

学 位 論 文 題 名

Biochemical studies on the fatty acid synthesis in relation to low-temperature adaptation in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1

(好冷性細菌 *Vibrio* sp. strain ABE-1 の低温適応に関わる脂肪酸合成の生化学的研究)

学位論文内容の要旨

Vibrio sp. strain ABE-1 (*Vibrio* ABE-1 株) は、至適生育温度を 15℃、最高生育温度を 20℃ にもつ好冷性細菌である。*Vibrio* ABE-1 株は 0～20℃ まで温度範囲において膜の流動性を適切な状態に保つ能力を持っていることから、低温環境に非常に良く適応していると思われる。膜脂質の脂肪酸組成は膜の流動性の調節に重要であると考えられているが、*Vibrio* ABE-1 株の脂肪酸組成は、(1) 炭素数 16 の脂肪酸 (16:0、16:1(9c)、16:1(7c)、16:1(9t)) に富む、(2) これら炭素数 16 の脂肪酸の割合は全脂肪酸の 80% を占め、その割合は生育温度が変化しても殆ど変動しない、(3) 最高生育温度付近でユニークなトランス型脂肪酸 16:1(9t) が合成される、以上 3 つの特徴をもつ。これらの特徴的な脂肪酸組成をもつ膜脂質が低温環境下で膜の流動性を適切な状態に保つことによって、*Vibrio* ABE-1 株の好冷性はもたらされることが考えられている。しかし、本菌の脂肪酸合成の調節機構に関してはこれまで不明であった。

本研究は、特に *Vibrio* ABE-1 株における脂肪酸の鎖長調節因子の同定と不飽和脂肪酸の合成機構の解明に焦点を当て、好冷性微生物の膜の流動性調節機構を生化学的側面から明らかにすることを目的に行われた。

Vibrio ABE-1 株の脂肪酸の鎖長調節機構を明らかにするため、細胞質画分の 55～75% 硫酸沈殿を本菌の脂肪酸合成酵素 (FAS) 画分とし、 $[^{14}\text{C}]$ マロニル CoA を基質とする *in vitro* 脂肪酸合成反応を行った。本菌の FAS による脂肪酸合成はアシルキャリアータンパク質 (ACP) の濃度に完全に依存し、又、 $[^{14}\text{C}]$ マロニル CoA の脂肪酸への取り込みがチオラクトマイシンによって完全に阻害されることから、II 型の FAS であることが示された。更に、本菌の FAS は炭素数 16、18 の脂肪酸に加え、炭素数 20～30 の超長鎖脂肪酸をアシル-ACP の形で合成する能力を潜在的に有していることが *in vitro* 脂肪酸合成実験から明らかとなった。この結果は本菌の FAS 自体には、脂肪酸鎖長調節能力が全くないことを意味している。

本菌の脂肪酸の鎖長調節機構を明らかにするために、まず、*in vitro* 脂肪酸合成反応における ACP 濃度の影響を調べた。その結果、反応系中の ACP 濃度が高くなるにつれて合成される脂肪酸の炭素鎖長が短くなることが確認された。本菌細胞中の ACP 濃度は明らかにされていないが、この結果は ACP 濃度が脂肪酸鎖長を調節している要因の 1 つであることを示唆するものである。次に、FAS を調製する際に除かれる細胞質画分の 0～55% 硫酸沈殿 (55% 画分) を *in vitro* 脂肪酸合成反応系に加えたところ、合成された脂肪酸の約 50% は本菌が本来もっている炭素数 14、16 の遊離脂肪酸として回収された。又、この活性は加熱処理によって完全に失われることから、酵素活性、即ちチオエステラーゼ活性であることがわかった。そこで、本活性の鎖長特異性を調べたところ、炭素数 16 のアシル-ACP とアシル-CoA に対して最も高い活性を示した。以上の結果より、本菌の主要脂肪酸を炭素数 16 の脂肪酸としている要因の 1 つは、この 55% 画分中のチオエステラーゼ活性の鎖長特異性にあると示唆される。

細菌のモノ不飽和脂肪酸合成経路には、嫌気 (非酸化) 経路と好気 (酸化) 経路の 2 つの存在が知られている。嫌気経路ではモノ不飽和脂肪酸は II 型の脂肪酸合成酵素により飽

和脂肪酸とともに合成される。一方、好気経路ではモノ不飽和脂肪酸は酸素に依存した飽和脂肪酸の不飽和化反応によって合成される。

Vibrio ABE-1株に好気条件下で $[^{14}\text{C}]$ 酢酸を与えて脂肪酸をパルスラベルすると、16:1、18:1の他に14:1の合成が認められた。しかし、これらの脂肪酸のうち14:1はその合成が嫌気経路の特異的阻害剤である3-デシノイル-N-アセチルシステアミンの存在下で完全に阻害されたが、16:1、18:1の合成は阻害されなかった。これらの結果は、本菌の14:1は嫌気経路によって合成されること、即ち、好気条件下でも嫌気経路が機能していることを示している。また、16:1、18:1は好気経路によっても合成されることを示唆するものである。一方、本菌に嫌気条件下、好気条件下で $[^{14}\text{C}]$ 14:0を与え、本菌の脂肪酸をパルスラベルすると、嫌気条件下では不飽和脂肪酸の合成は見られなかったが、好気条件下では飽和脂肪酸として16:0が、不飽和脂肪酸として16:1が合成された。しかし、14:1の合成は認められなかった。これらの結果は、好気条件下において、14:0は速やかに鎖長伸長、好氣的な不飽和化を受け、16:0、16:1に変換されることを示す。よって、本菌は16:0を好氣的な不飽和化することが明らかとなった。以上の結果から、本菌が好気条件下で不飽和脂肪酸を嫌気、好気の両経路を経て合成することが示された。両経路をもつことによる不飽和脂肪酸供給能の高さが、本菌の低温生長（適応）を可能にしていると思われる。これまで生物は上述の2つの経路の内、いずれか一方のみをもつと考えられてきており、単一の生物でこれら2つの経路によって不飽和脂肪酸を合成するという例は本菌が初めてである。

