

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	宮 春 傑
論文題目	Characterization of Proteins Involved in the Biosynthesis of Eicosapentaenoic Acid in <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 (<i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 のエイコサペンタエン酸生合成に関与するタンパク質の特性解明)		
(論文内容の要旨)			
エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの ω-3 高度不飽和脂肪酸はリン脂質のアシル鎖として生体膜に存在し、特異な生理機能を発現する。<i>Shewanella</i> 属の海洋性細菌では、これらの脂肪酸が低温環境下における細胞分裂などにおいて重要な役割を果たす。これらの細菌では、糸状菌や線虫などの真核生物とは異なり、デサチュラーゼに依存しない機構で高度不飽和脂肪酸が生合成される。<i>Shewanella</i> 属細菌ではポリケチド生合成酵素に類似した酵素が生合成を担うことが知られているが、生合成機構の詳細は明らかにされていない。EPA を低温誘導的に生産する低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 では、<i>orf2</i>、<i>orf5</i>、<i>orf6</i>、<i>orf7</i>、<i>orf8</i> からなる遺伝子クラスターが EPA 生合成に関与することが示されているが、それらの遺伝子産物の機能は明らかにされていない。本研究は、本菌の EPA 生合成に関与するタンパク質の特性を解析したものであり、その成果は以下のように要約される。			
1. EPA 生合成酵素への補因子の結合に関与する酵素の特性解明			
EPA 生合成に関与する 5 つのタンパク質のうち、Orf2 は、そのアミノ酸配列の特徴から、アシルキャリアータンパク質 (ACP) のホスホパンテテイル化を触媒するホスホパンテテイルトランスフェラーゼ活性をもつものと推定された。一方、EPA 生合成への関与が示されている Orf5 には、ACP と相同性を示す領域が 5 つ連続して存在することが見いだされた。これらの ACP ドメインを個別に <i>Escherichia coli</i> において発現し精製するとともに、Orf2 も発現・精製し、これらの機能を調べた。その結果、Orf5 の ACP ドメインはいずれも Orf2 の作用によってホスホパンテテイル化されることが示された。Orf2 がホスホパンテテイルトランスフェラーゼ活性をもつことが実証されるとともに、Orf5 の 5 つの ACP ドメインに導入されるホスホパンテテイル基が、EPA 合成反応において反応中間体が結合する足場として機能することが推定された。			
2. <i>S. livingstonensis</i> Ac10 ゲノムの改変法の開発			
オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (<i>pyrF</i>) を選択マーカーとして、本菌のゲノム遺伝子を削除する方法および本菌のゲノムに外来遺伝子を挿入する方法を確立した。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼがウラシル生合成系の酵素であること、またオロチジン-5'-リン酸のアナログである 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) を毒性の高い 5-フルオロウラシルに変換することに着目し、ウラシル要求性と 5-FOA 耐性を指標として <i>pyrF</i> 遺伝子削除株を取得した。一方、本菌体内で自律複製しないプラスミドに <i>pyrF</i> とカナマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして導入し、ゲノム改変用プラスミドを構築した。このプラスミドに本菌のゲノム配列と相同性を			

示す DNA 断片、および、ゲノムに導入したい任意の配列を挿入して本菌に導入し、相同組換えによってゲノムを改変した。ゲノムが改変された組換え体は、ウラシル非要求性およびカナマイシン耐性の株として選抜することができた。このようにして得られた組換え体はゲノム内に *pyrF* をもち、5-FOA 感受性となるが、再度、相同組換えを起こさせることによって *pyrF* が除去されたゲノム改変体を、5-FOA 耐性株として取得することにも成功した。これにより、*pyrF* を選択マーカーとして繰り返し使用してゲノムを改変することが可能になった。この方法によってゲノム上の *orf5* を欠失させたところ、本菌の EPA 生産能が消失し、本遺伝子の EPA 生合成への関与が確認されるとともに、本菌のゲノム改変における本手法の有効性が示された。

3. EPA 生合成酵素複合体の同定

上述の手法を用いて本菌のゲノム上の *orf5* 遺伝子を改変した。本菌で高発現されるペルオキシレドキシン遺伝子のプロモーターを 5'-非翻訳領域に挿入するとともに、ヒスチジンタグをコードする配列を 3'-末端領域に挿入した。この菌体の抽出物をニッケルキレートカラムクロマトグラフィーに供した結果、EPA 生合成に関与する Orf7 と Orf8 が、ヒスチジンタグを付与された Orf5 との相互作用を介してニッケルキレートカラムに結合することが示され、これらのタンパク質が複合体を形成することが示された。EPA 生合成系酵素群が複合体を形成することにより、EPA 生合成が効率的に進行するものと推定された。

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)

EPA や DHA などの ω -3 高度不飽和脂肪酸は機能性脂質として注目されている。これらの脂肪酸は糸状菌や線虫などの真核生物のほか、*Shewanella* 属などに分類される海洋性細菌でも生合成される。真核生物では分子状酸素依存的に不飽和結合を導入する生合成機構をもつものが多いが、細菌ではこれとは異なる機構で生合成が進行するものと考えられている。本論文は、EPA 生産性細菌である *S. livingstonensis* Ac10 における EPA 生合成機構を解析するとともに、本菌のゲノム改変に関する基盤技術を開発したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *S. livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子クラスターに含まれる *orf2* が ACP のホロ化を触媒するホスホパンテテイニルトランスフェラーゼをコードしていることを明らかにした。また、本酵素が、*orf5* がコードするタンパク質に含まれる ACP ドメインをホスホパンテテイニル化することを見いだした。EPA 生合成酵素への補因子の結合機構を明らかにしたものであり、意義深い研究成果といえる。
2. 本菌の任意の遺伝子を除去する方法と、本菌のゲノムに任意の DNA 配列を挿入する方法を開発した。EPA の生合成機構のみならず、本菌のさまざまな生理機能発現の分子機構を *in vivo* で解析する手法を確立したもので、本菌の環境適応の分子機構解析など、今後の研究に寄与する成果として高く評価される。
3. 本菌の EPA 生合成に関与する Orf5、Orf7、Orf8 が複合体を形成することを見いだした。多段階からなる EPA 生合成反応が、複合体内部での反応中間体の授受によって効率よく進行することを示唆する結果であり、EPA 生合成機構の一端を明らかにしたものとして評価できる。

以上のように本論文は、*Shewanella* 属細菌におけるデサチュラーゼ非依存型の高度不飽和脂肪酸生合成機構を、新たに開発したゲノム改変技術を用いて解析し、関与する酵素への補因子の結合機構を明らかにするとともに、生合成に関与する酵素群が複合体を形成して機能することを見いだしたものであり、分子微生物科学、酵素化学、脂質生化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25年2月12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