぎ, LCPUFA を生産する高等植物の実用化に向けた研究として高く評価できる。

CrDES 遺伝子産物は, *MpDES5* 遺伝子産物と同様 front-end 型と総称される一群の不飽和化酵素に分類されるが, PA を生合成する点, そしてメチル末端から基質脂肪酸の鎖長を認識する点で新規かつ重要である。特に後者の知見は, front-end 型不飽和化酵素がカルボキシ末端からの距離に基づいて二重結合を導入するという定説の再考を促し, front-end 型不飽和化酵素の機能および分子進化を理解する上で大きく貢献した。

申請者は, 本研究を通して組換え作物を用いた LCPUFA 生産の実用化に向けて, 新しい基質特異性をもつ脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発見などの重要な知見を提供しているもので, 学術上, 応用上貢献するところが少なくない。従って, 本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認められる。

なお, 平成17年1月24日, 論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果, 合格と認めた。