本菌の最高生育温度付近で合成されるユニークな16:1(9t)は、これまでの研究で16:1(9c)のシス-トランス異性化反応によって合成されることが間接的に示されているが、直接的な証明はなされていなかった。16:1(9t)の生合成経路を明らかにするために、重水素化された16:1(9c)を本菌に与えてその代謝を調べた。調製した脂肪酸メチルエステルを硝酸銀薄層クロマトグラフィーでシス型とトランス型不飽和脂肪酸に分けた後、各々を二重結合の位置決定に非常に有効な二硫化ジメチル付加物としてGC-MSで分析した。その結果、16:1(9t)は16:1(9c)が異性化されることによって生成されることが示され、同様に重水素化された16:1(9t)を用いることによって16:1(9t)から16:1(9c)が生成されることも明らかにされた。これまでに知られているシス-トランス異性化反応と異なり、本菌のシス-トランス異性化反応は二重結合の位置の移動を伴わない点でユニークである。

次に、本菌におけるトランス型脂肪酸の機能を明らかにするために、5℃で培養した細胞を20℃の培地に植え継ぎ、その後の炭素数16の脂肪酸の代謝を詳細に調べた。16:1(9c)の割合は植え継ぎ後に激減するが、その後は漸増を示した。16:0の割合は植え継ぎ後に増加するが、対数増殖期後期になると減少を始め、それに伴って16:1(9t)の割合は増加し始めた。又、 $[^{14}\text{C}]$ 酢酸を用いて本菌の *de novo* 飽和脂肪酸合成能を植え継ぎ後から経時的に調べたところ、植え継ぎ後には合成能が上がるが、その後減少を続けることが明らかになった。このことは、本菌の飽和脂肪酸合成を司るFASが比較的熱に不安定であることを示唆している。これまで、16:1(9t)の機能については、トランス型脂肪酸の融点が飽和脂肪酸とシス型不飽和脂肪酸の融点の間にあることから、膜流動性の微妙な調節に関与していると考えられていたが、以上の結果は、16:1(9t)は細胞内の16:0の合成能の低下を補償するために合成されるという新しい可能性を示唆するものである。

このように、*Vibrio* ABE-1株においては、炭素数16のアシル-ACPに特異的なチオエステラーゼによる厳密な脂肪酸の鎖長調節、嫌気経路と好氣的な不飽和化の両経路をもつことによる不飽和脂肪酸の高い供給能力、そして16:1(9c)のシス-トランス異性化反応によって、本菌の特徴的な脂肪酸組成が決定され、それによって本菌の膜脂質の流動性が適切に調節されていると結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 川 鑛 副 査 教 授 吉 田 静 夫
副 査 教 授 落 合 廣 副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志

学 位 論 文 題 名

Biochemical studies on the fatty acid synthesis in relation to low-temperature adaptation in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1

(好冷性細菌 *Vibrio* sp. strain ABE-1 の低温適応に関わる脂肪酸合成の生化学的研究)

細菌の温度適応に関する従来の研究は、温度変化と細胞成分組成及び生理活性の変動を関連付けるといった現象面の記載にとどまっていた。本研究は至適生育温度を15℃、最高生育温度を20℃にもつ好冷性細菌 (*Vibrio* sp. strain ABE-1) という好適な材料を得て、かつ本菌の脂質に関する詳細な分析結果をもとにして、細菌の低温適応機構を脂肪酸代謝の面から生化学的に解明すべく行われたものである。以下に、その研究成果の要点を述べる。

- (1) 本菌はII型の脂肪酸合成酵素をもち、本酵素には鎖長調節能力はなく、潜在的に炭素数30までの超長鎖脂肪酸を合成する能力を有していることを明らかにした。
- (2) 本菌の細胞質中にはアシル-中間体を遊離脂肪酸とする活性、チオエステラーゼ活性があり、本菌膜脂質の主要脂肪酸を炭素数16としている要因の1つは、このチオエステラーゼ活性の鎖長特異性にあることを示唆する結果を得た。
- (3) ACP濃度が脂肪酸合成の炭素鎖長に影響を与えることを明らかにした。
- (4) 本菌の不飽和脂肪酸は、好気条件下では、好気、嫌気の両経路を経て合成されることを明らかにした。全脂質の80%以上が不飽和脂肪酸によって占められている本菌の場合、両経路によって不飽和脂肪酸が供給できることの低温適応における生理的意義は極めて大きい。
- (5) 重水素化された脂肪酸をトレーサーとし、その結果をGC-MSで分析することによって本菌のトランス型脂肪酸、16:1(9t)は二重結合の位置の移動を伴わないシストランス異性化反応により合成されるを明らかにした。
- (6) 16:1(9t)は、16:0の合成能の低下を補償し、膜の流動性を適切な状態に維持するために合成されることを示唆する結果を得た。

これらの成果は、申請者がラジオアイソトープを用いた実験とそのデータの解析、タンパク質と脂質の分離・分析、GC-MSなどの機器分析、代謝阻害剤の利用とデータの解析などの面で勝れた能力を発揮したことにより得られたものである。また、上記の諸知見は、好冷性細菌の低温適応機構の理解にとって重要なもので、この分野の発展に寄与するところ大であり、内外よりの高い評価を得ている。

これらの研究成果をまとめた主論文の内容、および口頭発表による最終試験の成績を総合して検討した結果、審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。